Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Untersuchung der toxisch-kanzerogenen Rolle von NO-induzierten und TRPA1-vermittelten Signalwegen in der Lunge in einem In-vitro-Zellsystem

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Christina Maria Berr-Kirmair, geb. Berr

aus München

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Mitberichterstatter:	PD Dr. Nikolaus Kneidinger
	PD Dr. Kai Hell
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Thomas Büch
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	17.01.2019

Meiner Familie

Abstract

The Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) is a non-selective ion channel and a sensor for exogenous irritants like cigarette smoke and pro-inflammatory stimuli like nitic oxide (NO). Some volatile and toxic TRPA1-Agonists are well-known lung cancer-causing substances. As TRPA1 is expressed in lung tumor cells and NO was shown to be highly linked to aggressiveness of lung tumors, we investigated the interaction of TRPA1 and NO with regard to signaling pathways. Therefore, we established a TRPA1-positive model system in HEK293 cells for identification of TRPA1-linked effects and identified ERK1/2-activation as a consequence of NO-mediated TRPA1-activation. An involvement of NO-mediated guanylyl cyclase and protein kinase G- dependent signaling as well as the involvement of other potential ERK1/2-linking or lung cancer relevant signaling molecules like Calmodulin/CaMKII, PI3 kinase, phospholipase C and protein kinase C could be ruled out. Furthermore, we identified Src and Pyk2, two non-receptor tyrosine kinases, as important players in TRPA1-mediated ERK1/2-activation. Experiments in the small cell lung cancer cell line H69, which expresses TRPA1 channels, suggest a biological relevance in lung cancer. TRPA1 may be a possible link between smoking behavior, NO and aggressiveness and progression of lung cancer.

Zusammenfassung

Der Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) ist ein nicht-selektiver Ionenkanal, der sowohl exogene Reizstoffe wie Zigarettenrauch als auch proinflammatorische Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO) wahrnehmen kann. Unter den flüchtigen und giftigen TRPA1-Agonisten sind einige Substanzen bekannt, die mit der Entstehung von Lungenkrebs assoziiert sind. Da der TRPA1-Kanal auf Lungenkrebszellen exprimiert wird und NO mit einer erhöhten Tumoraggressivität bei Lungenkrebs einhergeht, wurde der Zusammenhang zwischen dem TRPA1-Kanal, NO und möglichen hierdurch aktivierten Signalwegen näher untersucht. Hierzu wurde ein TRPA1-tragendes Zellmodellsystem in HEK293-Zellen entwickelt, um TRPA1-abhängige Effekte zu identifizieren. Eine ERK1/2-Phosphorylierung konnte hierbei in Abhängigkeit einer NO-vermittelten TRPA1-Aktivierung nachgewiesen werden. Die Beteiligung der NO-abhängigen Guanylylcyclase und der Proteinkinase G sowie anderer Signalmoleküle wie Calmodulin/CaMKII, PI3-Kinase, Phospholipase C and Proteinkinase C, welche ebenfalls ERK1/2 mit einer Lungentumorgenese verknüpfen könnten, konnte ausgeschlossen werden. Jedoch konnten Src und Pyk2, zwei Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen, als wichtige Akteure bei der TRPA1-vermittelten ERK1/2-Aktivierung identifiziert werden. Versuche in H69-Zellen, die vom Kleinzelligen Lungenkrebs abstammen und TRPA1-Kanäle exprimieren, legen eine biologische Relevanz beim Lungenkrebs nahe. Der TRPA1-Kanal könnte die bekannten Zusammenhänge zwischen Rauchgewohnheiten, NO und der Aggressivität und Progression von Lungenkrebs neu erklären.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung I
Abbildungsverzeichnis V
Tabellenverzeichnis VI
Abkürzungsverzeichnis VII
Veröffentlichungen X

1 Einleitung **1**
1.1 Lungenkrebs 1
1.2 Stickstoffmonoxid in der Lungentumorgenese 2
1.3 Die Role des TRPA1-Kanals an der Lungentumorgenese 5
1.3.1 Die TRP-Kanal-Familie 5
1.3.2 Aufbau und Eigenschaften des TRPA1-Kanals 7
1.4 ERK 1/2 als mögliches TRPA1-Effektorprotein 10
1.5 HEK293-Zellen als Modellsystem 12

2 Zielsetzung **13**

3 Material und Methoden **14**
3.1 Material 14
3.1.1 Geräte 14
3.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien 15
3.1.3 Hergestellte Lösungen und Puffer 17
3.1.4 Software 18
3.2 Zelllinien und Zellkultur 18
3.2.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen 18
3.2.2 H69-Zellen 18
3.2.3 HEK293-Zellen 18
3.2.4 Transfektion von Zellen 19
3.2.5 Stimulationsbedingungen 19
3.3 Stabile Transfektion einer HEK239-Zellreihe mit hTRPA1 20
3.4 Aufreinigung von Plasmid-DNA 20
3.5 Nachweis einer erfolgreichen Transfektion mittels Licht- und Fluoreszenzmikroskopie 20
3.6 Fluometrische NO-Messung mittels DAF-2 DA 20
3.7 Analyse der TRPA1-Expression auf RNA-Ebene 22
3.7.1 Allgemeine Arbeitsbedingungen 22
3.7.2 RNA-Isolierung 22
3.7.3 Quantitative Real-time Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion 23
3.7.3.1 Reverse Transkription in cDNA 23
3.7.3.2 Polymerasekettenreaktion 24
3.8 Proteinanalyse mittels SDS-PAGE und Immunoblot 26
3.8.1 SDS-PAGE 27
3.8.2 Immunoblot 27
3.8.3 Semiquantitative Auswertung 28
3.9 Statistische Methoden 28

4 Ergebnisse **29**
4.1 Entwicklung eines HEK293-TRPA1-Modellsystems . . . 29
4.1.1 Fluoreszenznachweis nach erfolgreicher Transfektion von Zellen mit GFP/TRPA1 . . . 29
4.1.2 Nachweis der TRPA1-Expression in HEK293-Zellen auf mRNA-Ebene . . . 29
4.1.3 Nachweis des TRPA1-Kanalproteins in transfizierten Zellen mittels Western Blot . . . 31
4.1.4 Nachweis eines funktionellen TRPA1-Kanals durch Aktivierung mittels AITC . . . 31
4.2 Stickstoffmonoxid vermittelte TRPA1-Kanal-Aktivierung . . . 32
4.2.1 Fluorometrische Bestimmung der NO-Freisetzung durch SIN-1 und MAHMA NONOate 32
4.2.2 TRPA1-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung durch den NO-Donator SIN-1 . . . 35
4.2.3 TRPA1-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung durch den NO-Donator MAHMA NONOate . . . 37
4.3 Aufklärung NO-TRPA1-vermittelter Signalwege . . . 40
4.3.1 Unabhängigkeit der ERK1/2-Phosphorylierung über NO von sGC, cGMP und PKG . 40
4.3.2 Unabhängigkeit der ERK1/2-Phosphorylierung über NO von Calmodulin, CaMKII, PI3-Kinase, PKC und PLC . . . 41
4.3.3 Identifizierung einer Pyk2/Src-Abhängigkeit . . . 45
4.4 Übertragung in ein endogenes Expressionsmodell . . . 48
4.5 Etablierung einer stabilen hTRPA1-HEK293-Zelllinie . . . 48

5 Diskussion **49**
5.1 Stärken und Schwächen eines HEK293-TRPA1-Überexpressionsmodells . . . 49
5.2 Funktioneller Nachweis des TRPA1-Kanals in transfizierten HEK293-Zellen . . . 51
5.3 Einfluss der NO Freisetzung auf die ERK1/2-Phosphorylierungsdynamik . . . 52
5.4 Guanylylcyclase-unabhängige Stickstoffmonoxid Effekte . . . 52
5.5 Mögliche Beteiligung des neu identifizierten TRPA1-abhängigen Signalweges an der Lungentumorgenese . . . 53
5.5.1 Relevanz von TRPA1-Kanälen in Lungentumoren . . . 53
5.5.2 TRPA1-Kanäle und ERK1/2 . . . 55
5.5.3 Src-Kinasen und Pyk2 in Lungentumorzellen . . . 59
5.5.4 TRPA1-Kanäle und Wachstum von Lungentumorzellen . . . 62

6 Ausblick: der TRPA1-Kanal als neue Zielstruktur in Lungentumoren **63**

Literatur **64**

Anhang **88**

Eidesstattliche Versicherung **91**

Danksagung **93**

Abbildungsverzeichnis

1.1 Absolute Zahl von Neuerkrankungen und Sterbefällen an Lungenkrebs in Deutschland nach Geschlecht 1970-2013/2014 . . . 1
1.2 Chemische Strukturformel von Stickstoffmonoxid (NO) . . . 3
1.3 sGC-abhängiger NO-Signalweg am Beispiel von inhaliertem NO in der Lunge . . . 4
1.4 Die phylogenetische Verwandtschaft der TRP-Kanäle . . . 6
1.5 Homotetramere Anordnung von TRP-Proteinen in funktionellen Kanälen . . . 6
1.6 Aufbau des TRPA1-Kanals . . . 9
1.7 Chemische Struktur mehrerer TRPA1-Agonisten . . . 10
1.8 Schematische Darstellung der MAPK-Kaskade . . . 11
3.1 Reaktion von DAF-2 mit NO und Sauerstoff zu fluoreszierendem DAF-2T . . . 21
3.2 Strukturformeln der NO-Donatoren SIN-1 (a) und MAHMA NONOate (b) . . . 21
3.3 SYBR Green-Fluoreszenzkurve einer Amplifikation von in cDNA umgeschriebener β-Aktin-mRNA in HEK293-Zellen . . . 24
3.4 Schmelzkurve einer in DNA umgeschriebener hTRPA1-mRNA in HEK293-Zellen . . . 26
4.1 Fluoreszenz-Overlay-Aufnahme von hTRPA1/GFP-transfizierten HEK293-Zellen . . . 29
4.2 SYBRGreen-Fluoreszenzkurven einer Amplifikation von hTRPA1-mRNA und β-Aktin-mRNA 30
4.3 TRPA1-Kanalproteinnachweis . . . 31
4.4 ERK1/2-Phosphorylierung in TRPA1-transfizierten HEK293-Zellen nach AITC . . . 31
4.5 Inhibition der ERK1/2-Phosphorylierung durch RR in TRPA1-transfizierten HEK293-Zellen . 32
4.6 NO-Messung: relativer DAF-2T-Fluoreszenzanstieg nach SIN-1-Zugabe . . . 33
4.7 NO-Messung: relativer DAF-2T-Fluoreszenzanstieg basal, nach Zugabe von 100 µM NaOH sowie 10 µM und 50 µM MAHMANONOate . . . 33
4.8 NO-Messung: relativer DAF-2T-Fluoreszenzanstieg nach Zugabe von 10 µM MAHMANONOate und 5 µM RR . . . 34
4.9 Zeitkinetik der ERK1/2-Phosphorylierung unter 100 µM SIN-1 . . . 35
4.10 Inhibition der ERK1/2-Phosphorylierung durch RR in TRPA1-transfizierten HEK293-Zellen unter SIN-1 . . . 36
4.11 Zeitkinetik der ERK1/2-Phosphorylierung unter 10 µM MAHMANONOate . . . 37
4.12 Zeitkinetik der ERK1/2-Phosphorylierung unter 50 µM MAHMANONOate . . . 38
4.13 ERK1/2-Phosphorylierung durch 50 µM MAHMANONOate nach 10 und 15 min . . . 39
4.14 Inhibition der ERK1/2-Phosphorylierung in TRPA1-transfizierten HEK293-Zellen unter MAHMANONOate . . . 39
4.15 Keine ERK1/2-Phosphorylierung unter NaOH als Trägerlösung von MAHMANONOate . . . 39
4.16 Keine Beteiligung der sGC und der PKG an der NO/TRPA1-vermittelten ERK1/2-Phosphorylierung . . . 40
4.17 Keine Beteiligung von Calmodulin und der CaMKII an der NO/TRPA1-vermittelten ERK1/2-Phosphorylierung . . . 41
4.18 Keine Beteiligung der PI3-Kinase an der NO/TRPA1-vermittelten ERK1/2-Phosphorylierung 43
4.19 Keine Beteiligung der PKC an der NO/TRPA1-vermittelten ERK1/2-Phosphorylierung . . . 44
4.20 Keine Beteiligung der PLC an der NO/TRPA1-vermittelten ERK1/2-Phosphorylierung . . . 44
4.21 Inhibition der NO/TRPA1-vermittelten ERK1/2-Phosphorylierung durch den unspezifischen Tyrosinkinaseinhibitor AG17 . . . 45

4.22 Inhibition der NO/TRPA1-vermittelten ERK1/2-Phosphorylierung durch den Pyk2-Inhibitor PF-431396 . . . 45
4.23 Inhibition der NO/TRPA1-vermittelten ERK1/2-Phosphorylierung durch den Src-Kinase-Inhibitor PP2 . . . 46
4.24 Angenommener, schematischer Aufbau einer NO/TRPA1-vermittelten Src/Pyk2-abhängigen ERK1/2-Phosphorylierung . . . 47
4.25 Inhibition einer AITC/TRPA1-vermittelten ERK1/2-Phosphorylierung durch den Pyk2-Inhibitor PF-431396 und dem Src-Kinase-Inhibitor PP2 . . . 47
4.26 Zeitkinetik der ERK1/2-Phosphorylierung durch SIN-1 in H69-Zellen . . . 48
5.1 Inhibition der AITC/TRPA1-vermittelten ERK1/2-Phosphorylierung durch den Src-Inhibitor PP2 in der SCLC-Zelllinie H146 . . . 50
5.2 Inhibition der NO/TRPA1-vermittelten ERK1/2-Phosphorylierung durch den Pyk2-Inhibitor PF-431396, dem Src-Inhibitor PP2 und dem Pan-TRP-Blocker Rutheniumrot in A549-Zellen 50
5.3 Expression des TRPA1-Kanals in Gewebeproben von Gesunden und Patienten mit NSCLC & SCLC . . . 53
5.4 Übersicht von Histologie, Mutationen, Translokationen und Veränderung der Kopienzahl in NSCLC-Tumoren . . . 56
5.5 Verteilungsmuster von p-ERK1/2 nach Nervendurchtrennung und TRPA1-Kanälen im lumbalen Rückenmark . . . 58
6.1 Verwendetes hTRPA1-kodierendes Plasmid: pCAGGSM2-IRES-GFP/hTRPA1_patapoutian-_seq-Plasmid . . . 88
6.2 Verwendetes mTRPA1-kodierendes Plasmid: pCAGGSM2-IRES-GFP/mTRPA1_seq-Plasmid 89
6.3 Vervielfältigung und Quantifizierung einer spezifischen DNA-Sequenz mittels PCR und SYBR Green . . . 90

Tabellenverzeichnis

1.1 Relative Häufigkeitsverteilung der histologischen Subtypen von Lungenkrebs . . . 2
1.2 Übersicht über humane TRP-Kanalopathien . . . 7
3.1 "RevertAid^{TM} H Minus First Strand cDNA Synthesis"-Kit: Inhaltsstoffe und verwendete Mengen 23
3.2 LightCycler® FastStart DNA Master ^{PLUS} SYBR Green I - Mengenangaben . . . 25
3.3 Protokoll der real-time RT-qPCR entsprechend Herstellerangaben und Primerprofil . . . 25
4.1 Expressionslevel von TRPA1, TRPV1-6 und TRPM7 in TRPA1-untransfizierten und -transfizierten HEK293-Zellen . . . 30

Abkürzungsverzeichnis

AITC	Allylisothiocyanat
AKT	Synonym für Proteinkinase B
ALK	Rezeptor-Tyrosinkinase, engl.: Anaplastic lymphoma kinase
ANKTM1	Ursprünglicher Name des TRPA1-Kanals, engl.: ankyrin-like protein with transmembrane domains
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Bcl-2	Proto-Onkogen, engl.: B-cell lymphoma 2
BIM	Bisindolylmaleimid, PKC-Inhibitor
Ca^{2+}	Calciumionen
CaMKII	Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
CFS	Krampf-Faszikulationssyndrom, engl.: cramp fasciculation syndrome
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat, engl.: cyclic guanosinmonophosphate
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung, engl.: chronic obstructive pulmonary disease
Cp-Wert	Engl.: crossing point, PCR: der Punkt (Zykluszahl), an dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz steigt
CRAMPT-Syndrom	Engl.: carbamazepine-responsive cramp fasciculation syndrome, Unterform des CFS, TRPA1-Kanalopathie
DAF-2	Diaminofluorescein
DAG	2-Diacylglycerin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl.: deoxyribonucleic acid
DRG	Spinalganglienzellen, engl.: dorsal root ganglia
DTT	Dithiothreitol
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor, engl.: epidermal growth factor
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor, engl.: epidermal growth factor receptor
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition, engl.: epithelial to mesenchymal transition, ein Resistenzmechanismus in NSCLC bei Therapie mit Rezeptor-Tyrosinkinaseninhibitoren
ERK1/2	Extrazellulär signalregulierte Kinase 1 und 2, engl.: extracellular signal-regulated kinase 1 and 2

FCS	Fötales Kälberserum, engl.: fetal calf serum
FeNO	Anteil von NO an der Ausatemluft, engl.: fraction of exhaled nitric oxide
Fold Change	Verhältnis von relativer Helligkeit der behandelten zur relativen Helligkeit der basalen Bande im Immunoblot
FSGS	Fokal segmentale Glomerulosklerose, engl.: focal segmental glomerulosclerosis
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein, engl.: green fluorescent protein
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor, engl.: G-protein coupled receptor
Grb2	Adaptorprotein, engl.: growth factor receptor-bound protein 2
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonsäure
HIF-1α	Hypoxie-induzierter Faktor 1α, engl.: hypoxia-inducible factor-1α
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
MAHMA NONOate	6-(2-Hydroxy-1-methyl-2-nitrosohydrazino)-N-methyl-1-hexanamine, NO freisetzende Substanz
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthasen, engl:. nitric oxide synthases
NOSp	Reaktive Nitrogenspezies, engl.: reactive nitrogen species
NSCLC	Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom, engl.: non small cell lung cancer
ODQ	1H-(1,2,4)oxadiazolo(4,3-a)quinoxalin-1-one
PDGF	Aus Thrombozyten entstammender Wachstumsfaktor, engl.: platlet derived growth factor
PDGFR	Rezeptor für PDGF; engl.: platlet derived growth factor receptor
PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat; Strukturanalogon des Diacylglycerins
Pyk2	Tyrosinkinase, engl.: proline rich tyrosine kinase 2

Raf-1	Onkogen, Serin/Threonin-Proteinkinase, Mitglied der MAPK-Kaskade, engl.: rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	Proto-Onkogen, G-Protein, Mitglied der MAPK-Kaskade, engl.: rat sarcoma
Rb	Retinoblastom-Protein, Tumorsuppressor-Protein
RNA	Ribonukleinsäure, engl.: ribonucleic acid
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies, engl.: reactive oxygen species
RR	Rutheniumrot, Pan-TRP-Blocker
SCLC	Kleinzelliges Lungenkarzinom, engl.: small cell lung cancer
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sGC	Lösliche Guanylylcyclase, engl.: soluble guanylyl cyclase
SH2-Domäne	Engl.: src-homology 2 domain, Proteinabschnitt mit besonderen Bindungsstellen für Signalmoleküle
SIN-1	3-(4-Morpholinyl)sydnonimin-Hydrochlorid, aktiver Metabolit von Molsidomin, NO freisetzende Substanz
SOS	GTP-Austauschfaktor, engl.: son of sevenless
Src	Proto-Onkogen, Tyrosinkinase, engl.: sarcoma
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRP	Engl.: transient receptor potential, nachfolgende Buchstaben bezeichnen verschiedene Mitglieder der TRP-Kanal-Familie
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor, engl.: vascular endothelial growth factor

Veröffentlichungen

Originalarbeiten

[1] **Christina M Berr**, Guido Di Dalmazi, Andrea Osswald, Katrin Ritzel, Martin Bidlingmaier, Lucas L Geyer, Marcus Treitl, Klaus Hallfeldt, Walter Rachinger, Nicole Reisch, Rainer Blaser, Jochen Schopohl, Felix Beuschlein, and Martin Reincke. Time to recovery of adrenal function after curative surgery for cushing's syndrome depends on etiology. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 100:13001308, April 2015.

[2] **Christina M Berr**, Mareike R Stieg, Timo Deutschbein, Marcus Quinkler, Ralf Schmidmaier, Andrea Osswald, Nicole Reisch, Katrin Ritzel, Christina Dimopoulou, Julia Fazel, Stefanie Hahner, Guenter K Stalla, Felix Beuschlein, and Martin Reincke. Persistence of myopathy in cushing's syndrome: evaluation of the german cushing's registry. *European journal of endocrinology*, 176:737746, June 2017.

[3] Guido Di Dalmazi, **Christina M Berr**, Martin Fassnacht, Felix Beuschlein, and Martin Reincke. Adrenal function after adrenalectomy for subclinical hypercortisolism and cushing's syndrome: a systematic review of the literature. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 99:26372645, August 2014.

[4] Guido Di Dalmazi, Marcus Quinkler, Timo Deutschbein, Cornelia Prehn, Nada Rayes, Matthias Kroiss, **Christina M Berr**, Guenter Stalla, Martin Fassnacht, Jerzy Adamski, Martin Reincke, and Felix Beuschlein. Cortisol-related metabolic alterations assessed by mass spectrometry assay in patients with cushing's syndrome. *European journal of endocrinology*, 177:227237, August 2017.

[5] Michael Drey, **Christina M Berr**, Martin Reincke, Julia Fazel, Jochen Seissler, Jochen Schopohl, Martin Bidlingmaier, Stefanie Zopp, Nicole Reisch, Felix Beuschlein, Andrea Osswald, and Ralf Schmidmaier. Cushing's syndrome: a model for sarcopenic obesity. *Endocrine*, July 2017.

[6] R P Kosilek, R Frohner, R P Wuertz, **C M Berr**, J Schopohl, M Reincke, and H J Schneider. Diagnostic use of facial image analysis software in endocrine and genetic disorders: review, current results and future perspectives. *European journal of endocrinology*, 173:M39M44, October 2015.

[7] Luis G Perez-Rivas, Marily Theodoropoulou, Francesco Ferrau, Clara Nusser, Kohei Kawaguchi, Constantine A Stratakis, Fabio Rueda Faucz, Luiz E Wildemberg, Guillaume Assie, Rudi Beschorner, Christina Dimopoulou, Michael Buchfelder, Vera Popovic, **Christina M Berr**, Miklos Toth, Arif Ibrahim Ardisasmita, Juergen Honegger, Jerome Bertherat, Monica R Gadelha, Felix Beuschlein, Guenter Stalla, Masayuki Komada, Marta Korbonits, and Martin Reincke. The gene of the ubiquitin-specic protease 8 is frequently mutated in adenomas causing cushing's disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 100:E9971004, July 2015.

[8] Martin Reincke, Katrin Ritzel, Andrea Osswald, **Christina Berr**, Guenter Stalla, Klaus Hallfeldt, Nicole Reisch, Jochen Schopohl, and Felix Beuschlein. A critical reappraisal of bilateral adrenalectomy for ACTH-dependent cushing's syndrome. *European journal of endocrinology*, 173:M23M32, October 2015.

[9] Katrin Ritzel, Felix Beuschlein, **Christina Berr**, Andrea Osswald, Nicole Reisch, Martin Bidlingmaier, Harald Schneider, Juergen Honegger, Lucas L Geyer, Jochen Schopohl, and Martin Reincke.

ACTH after 15 min distinguishes between cushing's disease and ectopic cushing's syndrome: a proposal for a short and simple CRH test. *European journal of endocrinology*, 173:197204, August 2015.

[10] Vincent L Wester, Martin Reincke, Jan W Koper, Erica L T van den Akker, Laura Manenschijn, **Christina M Berr**, Julia Fazel, Yolanda B de Rijke, Richard A Feelders, and Elisabeth F C van Rossum. Scalp hair cortisol for diagnosis of cushing's syndrome. *European journal of endocrinology*, 176:695703, June 2017.

Kongressabstracts (Erstautor)

[1] **C Berr**, EAM Schaefer, T Gudermann, and TRH Buech. Guanylyl cyclase independent signaling of nitric oxide via trpa1. In *Naunyn-Schmiedebergs Archives Of Pharmacology*, volume 386, pages S9S9, 2013.

[2] **Christina M Berr**, Guido Di Dalmazi, Andrea Osswald, Katrin Ritzel, Martin Bidlingmaier, Lucas L Geyer, Marcus Treitl, Klaus Hallfeldt, Walter Rachinger, Nicole Reisch, et al. Time to recovery of adrenal function after curative surgery for cushing's syndrome depends on etiology. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 100(4):13001308, 2015.

[3] **Christina M Berr**, Marcus Quinkler, Mareike Stieg, Timo Deutschbein, Andrea Osswald, Ralf Schmidmaier, Nicole Reisch, Katrin Ritzel, Rainer Blaser, Martin Fassnacht, et al. Muscle strength in cushing's syndrome: cross-sectional evaluation of the german cushing's registry. *Endocrine Abstracts*, 2016.

[4] **Christina M Berr**, Mareike R Stieg, Timo Deutschbein, Marcus Quinkler, Ralf Schmidmaier, Andrea Osswald, Nicole Reisch, Katrin Ritzel, Christina Dimopoulou, Julia Fazel, et al. Persistence of myopathy in cushing's syndrome: evaluation of the german cushing's registry. *European Journal of Endocrinology*, 176(6):737746, 2017.

[5] **CM Berr**, K Ritzel, A Osswald, J Schopohl, F Beuschlein, and M Reincke. Time from symptoms to diagnosis in cushing's syndrome: results of the german cushing's registry in munich. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 122(03):LB18, 2014.

Buchkapitel

[1] Stephan Petersenn, **Christina M. Berr** et al. Morbus Cushing - Diagnostik und Therapie mit Fallbeispielen. 2. neubearb. Auflage. *UNI-MED*, 2016.

1 Einleitung

Lungenkrebs ist weltweit eine der häufigsten Krebserkrankungen überhaupt. Trotz der Fortschritte in der Forschung und der Entwicklung neuer Medikamente in den letzten Jahren bleibt die Prognose mit einem 5-Jahres-Überleben von nur 21 % schlecht, so dass es weiterhin notwendig ist, nach neuen Therapieansätzen zu suchen. Über Ionenkanäle, welche auf Lungentumorzellen exprimiert werden, kann Einfluss auf die Zellproliferation bzw. -apoptose genommen werden, weshalb Ionenkanäle Angriffspunkte für tumorspezifische Therapien darstellen könnten. Vor diesem Hintergrund wurde der Zusammenhang zwischen dem TRPA1-Kanal, einem auf Tumorzellen exprimierten Ionenkanal, und Stickstoffmonoxid (NO), einem sowohl im Zigarettenrauch als auch im Mikromilieu von Lungenkrebs vorkommenden Signalmolekül, in einem *in vitro* Zellsystem untersucht.

1.1 Lungenkrebs

Lungenkrebs zählt zu den führenden Krebserkrankungen weltweit und nimmt den ersten Platz bei krebsbedingtem Tod ein [114]. Mit einer Inzidenz von 34.469 Fällen/Jahr und 29.708 Sterbefällen/Jahr zählt er zur häufigsten krebsbedingten Todesursache bei Männern in Deutschland und zur zweithäufigsten bei Frauen (Abb. 1.1) [84]. Von der Erkrankung sind deutlich mehr Männer als Frauen betroffen. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei circa 69 Jahren. Trotz Chemotherapie und neuen Immuntherapeutika liegt das relative 5-Jahres-Überleben bei nur 21 % für Frauen und 16 % für Männer [84]. Ursächlich ist unter anderem eine lange Symptomarmut, so dass ein Lungenkrebs oft erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird [264]. Den wichtigsten Risikofaktor für die Entwicklung von Lungenkrebs stellt der Zigarettenkonsum dar [138]. So haben männliche Raucher gegenüber Niemalsrauchern ein 20-fach erhöhtes, relatives Risiko an Lungenkrebs zu erkranken [74]. Seltenere Ursachen für Lungenkrebs können eine meist berufsbedingte Exposition gegenüber Asbest, Radon, Chrom oder anderen Karzinogenen sein [35, 43, 29]. Aktuell wird für Deutschland ein weiterer Anstieg der Erkrankungsfälle bis 2020 prognostiziert.

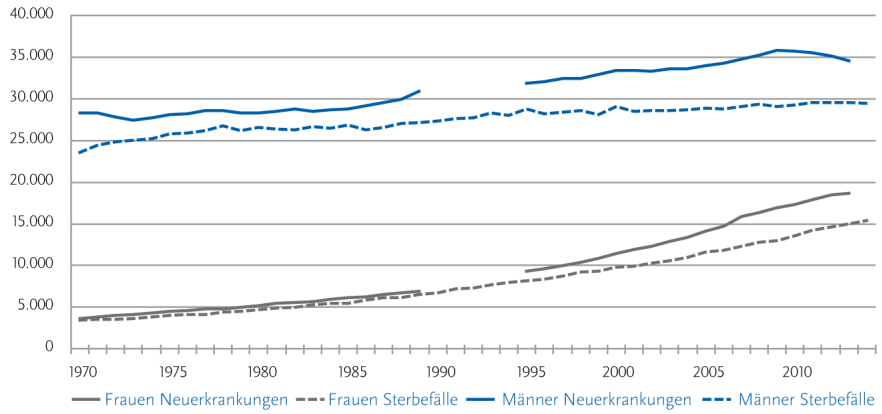


Abbildung 1.1: Absolute Zahl von Neuerkrankungen und Sterbefällen an Lungenkrebs in Deutschland nach Geschlecht 1970-2013/2014 [84]

Beim Lungenkrebs, auch als Bronchialkarzinom bezeichnet, handelt es sich um einen malignen, epithelialen Tumor der Bronchien oder der Lunge. Es können nach histologischer Einteilung unterschiedliche Subtypen unterschieden werden (siehe Tabelle 1.1). Für die Therapieplanung wird in Nicht-kleinzellige Tumoren (engl.: *non small cell lung cancer,* NSCLC) und Kleinzellige Lungentumoren (engl.: *small cell lung cancer,* SCLC) unterteilt [194, 106]. Unter NSCLC fallen Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome und alle weiteren seltneren Lungentumore. Der SCLC beinhaltet nur eine histologische Tumorentität und zeichnet sich durch ein

besonders schnelles Wachstum, eine schnelle Chemotherapie-Resistenz und eine schlechte Prognose aus. Die Therapie erfolgt bei NSCLC nach Möglichkeit chirurgisch in Kombination mit einer Chemo- oder Radiochemotherapie auf Platin-Basis. Bei SCLC ist eine Platin-basierte Chemo- oder Radiochemotherapie ebenfalls Standard. Ein chirurgisches Vorgehen wird beim SCLC jedoch nur in absoluten Frühstadien und immer in Kombination mit einer Chemotherapie angewandt, da es bereits sehr früh zum Auftreten von Mikrometastasen kommt. Bei NSCLC werden zusätzlich in fortgeschrittenen Stadien Rezeptor-Tyrosinkinaseinhibitoren wie zum Beispiel Erlotinib (Anti-EGFR, Antikörper gegen den *epidermal growth factor receptor*), falls entsprechende Mutationen vorliegen, und andere Biologika wie Bevacizumab (Anti-VEGF, ein Antikörper gegen den *vascular endothelial growth factor*) eingesetzt [118, 213].

Tumorentität	relative Häufigkeit in %
Kleinzelliges Lungenkarzinom	14-15
Plattenepithelkarzinom	26-29
Adenokarzinom der Lunge	32-34
Großzelliges Lungenkarzinom	3-6
sonstige Lungentumore	17-23

Tabelle 1.1: Relative Häufigkeitsverteilung der histologischen Subtypen von Lungenkrebs [194, 106]

Symptome treten allgemein sehr spät auf und sind meist sehr unspezifisch. Hämoptysis, Müdigkeit, Gewichtsverlust, die lokale Infiltration von Nerven, Gefäßen oder Organen oder Schmerzen durch Knochenmetastasen deuten bereits auf ein fortgeschrittenes Stadium hin [264]. Eine allgemeine Vorsorgeuntersuchung, wie sie zum Beispiel bei Brustkrebs Anwendung findet, konnte sich bisher noch nicht durchsetzen, da aktuell noch kein gutes Nutzen-Schadens-Verhältnis bei zum Beispiel einer Untersuchung mittels einer low-dose-Computertomographie erzielt werden konnte [209].

1.2 Stickstoffmonoxid in der Lungentumorgenese

Im Rahmen der Suche nach einer Vorsorgeuntersuchung für Lungenkrebs konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass Patienten mit Lungenkrebs gegenüber Gesunden erhöhte Werte an Stickstoffmonoxid (NO) in der Ausatemluft (*FeNO, fraction of exhaled nitric oxide*) aufweisen [145, 149]. Auch wenn sich die FeNO als Vorsorgeuntersuchung noch nicht etablieren konnte, finden sich allgemein verschiedenste Hinweise, dass bei Patienten mit Lungenkrebs vermehrt erhöhte NO-Level, NOx und NO-Reaktionsprodukte in der Lunge sowie im restlichen Körper detektiert werden können. Nach drei Zyklen Chemotherapie konnte beispielsweise ein Rückgang der zuvor genannten FeNO beobachtet werden [120]. Auch Derivate von NO wie Nitrit im Serum waren in Lungenkrebspatienten vor Chemotherapie erhöht und bei ansonsten gleicher Therapie mit einer schlechteren Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert [55]. Reaktive NO-Abkömmlinge können zudem zu einer Nitrosylierung von Proteinen führen. Solche nitrosylierte Proteine fanden sich im Vergleich zu Gesunden ebenfalls vermehrt im Serum von Lungenkrebspatienten [208]. Hierbei waren die höchsten Werte bei Lungenkrebspatienten mit mehr als 20 *Packyears*[1] und die zweithöchsten bei Niemalsrauchern mit Lungenkrebs nachweisbar. Die geringsten Werte wiesen Niemalsraucher ohne Lungenkrebs auf [208]. Des Weiteren konnte eine besonders starke N-Nitrosylierung und somit das vermehrte Vorkommen von NO vor allem im Bereich des Lungentumors selbst nachgewiesen werden, so dass hier ein besonders NO-reiches Tumormikromilieu zu herrschen scheint [156].

[1] Packyears stellt eine Einheit dar, mit der die Zigarettenrauchexposition über die Menge und Dauer des Zigarettenkonsums abgeschätzt wird. Zum Beispiel entspricht ein Packyear einer Schachtel Zigaretten (20 Stück) täglich für die Dauer eines Jahres.

NO ist ein volatiles, endogenes Molekül mit reaktiven Eigenschaften, welches im Körper als Signalmolekül dient (Abb. 1.2). NO wird von Stickstoffmonoxid-Synthasen (engl.: *nitric oxid synthases*, NOS) aus der Aminosäure Arginin und Sauerstoff hergestellt und kann problemlos Zellmembranen durchdringen. Ferid Murad erkannte 1977 als erster die physiologische Rolle dieses Moleküls als *endothelium-derived relaxing factor* und erhielt zusammen mit Robert F. Furchgott und Louis J. Ignarro für seine Entdeckung 1998 den Nobelpreis [28, 7, 101, 122].

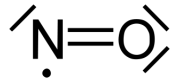


Abbildung 1.2: Chemische Strukturformel von Stickstoffmonoxid (NO)
Stickstoffmonoxid ist ein freies Radikal mit einem ungepaarten Elektron, wodurch es gerne mit anderen Molekülen neue Bindungen eingeht oder bestehende Bindungen aufbricht.

Neben seiner Funktion als Signalmolekül und der Regulation des Gefäßtonus konnte eine prognostisch relevante Überexpression von NOS und eine erhöhte NO-Produktion in verschiedensten Tumorentitäten einschließlich Lungenkrebs nachgewiesen werden. So geht zum Beispiel eine vermehrte Expression der NOS mit einem schlechteren Überleben bei Patientinnen mit Brustkrebs einher [81, 88, 253]. Die Beteiligung von NO an einer allgemeinen Tumorgenese wird jedoch seit Jahren kontrovers diskutiert, da NO sowohl anti- als auch proapoptotische Signale vermitteln kann [130]. Dies hängt vor allem von der Gewebeart und der NO-Expositionsmenge und -dauer ab [130]. Bei der Entstehung und Progression von Lungenkrebs spielt NO jedoch vor allem für Tumorwachstum und -metastasierung eine wichtige Rolle und scheint sowohl mit einer erhöhten Tumoraggressivität einher zu gehen als auch an der Entwicklung einer Chemotherapie-Resistenz beteiligt zu sein [83, 81, 152, 278]. So führte zum Beispiel eine länger andauernde Behandlung von Lungentumorzellen mit NO *in vitro* zu einer Chemotherapie-Resistenz [278]. Auch allgemein scheint NO bezüglich Lungenkrebs tumorpromovierend zu sein. Bei Asthmatikern, welche ebenfalls eine erhöhte FeNO aufweisen, besteht einer groß angelegten, epidemiologischen Studie zufolge ebenfalls ein erhöhtes Risiko an Lungenkrebs zu erkranken unabhängig von den Rauchergewohnheiten [211].

Allgemein werden NO-induzierte zelluläre Effekte durch unterschiedliche Mechanismen vermittelt. Der klassische Weg erfolgt über die Bindung an die Häm-Gruppe der intrazellulär gelegenen löslichen Guanylylcyclase (engl.: *soluble guanylyl cyclase,* sGC). Diese synthetisiert aus Guanosintriphosphat (GTP) cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP). cGMP aktiviert wiederum weitere Zielproteine wie Proteinkinasen – hier hervorzuheben die Proteinkinase G (PKG) –, aber auch Transkriptionsfaktoren und Phosphodiesterasen, über die unterschiedliche Signalwege vermittelt werden (siehe Abb. 1.3). Dies wird als klassischer NO-vermittelter Signalweg bezeichnet. Des Weiteren vermittelt NO aber auch auf sGC/cGMP-unabhängige Weise Effekte, indem es das Redoxpotential in der Zelle verändert oder redox-sensitive Signalmoleküle, wie z. B. Ionenkanäle, Tumorsuppressorproteine oder Proto-Onkogene, direkt durch kovalente Bindungen (z. B. durch die sog. S-Nitrosylierung bei SH-Gruppen von Cysteinen) modifiziert [180, 241]. So wurde zum Beispiel eine Bcl-2-Stabilisierung (ein Proto-Onkogen) durch NO-Exposition in Lungentumorzellen beschrieben, wodurch es zu einer geringeren Apoptoserate in diesen Zellen kommt [278, 11]. Auch kann NO über weitere reaktive Spezies zu direkten DNA Schäden führen und so eine Tumorgenese begünstigen [276].

Quellen für NO können exogen oder endogen sein. Zigarettenkonsum stellt den größten Risikofaktor für die Entwicklung von Lungenkrebs dar und ist gleichzeitig in diesem Risikokollektiv die Hauptquelle für exogenes NO [204]. Zigarettenrauch enthält neben allgemein karzinogenen Substanzen wie z. B. Benzol sowohl oxidierende Moleküle (reaktive Sauerstoffspezies, ROS) als auch NO und weitere reaktive Nitrogenspezies (NOSp). Pro Zug werden ca. 700 ppm NO von einer Zigarette abgegeben [80]. Über die im Zigarettenrauch freigesetzten u.a. reaktiven Substanzen kommt es in der Lunge, aber auch im gesamten Körper zu soge-

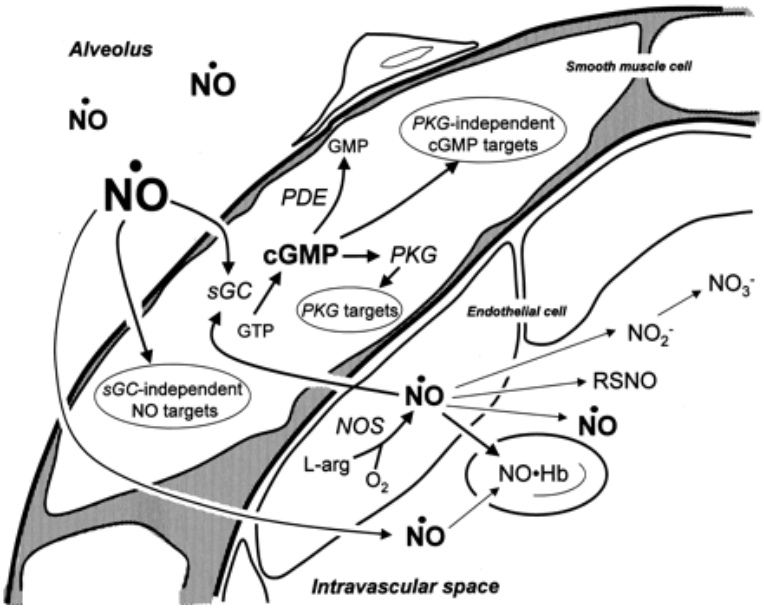


Abbildung 1.3: sGC-abhängiger NO-Signalweg am Beispiel von inhaliertem NO in der Lunge; aus [111]
NOS=NO-Synthase; L-arg=L-Arginine; sGC=soluble guanylyl cyclases=lösliche Guanylylcyclase; RSNO=S-Nitrosothiol

nanntem nitrosativen und oxidativen Stress. Cao *et al.* konnten zeigen, dass der oxidative Stress gemessen an 8-Hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), welches durch oxidativ verursachte DNA-Schäden entsteht, sowohl in Rauchern (ohne Lungenkrebs) gegenüber gesunden Nichtrauchern als auch in nicht-rauchenden Lungenkrebspatienten in Vergleich mit gesunden Nichtrauchern in der bronchoalveolären Lavage deutlich erhöht ist. Rauchten Patienten und hatten Lungenkrebs, wiesen diese die höchsten Werte von allen auf. Ebenso zeigten die 8-OHdG-Werte ein Maximum bei Patienten mit SCLC oder fortgeschrittenem Tumorstadium [41, 73]. Auch im Urin sind sowohl die Marker für oxidativen als auch nitrosativen Stress bei Rauchern in Vergleich zu Nichtrauchern signifikant erhöht [134, 40]. Insgesamt wird durch das Rauchen eine chronische Entzündung unterhalten, welche bereits für sich genommen karzinogen ist und auch noch mehr als 10 Jahre nach Beendigung des Rauchens im Körper nachweisbar bleibt [150, 271]. Im Einklang damit konnten Studien zeigen, dass eine geringere Zigarettenmenge oder das Nicht-Rauchen mit einem besseren Gesamtüberleben bei Lungenkrebspatienten assoziiert ist [96, 109, 112] und dass selbst die Beendigung des Rauchens nach der Diagnosestellung von Lungenkrebs (bei NSCLC und SCLC) noch zu einer Verlängerung des Überlebens führen kann [198]. Insgesamt findet sich bei Rauchern im Körper eine vermehrte Inflammation mit einer chronischen Erhöhung von Leukozyten und des C-reaktiven Proteins [19, 271]

Als endogene Quelle von NO steht besonders bei Rauchern die bereits erwähnte chronische Entzündung im Vordergrund. Mit ihr einher geht eine vermehrte Aktivität von Entzündungszellen. Diese können endogen über ihre zelleigene iNOS NO produzieren. Bei Gesunden ist die Produktion von NO und anderen reaktiven Verbindungen (Hyperoxidanionen, H_2O_2, Peroxynitrit etc.) im Rahmen einer (zeitlich begrenzten) Entzündungsreaktion (Inflammation) bei z. B. einer Infektion gewollt und ist Teil der natürlichen Abwehrreaktion des Körpers [76, 126]. Bei Rauchern läuft diese Inflammation jedoch dauerhaft ab. So sind auch die Leukozyten neben anderen Entzündungsparametern dauerhaft im Blut von Rauchern erhöht [287, 299]. Auch im Lungenspülwasser (bronchoalveoläre Lavage) von Rauchern und Lungenkarzinompatienten fand sich eine erhöhte Anzahl von Entzündungszellen wie Makrophagen und neutrophile Granulozyten, die ein Reservoir von NO in der Lunge darstellen können. [280, 48].

1.3 Die Role des TRPA1-Kanals an der Lungentumorgenese

Aus eigenen Vorarbeiten war bekannt, dass der TRPA1-Kanal, ein nicht-selektiver Kationen-leitender Ionenkanal, von mehreren Lungenkrebszelllinien exprimiert wird [221]. Der TRPA1-Kanal weist zum einen eine weitgefächerte Aktivierbarkeit durch Reizstoffe und zellschädigende Substanzen auf und kann zum anderen als Sensor für Entzündungsprozesse dienen [263, 26]. So konnte eine Beteiligung des TRPA1-Kanals im Rahmen entzündlicher Lungenerkrankungen wie Asthma bereits gezeigt werden [9]. Auch konnte mittlerweile direkt oder indirekt gezeigt werden, dass NO den TRPA1-Kanal aktivieren kann. Daher bestand Grund zur Annahme, dass NO auf Lungenzellen zu einer TRPA1-vermittelten Reaktion führen könnte [249, 4, 69]. Auch wenn sich über viele Jahre die TRPA1-Forschung auf neuronal exprimierte TRPA1-Kanäle fokussiert hat, so geht die Erstbeschreibung des TRPA1-Kanals auf ein in seiner Expression verändertes Protein in mesenchymalen Tumoren zurück, so dass der TRPA1-Kanal durchaus auch Relevanz im Bereich der Tumorgenese besitzen könnte [222]. Vor diesem Hintergrund ist eine mögliche Beteiligung des TRPA1-Kanals an einer Lungentumorgenese unter dem Einfluss von NO denkbar.

1.3.1 Die TRP-Kanal-Familie

Der TRPA1-Kanal als Sensor für Reizstoffe reiht sich in die große Familie der TRP-Kanäle ein, zu der viele mit dem TRPA1-Kanal in Struktur und Funktion verwandte, chemosensorische Kanäle gehören. Zum Teil finden sich Ähnlichkeiten im Signaltransduktionsverhalten oder auch eine Co-Expression von mehreren TRP-Kanälen. Auch wurde für einige TRP-Kanäle eine Beteiligung an der Tumorgenese beschrieben. Im Folgenden wird zuerst die TRP-Familie näher erläutert.

Für die Proteinfamilie namensgebend war das typische elektrische Verhalten dieser Ionenkanäle, welches von Cosens und Manning 1969 in einer Taufliegenmutante der Spezies Drosophila melanogaster beschrieben wurde [57]. Diese Fliege wies nach längerer Lichtexposition eine Blindheit auf. Im zugehörigen Elektroretinogramm, welches die durch Belichtung erzeugten elektrischen Potentiale der Netzhaut aufzeichnet, zeigte sich als Korrelat statt eines anhaltenden (engl.: *sustained receptor potential*) nur ein transientes (engl.: *transient receptor potential*) elektrisches Potential. Das Protein, dessen Fehlfunktion für diese Auffälligkeit verantwortlich ist, wurde erst 20 Jahre später von Montell und Rubin identifiziert [171] und in Analogie hierzu TRP-Kanal genannt [172]. In den darauffolgenden Jahren wurden weitere verwandte Kanäle auch in Fadenwürmern, Hefen, Zebrafischen und später auch in Säugern – u.a. dem Menschen – identifiziert. Im Jahre 2002 wurde *TRP* dann namensgebend für die gesamte TRP-Kanal-Familie [172].

Ionenkanäle der TRP-Familie kommen sowohl in neuronalen als auch in nicht-neuronalen Zellen vor und sind vor allem an der Zellmembran lokalisiert [191]. Auf Grundlage der Aminosäuresequenz der TRP-Kanalproteine lassen sich die 31 verschiedenen TRP-Kanäle der TRP-Familie in sieben Unterfamilien einteilen – TRPC (canonical), TRPV (vanilloid), TRPM (melastatin), TRPP (polycystin), TRPML (mucolipin), TRPA (ankyrin transmembran protein) und TRPN (NompC-like) [191]. Bis auf letzteren sind alle TRP-Kanalfamilien in Säugetieren zu finden. Die phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen zeigt Abb. 1.4. Der TRPA1-Kanal, der Mittelpunkt dieser Arbeit ist, ist eines der eher spät entdeckten Mitglieder der TRP-Familie und derzeit einziger Vertreter seiner Unterfamilie [191].

Alle TRP-Kanäle besitzen 6 Transmembranhelices mit einer Porenschleife zwischen S5 und S6. Sie liegen ähnlich den spannungsabhängigen Kalium-Kanälen und CNG-Kanälen (engl.: *cyclic nucleotide gated*) vornehmlich als Homotetramere vor. Selten bilden sie aber auch Heterotetramere mit anderen Kanälen ihrer Familie (siehe Abb. 1.5) [103]. Der C- und N-Terminus des membranständigen Ionenkanals liegen jeweils intrazellulär und unterscheiden sich in Länge und Funktion zwischen den TRP-Unterfamilien [298]. Als trans-

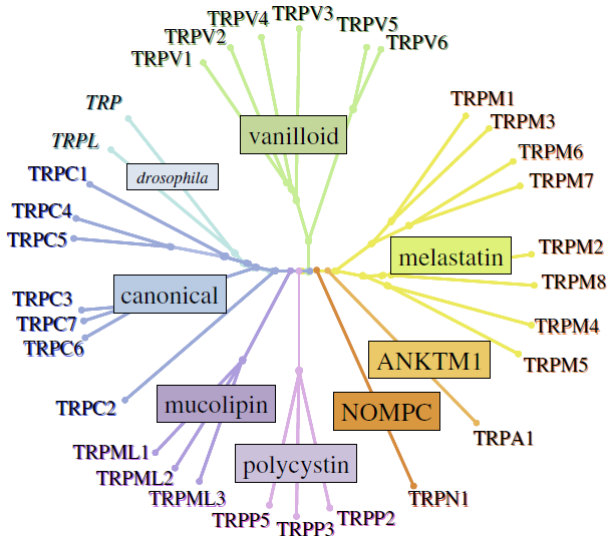


Abbildung 1.4: Die phylogenetische Verwandtschaft der TRP-Kanäle; aus [187]
Anhand der Kanal-kodierenden Basensequenz wird der phyogenetische Verwandtschaftsgrad der Kanäle bestimmt und grafisch dargestellt. In der Abbildung repräsentiert jeder Knoten hierbei eine Abspaltung vom nächst nahestehendsten Verwandten. Die großen Familien sind farblich voneinander abgehoben.

membrane Proteine sind sie am Kationenfluss vor allem von Ca^{2+}, aber auch anderen Ionen wie Na^{+}, Mg^{2+}, Rb^{+}, Cs^{+} und Li^{+} beteiligt [121].

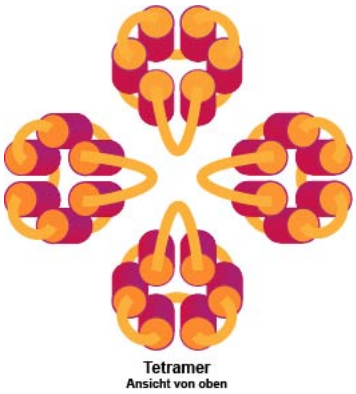


Abbildung 1.5: Homotetramere Anordnung von TRP-Proteinen in funktionellen Kanälen
Dargestellt sind stark vereinfacht 4 Protomere zu einem Homotetramer zusammengelagert. Jeder Kanal besitzt 6 Transmembranhelices und eine Porenschleife; Grafik erstellt in Anlehnung an [187]

Die Funktionen der verschiedenen TRP-Kanäle sind vielfältig, liegen aber meist im Bereich der Wahrnehmung. So sind zum Beispiel der Drosophila-TRP-Kanal beim Sehen, der TRPM5-, TRPA1- und TRPV1-Kanal beim Geschmack, der TRPC2-Kanal bei Geruch und der Pheromon-Wahrnehmung, der TRPV1- und TRPA1-Kanal bei der Chemosensorik, mehrere TRPC-Kanäle bei der Mechanorezeption, der TRPV1- und TRPA1-Kanal bei der Schmerzwahrnehmung und zuletzt die TRPV1-4-Kanäle sowie TRPM2–5, TRPM8, TRPA1 und TRPC5 an der Temperaturwahrnehmung beteiligt [57, 216, 23, 255, 183, 298, 267].

Neben Aufgaben im Bereich der Wahrnehmung, können Mutationen in TRP-Kanälen auch zu sogenannten Kanalopathien führen (siehe auch Tabelle 1.2) oder durch Mutation, Über- oder Unterexpression zur Tumorgenese oder -progression beitragen [244, 79, 67, 197]. Als Beispiel ist hier der TRPC6-Kanal zu nennen. Für den TRPC6-Kanal konnte eine Beteiligung an der VEGF-vermittelten Angiogenese gezeigt werden, wobei

VEGF als Wachstumsfaktor für Gefäße an der Einsprossung neuer Gefäße in die Tumormasse oft beteiligt ist [87].

TRP-Kanal	Kanalopathie
TRPC6	fokal segmentale Glomerulosclerose, FSGS [275]
TRPP2	polyzystische Nierenerkrankung [281]
TRPM4	Brugada-Syndrom [148]
TRPM6	Hypomagnesiämie mit sek. Hypokalziämie und Nephrokalzinose, FHHNC [133]
TRPML1	Mukolipidose Typ 4 [12]
TRPV4	Skapuloperoneale Form der spinalen Muskelatrophie und Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung Type 2C [10]
TRPA1	familiäres episodisches Schmerzsyndrom [135]
TRPA1	Cramp-fasciculation Syndromes, CFS /CRAMPT-Syndrom [193]

Tabelle 1.2: Übersicht über humane TRP-Kanalopathien
Ionenkanalerkrankungen beim Menschen welche durch eine Mutation eines TRP-Kanals entstehen.

TRP-Kanäle können auf vielfältige Arten aktiviert werden. So kann man unterscheiden in physikalisch gesteuerte, spannungsgesteuerte, Liganden-gesteuerte und sekundäre Boten-gesteuerte TRP-Kanäle. Zum Beispiel können der TRPN-Kanal in Drosophila oder auch der TRPC6-Kanal durch mechanische Reize geöffnet werden und diverse TRP-Kanäle durch thermische Reize wie zum Beispiel der TRPM8-Kanal durch Kälte oder der TRPV1-Kanal durch Hitze aktiviert werden [146, 255, 201, 162, 42, 298]. Der TRPM4 ist ein Beispiel für einen Liganden-gesteuerten Kanal, der u.a. für 6 % aller Patienten mit Brugada-Syndrom, einer Ionenkanalerkrankung des Herzens, verantwortlich ist [148]. Über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR) und konsekutiv Calcium ist der TRPM5-Kanal, der an der Geschmackswahrnehmung von süß und bitter beteiligt ist, ein Beispiel für einen sekundäre Boten-gesteuerten Ionenkanal [216]. Ebenfalls benötigen viele der TRPC-Kanalfamilie die Phospholipase C (PLC) oder die im Rahmen dieser Kaskade entstehenden Signalmoleküle zur Aktivierung. So spaltet die PLC Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) in der Zellmembran. Daraus entstehen Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) und 1,2-Diacylglycerine (DAG). Es wurden sowohl hemmende, aktivierende als auch regulierende Einflüsse von DAG, IP3, PLC und PKC bei verschiedenen TRP-Kanälen beschrieben. So werden z. B. der TRPC3-, der TRPC6- oder der TRPC7-Kanal direkt durch DAG aktiviert [97, 95, 262, 104].

1.3.2 Aufbau und Eigenschaften des TRPA1-Kanals

Erstbeschreibung Der TRPA1-Kanal ist derzeit der einzige Vertreter der TRPA-Familie [282] und wurde erstmalig 1998 von Schenker und Trueb beschrieben [222]. Sie identifizierten ihn auf DNA-Ebene als dauerhaft herunterreguliertes Genprodukt in entarteten Fibroblasten und in anderen mesenchymalen Tumoren. Aufgrund seiner vielen Ankyrin-Repeats bezeichneten Schenker *et al.* das zugehörige Protein als *ankyrin-like protein with transmembrane domains* (ANKTM1). 1999 konnten Jaquemar *et al.* anhand der Aminosäuresequenz zeigen, dass das Protein ähnlich den Kanälen der TRP-Familie aufgebaut ist [113]. Es wurde deshalb im Verlauf von ANKTM1 in TRPA1 umbenannt und der TRP-Familie zugeordnet [245].

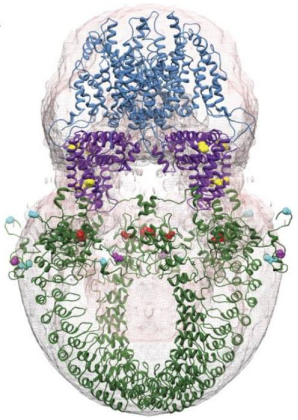
Klinische Bedeutung Der TRPA1-Kanal ist bisher vor allem im Bereich der Sinnes- und Schmerzwahrnehmung näher charakterisiert worden. So zeigten TRPA1-Knock-out-Mäuse zum Beispiel eine dramatisch verminderte nozizeptive Reaktion auf subkutan injizierte Reizstoffe wie Formaldehyd [154] (weiterführende

Literatur siehe [203, 30, 168]). Darüber hinaus wird auch eine Beteiligung an der Pathogenese von neuroinflammatorischen Erkrankungen wie der Migräne angenommen. Hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang, dass viele der den TRPA1-Kanal aktivierenden Substanzen auch Migräne-Attacken provozieren können (weiterführende Literatur: [185, 22]). Ebenfalls ist der TRPA1-Kanal an der Pathogenese des Asthmas beteiligt, welches auch eine inflammatorische Erkrankung ist und mit einer erhöhten NO-Produktion in der Lunge einhergeht [9]. Bei beiden letztgenannten Erkrankungen wird jeweils angenommen, dass die Erkrankung über auf Nervenzellen lokalisierte TRPA1-Kanäle vermittelt wird [9].

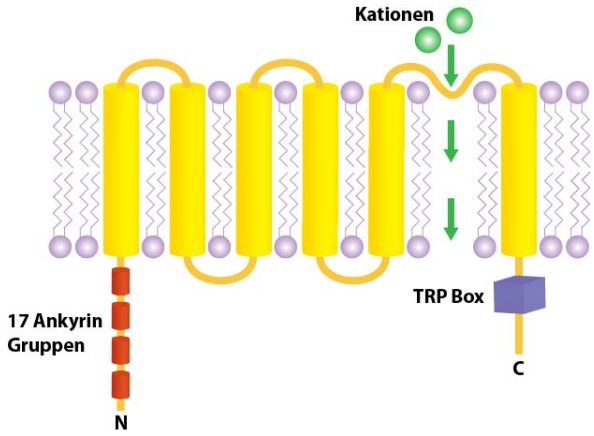
Vor dem Beginn des experimentellen Teils dieser Arbeit war wenig über eine Expression des TRPA1-Kanals außerhalb von Nervenzellen in Lungengewebe bekannt. Es ist jedoch bekannt, dass der TRPA1-Kanal auch in nicht-neuronalem Gewebe exprimiert wird – unter anderem in Ohr, Darm, Muskel, Gehirn, Haut, Pankreas, Lunge und in Herz und Gefäßen. Bei letzteren ist er z. B. an der Regulation des Gefäßtonus beteiligt [22, 185, 90, 18, 183, 177, 68]. Der Tatsache, dass der TRPA1-Kanal initial in nicht-neuronalem Tumorgewebe – nämlich entarteten Fibroblasten – beschrieben worden war, wurde lange wenig Beachtung geschenkt [222, 113]. Erst in jüngerer Zeit wird der TRPA1-Kanal auch wieder als ein an der Tumorgenese möglicherweise beteiligtes Protein und somit auch im nicht-neuronalen Kontext wahrgenommen [244, 197]. Bei Nierenkrebs und dem Nasopharynxkarzinom, zwei epithelialen Tumoren, scheint seine An- oder Abwesenheit auch deutlichen Einfluss auf die Prognose und das Überleben der Krebspatienten zu haben [197, 283]. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass der TRPA1-Kanal auch in nicht-neuronalen Zellen der Lunge exprimiert wird [221, 37]. Vor diesem Hintergrund ist eine Beteiligung an einer Lungentumorgenese denkbar.

Struktureller Aufbau Der Aufbau des TRPA1-Kanals ist maßgeblich verantwortlich für seine Funktion und Aktivierbarkeit, weshalb seine Struktur im Folgenden näher erläutert werden soll. Je nach Spezies zeigt der TRPA1-Kanal Unterschiede in der Aminosäuresequenz. Das humane TRPA1-Kanal-Protein besteht aus ca. 1119 Aminosäuren und ist 120-130 kDa schwer. Abbildung 1.6 zeigt schematisch den Aufbau des TRPA1-Kanals mit seinen sechs Transmembransegmenten (S1-S6) und einer Porenschleife zwischen S5 und S6 sowie eine 3D-Rekontruktion [59]. Er formt wie die meisten TRP-Kanäle Homotetramere. Der C- und N-Terminus des membranständigen Ionenkanals liegen beide intrazellulär. Namensgebend für den TRPA1-Kanal war der lange N-Terminus, der aus Ankyrin-Repeats besteht [187]. Über diese kann durch Interaktion mit anderen Substanzen über eine kovalente Cystein- und Lysin-Modifikation eine Aktivierung des Kanals erfolgen. Oft findet eine kovalente Modifikation z. B. durch reizende Stoffe wie Senföl oder ROS statt [153, 102, 15, 4]. Der Kanal ist vornehmlich permeabel für Ca^{2+}-Ionen, ist aber auch für andere Ionen u.a. Kalium, Caesium und Natrium durchgängig. Eine Aktivierung des Kanals führt zu einer Erweiterung der Kanalpore, durch die die genannten Kationen hindurch treten können [192, 121]. Das murine TRPA1-Kanalprotein unterscheidet sich in Teilen vom humanen TRPA1-Kanalprotein u.a. im Bereich seiner Transmembranhelices, was zu einer z. T. unterschiedlichen Responsivität gegenüber Aktivatoren oder Blockern führt. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass Menthol für den murinen TRPA1-Kanal in niedriger Konzentration einen Agonisten und in hohen Konzentrationen einen Antagonist darstellt. Im Gegensatz dazu ist Menthol beim humanen TRPA1-Kanal ein reiner Agonist. In Nicht-Säugetieren vermittelt Menthol gar keine Wirkung am TRPA1-Kanal [284, 46].

Agonisten Der TRPA1-Kanal wird von vielen Reizstoffen und zellschädigenden Substanzen aktiviert. Hierzu zählen sowohl Formalin, Senfgas, Tränengas wie z. B. Chloroacetophenon oder Dibenzoxazepin, Zwiebeln, Ozon oder Rauch-Inhaltsstoffe, als auch geschmacklich scharfe Substanzen wie Senföl, Ingwer, Zimt, Oregano oder Knoblauch [163, 242, 25, 17, 252, 16, 37, 119, 139, 263, 14]. Die meisten von ihnen sind zu einer kovalenten Modifikation von Cysteinen und Lysinen des Ankyrin-Repeat-reichen N-Terminus fähig. Des Weiteren führen auch potentiell zellschädigende Stimuli wie Kälte, mechanische Reize und eine Veränderung des



(a) Elektronenmikroskopische 3D-Rekonstruktion des mTRPA1-Kanalproteins; aus [59]



(b) Vereinfachte Darstellung des TRPA1-Kanals und seiner sechs Transmembranhelices; Grafik erstellt in Anlehnung an [187, 86, 192]

Abbildung 1.6: Aufbau des TRPA1-Kanals
zu (b) Grundstruktur des TRPA1-Kanals mit sechs Transmembrandomänen, einer Porenschleife zwischen dem 5. und 6. Transmembransegment, einem intrazellulärem N- und C-Terminus, einer evolutionär konservierten TRP-Box am C-Terminus, sowie ca. 17 Ankyrin-Repeats am N-Terminus

pH-Wertes zu einer Kanalaktivierung [174, 14, 245, 56, 255]. Durch eine Exposition mit diesen Stoffen oder Reizen kommt es meist zu typischen Reizreaktionen wie einem Tränen der Augen, Rhinorrhoe (Naselaufen), einem brennenden Gefühl auf den Schleimhäuten und starkem Husten. Ähnliche Symptome werden auch bei einer immunologisch-entzündlichen Reaktion wie bei allergischen Asthma, einem Infekt oder Entzündungen beobachtet, wenn es zur Ausschüttung von Entzündungsmediatoren kommt. Mehrere auf Tiermodellen basierte Studien konnten hierbei einen direkten Zusammenhang zwischen einer Reizreaktion und der Expression des TRPA1-Kanals zeigen, so dass man den TRPA1-Kanal als Sensor für körperschädigende Reize und Stoffe bezeichnen darf [176, 39, 108, 90]. Eine Inaktivierung des Kanals erfolgt vermutlich spannungsabhängig oder über intrazelluläres Calcium [266, 183].

Neben der oben genannten kovalenten Modifikation des N-Terminus gibt es noch einige Agonisten deren genauer Aktivierungsmechanismus noch nicht vollständig geklärt ist. Hierzu zählen z. B. Nifedipin, ein L-Typ Ca^{2+}-Kanal-Antagonist [75], Menthol [284] und Cannabinoide [119]. Eine allgemeine Auswahl an Agonisten zeigt Abb. 1.7.

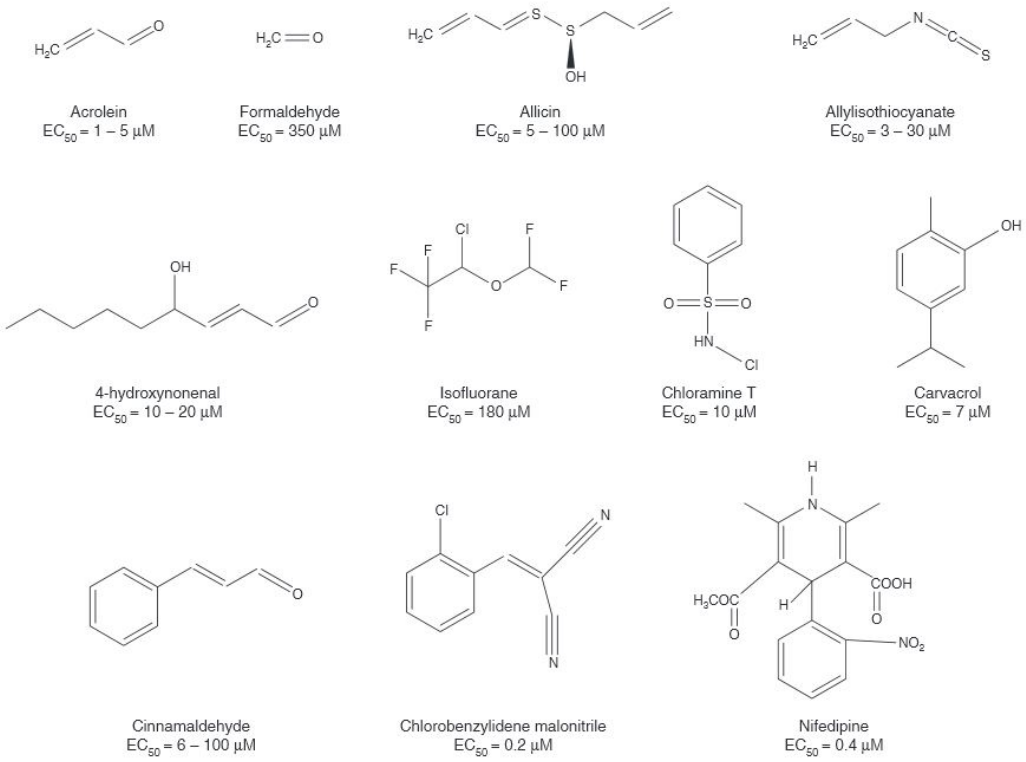


Abbildung 1.7: Chemische Struktur mehrerer TRPA1-Agonisten
Strukturformeln gängiger TRPA1-Agonisten [263]. Der EC 50-Wert gibt die effektive Stoffkonzentration an, bei der eine halbmaximale Aktivierung des TRPA1-Kanals erreicht wird. Niedrigere EC 50-Werte finden sich bei hochpotenten TRPA1-Agonisten.

In dieser Arbeit wurde Allylisothiocyanat (AITC), der aktive Inhaltsstoff des Senföls, verwendet. AITC wurde bereits 2004 als TRPA1-Agonist durch Jordt *et al.* beschrieben [119] und stellt einen etablierten, hoch spezifischen Agonisten dar. Man geht von einer Kanalaktivierung durch eine reversible, kovalente Modifikation des TRPA1-Kanalproteins durch AITC aus. AITC diffundiert hierbei vermutlich als elektrophiler Stoff durch die Membran und geht eine kovalente Bindung mit Thiolgruppen der Cysteine des N-Terminus ein [102].

1.4 ERK 1/2 als mögliches TRPA1-Effektorprotein

Die Aktivierung des TRPA1-Kanals durch einen TRPA1-Agonisten führt zu einer Öffnung des Kanals. Dies wiederum ermöglicht den Einstrom von verschiedenen Ionen in die Zelle, insbesondere von Calcium [121]. Calcium kann als Signalmolekül verschiedenste Signale in der Zelle vermitteln. Durch eine Veränderung des Membranpotentials oder die Bindung an weitere intrazelluläre Signalmoleküle können in der Zelle weitere Signalkaskaden angeschaltet werden und so Prozesse wie unter anderem Zellkontraktion, -migration, -wachstum oder -apoptose vermittelt werden [36, 107, 110].

Sollte der TRPA1-Kanal an einer Lungentumorgenese oder -progression beteiligt sein, so ist auch intrazellulär eine Aktivierung oder Suppression von zellulären Signalwegen über einen Calciumeinstrom des Kanals zu erwarten. Unter den möglichen Kandidaten stellt ERK1/2 (engl.: *extracellular signal-regulated kinase 1 and 2*) als ein zentrales Molekül für Proliferation, Zelldifferenzierung und -überleben von Krebszellen einen geeigneten Kandidaten dar [63]. Für SCLC-Zellen konnten mehrere Arbeitsgruppen ein ERK1/2-abhängiges Wachstum vor allem nach Stimulation durch neurosekretorische Peptidhormone zeigen [230, 202]. Für NSCLC ließ sich unter oxidativen Stress mit Wasserstoffperoxid eine ERK1/2-Phosphorylierung nachweisen [50]. Insgesamt kann die Familie der MAPKinasen von einer Vielzahl von Stimuli aktiviert werden u.a ultravioletter

Strahlung, osmotischem Stress, Temperaturveränderungen, proinflammatorischer Zytokine und Wachstumsfaktoren. Ähnlich vielfältig ist die Zahl möglicher ERK1/2-aktivierender Substanzen [274, 226]. Auch hier ergeben sich Überschneidungen mit dem TRPA1-Kanal als Sensor für zellschädigende Einflüsse, so dass eine TRPA1-abhängige ERK1/2-Aktivierung in Lungenzellen möglich erscheint.

ERK1/2 ist ein Vertreter der MAPK-Kaskade (engl.: *mitogen-activated protein kinase cascade*). Bei den Proteinen der MAPK-Familie handelt es sich um Serin/Threonin-Kinasen, welche ihrerseits über eine Phosphorylierung an Threonin- oder Tyrosinresten aktiviert werden [70]. MAPKinasen übersetzen eine große Bandbreite von extrazellulären Stimuli in intrazelluläre Antworten. Dies kann sowohl auf transkriptionaler als auch nicht-transkriptionaler Ebene geschehen. Die MAPKinase Familie spielt eine wichtige Rolle bei Zellwachstum, -differenzierung, -überleben, Zellzyklusregulation, sowie dem Rearrangement des Zytoskeletts und ist somit in die Pathogenese vieler Tumorarten involviert [226, 92, 63].

Initiiert wird die Aktivierung der MAPK-Kaskade typischerweise durch Rezeptor-Tyrosinkinasen, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren oder über Ionenkanäle [274, 49]. Zum Beispiel kann der TRPM7-Kanal die MAPK-Kaskade beeinflussen [49]. Daraufhin werden über Adapterproteine oder Ionen, welche Proteine in ihren aktiven Zustand versetzen können, weitere Mitglieder der Kaskade aktiviert, an deren Ende eine ERK1/2-Phosphorylierung steht (siehe Abb. 1.8). Das phosphorylierte ERK1/2 aktiviert wiederum durch Phosphorylierung weitere Proteine u.a. Transkriptionsfaktoren im Zellkern und vermittelt so z. B. Zellproliferation [202]. Das Ausmaß und die Dauer der ERK1/2-Aktivierung wird von der Zelle reguliert und Interaktionen oder eine Aktivierung über weitere Proteine außerhalb der MAPKinase Familie, wie z. B. PI3K/AKT oder die Familie der Src-Kinasen, sind bekannt [279, 300, 127, 274].

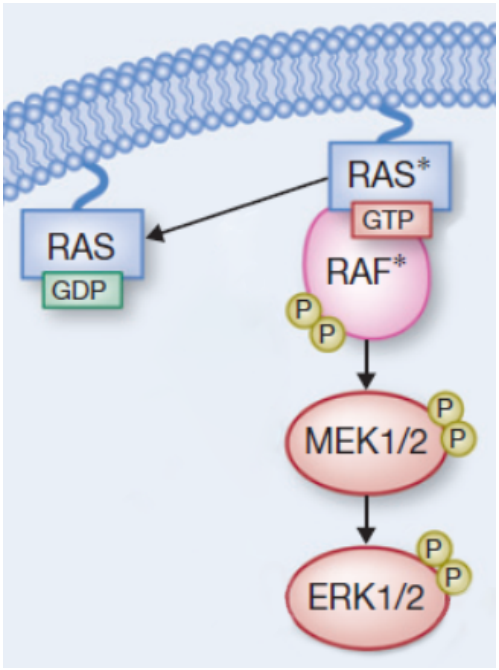


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung der MAPK-Kaskade; modizifiert aus [63]

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich vor allem mit dem am weitesten distal gelegenen Effektor der MAPK-Kaskade – ERK1/2. ERK1/2 liegt beim Menschen in zwei Isoformen vor – ERK1 und ERK2, welche sich strukturell zu 90 % ähneln und vermutlich auch funktionell ähnliche Aufgaben übernehmen. Streng genommen bezeichnet ERK1/2 das Gen der MAPKinase. Das Protein wird gemeinhin als p42/p44 bezeichnet [226]. Diese beiden Begriffe werden in der vorliegenden Arbeit synonym verwendet.

1.5 HEK293-Zellen als Modellsystem

Zur Untersuchung eines TRPA1-vermittelten Signalweges wurde ein nicht-neuronales Modellsystem anstelle eines endogen TRPA1-exprimierenden Zellmodells gewählt. Es ermöglicht TRPA1-abhängige Effekte durch Überexpression leichter zu erfassen und TRPA1-exprimierende direkt mit nicht-TRPA1-exprimierenden Zellen vergleichen zu können. Des Weiteren stellt NO ein radikales Signalmolekül dar, welches neben dem klassischen sGC-vermittelten Signalweg viele weitere mögliche Interaktionspartner hat, so dass eine Eingrenzung auf eine tatsächliche Interaktion mit dem TRPA1-Kanal in einem endogen TRPA1-exprimierenden Zellmodell nicht optimal möglich ist. Aus diesem Grund wurde mit einem nicht-neuronalen Zellmodell ohne endogene TRPA1-Expression gearbeitet, um die Effekte von NO und dem TRPA1-Kanal besser eingrenzen zu können.

Allgemein wird für ein Modellsystem eine gut zu kultivierende Zellreihe verwendet, die das zu untersuchende Protein nativ nicht exprimiert. In diese wird dann das zu untersuchende Protein – in diesem Fall der TRPA1-Kanal – eingeführt und überexprimiert. Diese Form des Überexpressionsmodells findet in der Kanalforschung regelmäßig Anwendung [64, 166]. In einem zweiten Schritt können die so gewonnen Erkenntnisse in ein endogenes Expressionssystem übertragen werden, um sie dort zu validieren. Diese Validierung im endogenen System ist notwendig, da es z. B. zu Interaktionen zwischen Molekülen im Modellorganismus kommen kann, welche eventuell im endogenen System nicht vorhanden sind.

Als Modellorganismus wurden HEK293-Zellen (engl.: *human embryonic kidney cells*) ausgewählt. Sie sind leicht kultivierbar und besitzen keine relevanten Mengen an endogen exprimierten TRPA1-Kanälen (siehe Abschnitt 4.1.2). Sie wurden 1977 durch Graham, Smiley, Russell und Nairn entwickelt und stammen aus den Nieren eines gesunden Feten eines Schwangerschaftsabbruchs, der mit dem humanen Adenovirus Typ 5 transfiziert wurde [91]. HEK293-Zellen zeichnen sich durch ihre breite Verfügbarkeit und Verwendung aus und sind allgemein gut transfizierbar [256]. Deshalb stellen sie als nicht-neuronale Zellreihe einen optimalen Ausgangspunkt für ein TRPA1-Modellsystem und zur Beantwortung der folgenden Fragestellungen dar.

2 Zielsetzung

Lungenkrebs gehört weltweit zu den führenden Ursachen für krebsbedingten Tod. Aufgrund seiner oft spät auftretenden Symptomatik, schnellen Wachstumsrate und seiner schnellen Chemotherapie-Resistenz ist ein kurativer Therapieansatz gerade beim SCLC nur selten möglich und die Prognose schlecht. Auch die krebsspezifische Mortalität bei NSCLC ist mit 80 % sehr hoch. Zur Generierung neuer Therapieansätze ist deshalb ein tieferes Verständnis der die Tumorprogression stimulierenden Faktoren und der intrazellulären Mechanismen der Tumorzellen wichtig. Gerade bei Lungenkrebszellen scheint NO einen relevanten Einflussfaktor auf die Tumoraggressivität darzustellen. Der TRPA1-Kanal, als Sensor für externe Reizstoffe und Inflammation, könnte in diesem Kontext ein mögliches Zielprotein von NO darstellen und an der Unterhaltung eines Lungentumorwachstums beteiligt sein. Zur Untersuchung möglicher Effekte auf eine Signaltransduktion in Lungentumorzellen wurde ein TRPA1-Zellmodel etabliert, das eine Unterscheidung TRPA1-anhängiger und TRPA1-unabhängier NO-vermittelter Effekte ermöglicht.

Ziel dieser Arbeit war:

- die Etabilierung einer stabilen TRPA1-HEK293-Zellmodellinie;
- der Nachweis eines funktionalen Kanals im Modellsystem unter Verwendung eines etablierten Agonistens
- die Untersuchung der NO-Freisetzung von NO-Donatoren und deren möglicher Agonismus auf den TRPA1-Kanal
- die Abgrenzung zwischen TRPA1-abhängigen und TRPA1-unabhängigen NO-vermittelten Effekten
- die Abklärung einer Beteiligung des klassischen NO-vermittelten Guanylylcyclase-abhängigen Signalweges
- die Aufklärung weiterer TRPA1-abhängiger Signalwege

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Name	Hersteller
Autoklav Varioklav H+P	Biomedis, Gießen
BioPhotometer plus	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank Heraeus	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
ChemiSmart 5100 Chemilumineszenzdetektion	Peqlab, Erlangen
Durchlichtmikroskop Olympus CKS41SF	Olympus, Hamburg
Durchlichtmikroskop Olympus IX71	Olympus
Feinwage L610 C	Sartorius, Göttingen
Heizblock HX-1	Peqlab, Erlangen
Mikrodosierspritze 25 µl	Hamilton, Schweiz
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio Rad
Mini Trans-Blot® Cell	Bio Rad
Multifunktions-Mikroplatten-Reader FLUOstar Omega	BMG LABTECH GmbH
pH-mV-Meter	Knick, Reutlingen
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann, Heilbronn
Pipetman Pinzetten 2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson Inc., Frankreich
Real-Time PCR System LightCycler® 480 II	Roche, Penzberg
Reinstwasseranalage Millipore	Merck, Darmstadt
Schüttelinkubator MaxQ 6000	Thermo Scientific, USA
Schüttler MS3 Basic	IKA, Staufen
Spannungsquelle peqPOWER 300	peqlab Biotechn.
Spannungsquelle Electrophoresis Power Supply EPS 301	GE Healthcare, Freiburg
Taumler Polymax 1040	Heidolph
ThermoCycler Primus 25	peqlab Biotechn.
Till Photonics Polychrome V Laser	Till Photonics
Schüttler (Vortex)	IKA
Waage	Satorius laboratory
Wasserbad WNE14	Memmert, Schwabach
Western Blot System	Amersham Biosciences
Wippe Duomax 1030	Heidolph
Zellkulturbank HERA safe	Thermo Scientific
Zentrifuge Heraeus Biofuge Stratos	Thermo Scientific
Zentrifuge Heraeus Labofuge 400	Thermo Scientific
Zentrifuge Heraeus Fresco 21	Thermo Scientific
Zentrifuge RC5C	Sorvall, Langenselbold

3.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Zellkultur, Kulturbehältnisse und Verbrauchsmaterialien	Hersteller
96-Well-Platte	Nunc
FLUOStar Omega Platte	BMG Labtech
GIBCO Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	life technology
liquid (High Glucose) 41966	Invitrogen
GIBCO Fetal Calf Serum (FCS; fötales Kälberserum) 10270	Invitrogen
GIBCO Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640), 52400	Invitrogen
GIBCO Trypsin - EDTA 25300	Invitrogen
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96	Roche
Nitrocellulosetransfermembran Protran	Whatman
Pasteurpipetten	Roth
Reaktionsgefäß 0,5, 1,5 ml, 2 ml, 15 ml & 50 ml	Sarstedt
Sechs-Well-Platte	Sarstedt
Zellkulturflasche 75 cm^3 (Tissue culture flask T25)	Sarstedt
Zellkulturschale 10 cm^3	Sarstedt
Zellschaber	Sarstedt

Aktivatoren und Inhibitoren	Hersteller	Konzentration	gelöst in:
AG 1296	CalBiochem, Merck	10 mM	DMSO
AG 1478	CalBiochem, Merck	100 µM	DMSO
AG 17	CalBiochem, Merck	10 mM	DMSO
AITC	Sigma-Aldrich	10 M	-
BIM	Sigma-Aldrich	1 mM	DMSO
H-(1,2,4) oxadiazolo (4,3-a)quinoxalin-1-one (ODQ)	Sigma-Aldrich	10 mM	DMSO
KN93	Sigma-Aldrich	10 mM	
LY-294002	Sigma-Aldrich	10 mM	DMSO
MAHMA NONOate	Sigma-Aldrich	10 mM	NaOH
PF-431396	Sigma-Aldrich	1 mM	DMSO
PMA	Sigma-Aldrich	10 mM	DMSO
PP2	Sigma-Aldrich	10 mM	DMSO
Rp-8-Br-cGMPS	BIOMOL intern. inc.	15 mM	H_2O
Rutheniumrot (RR)	Sigma-Aldrich	10 mM	-
SIN-1	Sigma-Aldrich	10 mM	H_2O
U73122	Sigma-Aldrich	5 mM	DMSO
W7	Sigma-Aldrich	50 mM	
Wortmannin	Sigma-Aldrich	10 mM	DMSO
Zeocin	ThermoFischer	88 mM	-

Molekularbiologische Reagentiensysteme	Hersteller
FuGENE® 6 Transfection Reagent	Roche
LightCycler® FastStart DNA Master plus SYBR Green I Kit	Roche
NucleoBond® Xtra Midi Kits	Clontech
PromoFectin Transfection Reagent	PromoKine
RevertAid™H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas
SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	ThermoFischer Scientific
SuperSignal™ West Pico Maximum Sensitivity Substrate	ThermoFischer Scientific
Tri Reagent®	Applied Biosystems

Antikörper	Hersteller	Konzentration
Anti-pERK (E-4) IgG sc-7383, aus Mouse, gg Tyr 204 (h)	Santa Cruz Biotech.	1:500
Anti-ERK1/2 (K-23) IgG sc-153, aus Rabbit, gg subdomain XI (r)	Santa Cruz Biotech.	1:1000
Anti- ANKTM1 IgG_1sc-166469, aus Mouse	Santa Cruz Biotech.	1:500
Anti-Mouse A2554	Sigma-Aldrich	1:5000
Anti-Rabbit A6154	Sigma-Aldrich	1:5000

Oligonucleotide/Primer	Sequenz
TRPA1 right	5'-GAG AGC GTC CTT CAG ATT CG-3'
TRPA1 left	5'-TCA CCA TGA GCT AGC AGA CTA TTT-3'
beta-Aktin right	5'-CCA GAG GCG TAC AGG GAT AG-3'
beta-Aktin left	5'-CCA ACC GCG AGA AGA TGA-3'
mTRPV1 right	5'-CCT GCA GGA GTC GGT TCA-3'
mTRPV1 left	5'-CAG CAG CGA GAC CCC TAA-3'

Zellinien	ATCC	Spezies	Herkunft	Morphologie	Teilungs-zeit	Bezugsquelle
HEK293	CRL-1573	Homo sapiens, Fetus	embryonale Niere	adhärente Zellen	24-36 h	Dr. Andreas Breit, Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie München
H69	HTB-119	Homo sapiens, Erwachsener	Lunge	schwimmende Aggregate	30 h	Medizinische Klinik für Hämotologie und Onkologie, Universitätsklinikum Giessen & Marburg

3.1.3 Hergestellte Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Inhalt
4x Tris x HCl/SDS pH 6,8	0,5 M Tris-HCl; 0,4 % SDS (w/v)
4x Tris x HCl/SDS pH 8,8	1,5 M Tris-HCl; 0,4 % SDS (w/v)
HBS-Ca^{2+}-Glucose	140 mM NaCl; 5 mM KCl; 1 mM MgCl2; 1 mM HEPES; 2 mM $CaCl_2$; 0,1 % Glucose; pH 7,4
Lämmli-Puffer	125 mM Tris x HCl/SDS pH 6,8; 20 % Glycerol (v/v); 4 % SDS (w/v); 2 % beta-Mercaptoethanol (v/v); 10 µg/ml Bromphenolblau
Laufpuffer	250 mM Tris (pH 6,8); 1,92 Glycin, 1 % SDS (w/v);
PBS	137 mM NaCl; 8,1 mM Na_2HPO_4x H_2O; 2,7 mM KCl; 1,47 mM $KHPO_4$; pH 7,4
PBS + Tween	PBS + 0,1 % Tween (v/v)
Sammelgellösung	3,9 % Acrylamid (v/v); 118 mM Tris x HCl/SDS pH 6,8; 0,045 % TEMED (v/v); 30 mg/l APS
Stripping-Puffer	25 mM Tris x HCl/SDS pH 8,2; 2 % SDS (v/v); 60 mM beta-Mercaptoethanol
TBS	20 mM Tris; 150 mM NaCl; pH 7,6
Transferpuffer	25 mM Tris; 191 mM Glycin; 20 % Methanol (v/v);10 % SDS (w/v)
Trenngellösung 9 %	9 % Acrylamid (v/v); 375 mM Tris x HCl/SDS pH 8,8; 0,045 % TEMED (v/v); 30 mg/l APS

3.1.4 Software

Name	Hersteller
Adobe Illustrator CS6	Adobe Systems, San José, USA
Adobe InDesign CS5 & CS6	Adobe Systems, San José, USA
Adobe Photoshop CS5 & CS6	Adobe Systems, San José, USA
ChemiCapt	Peqlab, Erlangen, Deutschland
LightCycler	Roche, Basel, Schweiz
LyX	Matthias Ettrich, Free Software Foundation, Boston, USA
Microsoft Exel 2010	Microsoft, Washington, USA
Prism	GraphPad Inc. La Jolla, USA
Reader Control (FLUOstar Omega)	BMG LABTECH, Ortenberg, Deutschland
ChemSketch	Advanced Chemistry Developement Inc, Toronto, Kanada
TILLvisION	FEI Munich GmbH, Gräfelfing, Deutschland
Image Studio Lite Version 5.2	Li-Cor, Lincoln NE, USA
SPSS Statistics 20	IBM, Armonk, USA

3.2 Zelllinien und Zellkultur

3.2.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 75 cm^3 Kulturflaschen in einem Brutschrank bei 37 °C und 95 %iger Luftfeuchtigkeit in einem 5 %igen-CO_2-in-Luft-Gemisch. Alle Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen innerhalb einer Laminar-Air-Flow-Zellkulturbank.

3.2.2 H69-Zellen

Bei H69-Zellen handelt es sich um Zellen eines Kleinzelligen Lungenkarzinoms. Diese Zellen wachsen in Form kleiner, nicht-adhärierender Zellaggregate in Suspension und weisen eine Verdoppelungszeit von etwa 30 Stunden auf. Die H69-Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. Jaques, Medizinische Klinik für Hämotologie und Onkologie des Universitätsklinikum Giessen und Marburg (Direktor: Prof. Dr. A. Neubauer) zur Verfügung gestellt (ATCC HTB-119).

Als Zellkulturmedium wurde 10 %iges (v/v) FCS (engl.: *fetal calf serum*) in RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640, Fa. Invitrogen) verwendet. Ein Mediumwechsel wurde ca. 2-3 mal pro Woche durchgeführt. Bei jeweils der dritten Passage wurden die Zellen in eine neue Flasche überführt. Dabei dienten 75 cm^3 Zellkulturflaschen und Sechs-Well-Platten als Zellkulturgefäße. Auf eine Zugabe von Antibiotika in die Kulturflaschen wurde verzichtet.

Zur längeren Aufbewahrung im Sinne einer Kryokonservierung wurden die Zellen in einer Lösung aus 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in FCS bei -80 °C und dann in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

3.2.3 HEK293-Zellen

Die HEK293-Zellen sind mit dem Ad5-Virus transformierte humane embryonale Nierenzellen. Dabei handelt es sich um relativ schnell wachsende, adhärente Zellen, die eine Verdoppelungszeit von 24-36 Stunden aufweisen [91]. Die HEK293-Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. Andreas Breit, Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie München zur Verfügung gestellt (ATCC CRL-1573).

Als Zellkulturmedium wurde 10 %iges (v/v) FCS in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, GIBCO) verwendet. Ein Mediumwechsel bzw. das Splitten der Zellen wurde ca. dreimal wöchentlich durchgeführt. Bei jeweils der dritten Passage wurden die Zellen nach Resuspendierung mittels 3 ml Trypsin für 3-5 min zentrifugiert (600 rpm, 6 min, RT, Zentrifuge Heraeus Labofuge 400) und mit frischem Medium in eine neue Flasche überführt. Als Zellkulturgefäße dienten 75 cm^3 Zellkulturflaschen, 10 cm^3 Zellkulturschalen und Sechs-Well-Platten. Die antibiotikafreie Kultivierung erfolgte wie unter 3.2.2 beschrieben. Zur Kryokonservierung wurden die Zellen in einer Lösung aus 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in FCS bei -80 °C und dann in flüssigen Stickstoff aufbewahrt.

3.2.4 Transfektion von Zellen

Zur Transfektion von HEK293-Zellen mit TRPA1-tragendem Plasmid wurden die Zellen am zweiten Tag nach ihrer Aussaat auf Sechs-Well-Platten mit FuGENE oder Promofektin nach Angaben des Herstellers transfiziert. Dabei wurden für die ersten Versuchsreihen 0,5 - 4 µg, später ausschließlich 1 µg Plasmid-DNA des hTRPA1 und des mTRPA1 pro Well zusammen mit dem Transfektionsreagenz ins zellhaltige Medium gegeben. Es erfolgte immer ein Mediumwechsel nach 4-6 Stunden mit anschließender Weiterverarbeitung. Die verwendeten Plasmide sind in Abbildung 6.1 & 6.2 im Anhang zu finden. Bei hTRPA1 handelt es sich um ein Plasmid, welches für den humanen TRPA1-Kanal kodiert, bei mTRPA1 um den murinen (=von der Maus stammend) Kanal. Beide Plasmide enthalten neben hTRPA1 oder mTRPA1 auch kodierende Bereiche für ein grün fluoreszierendes Protein (GFP), welches dem gleichen Promoter wie der kodierte Kanal untergeordnet ist, so dass es zusammen mit dem TRPA1 abgelesen und produziert wird. Dies macht einen indirekten, mikroskopischen Nachweis der Expression von TRPA1-Kanälen möglich.

3.2.5 Stimulationsbedingungen

Stimulationsversuche wurden immer über drei Tage durchgeführt. Am ersten Tag wurden die Zellen ausgesät, am zweiten auf FCS-freies Medium gewechselt, nachdem zuvor ggf. die Zellen mit dem murinen oder humanen TRPA1-Kanal transfiziert wurden (siehe Abschnitt 3.2.4). Am dritten Tag fand die eigentliche Stimulation mit der jeweiligen Substanz statt.

An Tag 1 wurden adhärente Zellen mittels 3 ml Trypsin (3-5 min Inkubation bei 37 °C) abgelöst und mit 12 ml Medium + 10 % (v/v) FCS resuspendiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde auf eine Sechs-Well-Platte gegeben (0,5 - 1,5 ml pro Well je nach benötigter Zellmenge), mit Medium + 10 % (v/v) FCS auf 2 ml pro Well aufgefüllt, in zwei Ebenen geschwenkt und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C bebrütet.

Die angewachsenen Zellen wurden an Tag 2 ggf. mit FuGENE oder PromoFectin transfiziert und am späten Nachmittag in 1,5 ml FCS-freies Medium überführt und wieder über Nacht inkubiert. Die Kultivierung der Zellen in FCS-freiem Medium erfolgte um Protein-Phosphorylierungsprozesse durch FCS, welches u.a. viele Wachstumsfaktoren enthält, zu vermeiden. Für RNA-Analysen wurden die Zellen über Nacht in FCS-haltigem Medium inkubiert.

An Tag 3 erfolgte die Stimulation. Bei Verwendung von Inhibitoren wurden diese 30 min vor Stimulation zugegeben, um eine sichere Inhibition zu gewährleisten und eigene kurzfristige Effekte der Inhibitoren nicht abzubilden. Die Beendigung der Stimulation erfolgte nach Absaugen des Mediums durch Zugabe von 200-500 µl zweifachen Laemmli Puffer zur Analyse der Proteinphosphorylierung oder durch 1 ml Tri-Reagent zur RNA-Analyse [137]. Die so erhaltenen Lysate wurden mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst, in 1,5 ml- bzw 2 ml Reaktionsgefäße überführt und bei -18 °C gelagert. Eine Auswertung der Laemmli-haltigen Lysate erfolgte mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 3.8), die der Tri-haltigen mittels RT-qPCR (siehe Abschnitt 3.7).

3.3 Stabile Transfektion einer HEK239-Zellreihe mit hTRPA1

Zur Generierung einer stabilen hTRPA1-positiven Zellreihe wurden HEK293-Zellen zusätzlich zum hTRPA1-tragenden Plasmid mit einem Zeocin-Resistenz-tragenden Plasmid transfiziert. Hierbei wurde mit verschiedenen Verhältnissen von Plasmid-DNA zu Zeocin-Resistenz-Plasmid selektioniert.

Die Zellen wurden wie in Abschnitt 3.2.4 beschrieben mit insgesamt je 4 µg Plasmid-DNA pro Well transfiziert. Hierbei war das Verhältnis von Zeocin-Resistenz- zu hTRPA1-Plasmid jeweils 1:2, 1:5 und 1:10. Die Versuche wurden jeweils in zweifacher Ausführung mit zusätzlich zwei untransfizierten Wells zur Kontrolle durchgeführt. Fünf Stunden nach Transfektion wurde ein Mediumwechsel mit FCS-haltigem DMEM durchgeführt. Am nächsten Tag wurde mit der Selektion begonnen. Hierbei wurden die Wells mit gleichen Transfektionsverhältnissen je mit einer Zielkonzentration von 50 oder 100 µg/ml Zeocin in DMEM pro Well behandelt. Ein Zeocin-haltiger Mediumwechel erfolgte täglich. Die Zellreihe, welche 1:10 transfiziert und mit 100 µg/ml Zeocin selektioniert wurde, wies im Verlauf das beste Wachstum auf. Unter Fluoreszenzmikroskopie (siehe Abschnitt 3.5) wies die Zellreihe eine deutliche Fluoreszenz als Folge einer erfolgreichen Transfektion auf. Die Zellreihe wurde kryokonserviert (siehe Abschnitt 3.2.3)

3.4 Aufreinigung von Plasmid-DNA

Zur Vervielfältigung von der unter Abschnitt 3.2.4 beschriebenen Plasmide wurde das jeweilige Plasmid in E.coli Bakterien eingebracht. Beide Plasmide kodieren für eine Sequenz, welche den transfizierten Bakterien zu einer Ampicillin-Resistenz verhilft. Eine Kultivierung der Bakterien im Brutschrank erfolgte unter einem Selektionsdruck mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml Ampicillin, um Bakterien, die ihr Plasmid bei der Zellteilung verloren haben, an der weiteren Vermehrung zu hindern. Anschließend wurde mittels des NucleoBond® Xtra Midi Kits nach Angaben des Herstellers eine Extraktion der Plasmid-DNA durchgeführt.

3.5 Nachweis einer erfolgreichen Transfektion mittels Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Um erfolgreich transfizierte Zellen detektieren zu können, wurde unter dem Mikroskop eine Fluoreszenz der transfizierten HEK293-Zellen nachgewiesen. Das transfizierte Plasmid kodiert neben dem TRPA1-Kanal auch für das Grün-fluoreszierende Protein (engl.: *green fluorescent protein*, GFP). Dieses 1961 in der Qualle *Aequorea victoria* entdeckte Protein fluoresziert grün unter Anregung mit Licht der Wellenlänge 480 nm und wurde zusammen mit dem TRPA1-Kanal in die Zellen transfiziert [233]. Kommt es zu einem Leuchten der Zelle nach Anregung des GFP, darf davon ausgegangen werden, dass eine Transfektion erfolgreich war und diese Zellen auch TRPA1-Kanäle tragen. Da das GFP aber nicht an den Kanal gekoppelt ist, ist es im gesamten Zytosol und nicht wie der Kanal nur an der Plasmamembran lokalisiert nachweisbar. Dadurch emittiert die gesamte Zelle diffus Licht nach Anregung (siehe auch Abb. 6.1 & 6.2 im Anhang).

Die Zellen wurden für den Nachweis unter dem Mikroskop auf einen Objektträger ausgesät und über Nacht in FCS-haltigen Medium inkubiert. Zur Darstellung wurde ein Olympus IX71 Mikroskop verwendet. Die regelmäßig befeuchteten Objektträger wurden von einem Laser (Polychrome V) mit einer Wellenlänge von 498 nm über 100 ms angeregt. Eine Aufzeichnung erfolgte über TILLvisION. Mittels Photoshop wurden Licht- und Fluoreszenzbild übereinandergelegt.

3.6 Fluometrische NO-Messung mittels DAF-2 DA

Die grundsätzliche Aktivierbarkeit von TRPA1-Kanälen durch NO wurde mit NO-Donatoren untersucht. Zum Nachweis der Freisetzungsgeschwindigkeit der zwei in dieser Arbeit verwendeten NO-Donatoren wurde

der fluometrische Nachweis von NO mittels der von Kojima *et al.* entwickelten Substanz Diaminofluorescein-2 (DAF-2) geführt [129]. Diese ist in der Lage NO nachzuweisen. In Form des DAF-2 DA ist sie membrangängig, so dass auch intrazellulär freigesetztes NO erkannt werden kann. Oxidierte Formen von NO als auch reaktive Sauerstoffspezies wie H_2O_2, and $ONOO^-$reagieren nicht mit DAF-2 zum fluoreszierenden DAF-2 T. Abbildung 3.1 zeigt die Reaktion von DAF-2 mit NO und Sauerstoff.

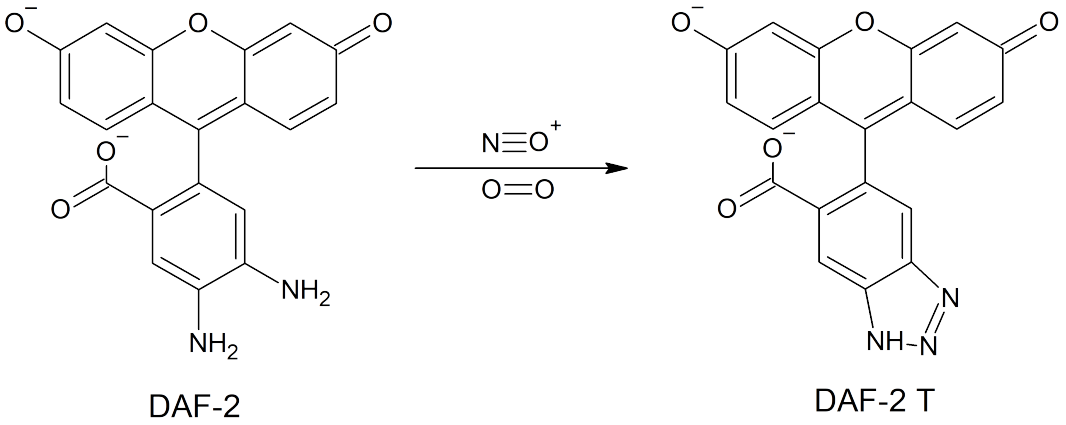
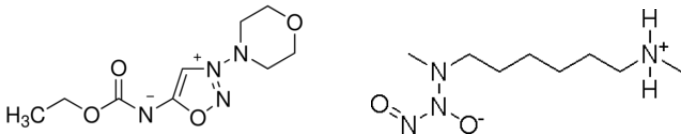


Abbildung 3.1: Reaktion von DAF-2 mit NO und Sauerstoff zu fluoreszierendem DAF-2 T; frei erstellt in Anlehnung an [129]

Zur Durchführung wurde DAF-2 DA in einer Endkonzentration von 5 µM in eine 10 cm^3 Zellkulturschale mit HEK293-Zellen gegeben und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Wie in 3.2.3 beschrieben werden die Zellen dann abgelöst, in einer HBS-Ca^{2+}-Glucose Lösung resuspendiert, auf eine FLUOStar-geeignete Platte ausgesät (180 µl/Well) und dann in den FLUOStar zur fluometrischen Messung eingelegt. Alle Arbeitsschritte werden nach Möglichkeit in Dunkelheit ausgeführt, um ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu verhindern, ebenso bei dessen Herstellung [129].

In der Zwischenzeit werden die NO-Donatoren in der für den Versuch nötigen Konzentration verdünnt. Als NO-freisetzende Stoffe wurden die beiden Substanzen SIN-1 (Molsidomin) und MAHMA NONOate verwendet. Beide Strukturformeln sind in Abb. 3.2 dargestellt. SIN-1 wurde in einer Endkonzentration von 100 µM und MAHMA NONOate in einer Endkonzentration von 10 µM und 50 µM verwendet. Eine Stocklösung von 100 mM SIN-1 wurde in Wasser angesetzt und bis unmittelbar vor Gebrauch bei -20 °C tiefgefroren. MAHMA NONOate setzt bei pH-Werten unter 8,0 NO frei. Deshalb wurde es in einer 10 mM NaOH-Lösung angesetzt, gekühlt gelagert und innerhalb von 72 h aufgebraucht. Da MAHMA NONOate, wie erwähnt, bei pH-Werten unter 8,0 NO freisetzt, führt die im Rahmen der Versuche erfolgte Zugabe von MAHMA NONOate zum Zellmedium, welches einen pH-Wert von 7,0-7,4 hat, demnach zu einer NO-Freisetzung.



(a) SIN-1 **(b) MAHMA NONOate**

Abbildung 3.2: Strukturformeln der NO-Donatoren SIN-1 (a) und MAHMA NONOate (b)
Quelle: www.sigmaaldrich.com

Die fluometrische Messung und Auswertung erfolgte mit einem Spektrofluorimeter (FLUOStar Omega) und der zugehörigen Software. Es wurde jeweils Messungen mit einem unbehandelten Well, einem Well mit ausschließlicher Zugabe der Trägerlösung, sowie mit SIN-1 oder MAHMA NONOate in verschiedenen

Konzentrationen durchgeführt. Die Messintervalle wurden an die Freisetzungsgeschwindigkeit der Substanzen angepasst. Eine Anregung (Exzitation) erfolgte bei einer Wellenlänge von 488 nm, die Messung der Emission bei einer Wellenlänge von 515 nm. Eine Messung erfolgt jeweils auf einer vom Messgerät vorgegebenen Skala von 0 bis 250000. Über den Verstärkungsfaktor (engl.: *gain*) kann die Schrittgröße dieser Messskala angepasst werden. Für die Versuche wurde der Verstärkungsfaktor jeweils an die Freisetzungsstärke des Substrates angepasst. Ein einheitlicher Verstärkungsfaktor über alle Substanzen war hierbei nicht möglich. Im Übrigen wurden die Standard-Einstellungen des Gerätes belassen.

Bei jedem Versuch wurde zusätzlich die Basalfluoreszenzkurve (unbehandelt bzw. mit Trägersubstanz) bestimmt. Für die Berechnung der Fluoreszenzkurven wurde der Fluoreszenzanstieg ins Verhältnis zum Basalwert gesetzt. Die Messungen ergaben eine Sättigungskurve, da bei ausreichender NO-Zufuhr irgendwann alle DAF-2-Moleküle in die fluoreszierende Form übergehen.

Die NO Messungen wurden mindestens drei Mal mit verschiedenen Zellkulturplatten durchgeführt.

3.7 Analyse der TRPA1-Expression auf RNA-Ebene

Zur Analyse der in Zellen exprimierten RNA von TRP-Kanälen wurde eine Analyse dieser mittels einer Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) durchgeführt. Eine Quantifizierung erfolgte anschließend über den Vergleich des Expressionslevels des jeweiligen Kanals mit dem in der Zelle enthaltenen β-Aktins. Von β-Aktin als sog. "*house keeper*"-Gen wird angenommen, dass es in konstanten Mengen vorhanden und unbeeinflussbar von den Expressionsleveln der TRP-Kanäle ist. Beim Verfahren der RT-qPCR wird der eigentlichen PCR noch eine Umschreibung von RNA in cDNA mittels Reverser Transkriptase vorangestellt. Dieser Schritt wurde in der vorliegenden Arbeit der eigentlichen PCR separat vorangestellt.

3.7.1 Allgemeine Arbeitsbedingungen

Da ubiquitär vorkommende Ribonukleasen (kurz: RNAsen) aus Zellen isolierte RNA zerstören können, wurden alle Arbeiten mit Handschuhen und mit RNAse-freien Reagentien durchgeführt. Zur Herabsetzung der RNAse-Enzymaktivität wurde bis zur Zugabe eines RNAse-Inhibitors unter gekühlten Bedingungen (z. B. auf Eis gelagerte Proben etc.) gearbeitet. Für die Versuche wurde des Weiteren Diethylpyrocarbonat-H_2O (DEPC) verwendet. DEPC ist ein Stoff, der RNAsen vor allem durch kovalente Modifikation an Histidinresten inaktivieren kann. Zur Herstellung von DEPC-H_2O wurde DEPC 1:1000 (v/v) in Wasser verdünnt, über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und am nächsten Tag autoklaviert. Dadurch wird DEPC zu H_2O, CO_2 und Ethanol abgebaut und nimmt so keinen weiteren Einfluss mehr auf kommende Versuche. Man erhält reines RNAse-freies Wasser.

3.7.2 RNA-Isolierung

Bevor die RNA-Menge in den Zellen mittels RT-qPCR ermittelt werden kann, muss RNA aus den Zellen gewonnen werden.

Das für die RNA-Isolierung verwendete "Tri Reagent®" enthält Guanidinthiocyanat (GTC) und Phenol. GTC, als chaotropes Salz, denaturiert Proteine und inaktiviert RNAsen. Phenol denaturiert die Proteine ebenfalls und entfernt diese aus der polynukleotidreichen Phase des Zelllysats.

Den 1 ml-Tri-Reagent-haltigen Zelllysaten (siehe Abschnitt 3.2.5) wurde in Anlehnung an die Single-Step-Methode von Chomczynski *et al.* 200 µl Chloroform zugegeben [54]. Nach ausgiebigem Schütteln und zentrifugieren (3000x g 15 min 4 °C) bildeten sich drei Phasen aus. Proteine sind dabei in der untersten organischen, DNA in der schmalen intermediären und RNA in der obersten wässrigen Flüssigkeitsphase zu

finden. Zu den 400 µl, die aus der RNA-reichen Phase entnommen wurden, wurden ebenso viel Mikroliter Isopropanol zugegeben und leicht über Kopf geschwenkt. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt (14000 rpm 20 min 4 °C Zentrifuge Heraeus Fresco 21, Fa. Thermo Scientific) setzt sich die ausgefallene RNA als Pellet auf dem Reaktionsgefäßboden ab. Nach dreimaligem Waschen mit 75 %igem Ethanol (schütteln, zentrifugieren: 14000 rpm 20 min 4 °C Zentrifuge Heraeus Fresco 21, Fa. Thermo Scientific) und Abschütten der Flüssigkeit wurde das Pellet an der Luft getrocknet, anschließend in DEPC-H_2O resuspendiert und bei -18 °C gelagert.

Bei der photometrischen Bestimmung der RNA-Konzentration wurde anschließend die Reinheit der Probe überprüft. Die Reinheit der Probe wird durch einen Extinktionsquotienten von 260 nm/ 280 nm, also dem Verhältnis der Extinktion der Absorptionsmaxima von RNA zu DNA, angezeigt. Ein Quotient zwischen 1,8 und 2,0 spricht für eine vornehmlich RNA-haltige Probe.

Lag eine RNA-haltige Probe vor, erfolgte die Umschreibung in cDNA. Zur Vorbereitung für die Umschreibung wurden 2 µg RNA in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und auf 11 µl mit DEPC-H_2O aufgefüllt. Mit diesem Schritt wurden alle Proben auf die gleiche RNA-Gesamtmenge normiert.

3.7.3 Quantitative Real-time Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion

Die quantitative Real-time Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion (real-time RT-qPCR) wurde in zwei Schritten durchgeführt. Zuerst erfolgte ein Umschreiben von RNA in cDNA mittels Reverser Transkriptase, anschließend wurde eine real-time PCR durchgeführt. Der Nachweis der PCR-Endprodukte erfolgte mittels Fluoreszenz.

3.7.3.1 Reverse Transkription in cDNA Zur Erzeugung von DNA aus RNA ist eine sogenannte "Reverse Transkriptase" nötig. Das Molekül wurde 1972 von H. M. Temin und D. Baltimore in Retroviren entdeckt. RNA-Viren wie z. B. das HI-Virus nutzen es, um ihre RNA in DNA umzuschreiben, damit diese von der Wirtszelle abgelesen wird. Die durch die Reverse Transkriptase erhaltene DNA wird nun cDNA, also *complementary DNA*, genannt, weil der zur RNA komplementäre Strang als DNA vorliegt [254, 239, 13].

Für die Synthese wurde ein Oligo$(dT)_{18}$-Primer verwendet, der den Poly-A-Schwanz der mRNA erkennt. Dadurch wurde die Gesamt-RNA nochmals auf mRNA selektioniert, welche nur 2 % der Gesamt-RNA ausmacht [2]. Dabei werden zwar auch RNAs mit A-reichen Sequenzen selektiert und mRNAs ohne Poly-A-Schwanz aussortiert, es ist aber dennoch derzeit eine etablierte Methode um mRNAs zu selektionieren.

Die Umschreibung erfolgte mit dem RevRevertAid^{TM} First Strand cDNA Synthesis Kit nach Angaben des Herstellers. Den Standardansatz dieses Kits zeigt Tabelle 3.1.

Tabelle 3.1: "RevertAid^{TM} H Minus First Strand cDNA Synthesis"-Kit: Inhaltsstoffe und verwendete Mengen

Reagenz	Volumen/Probe (µl)	Endkonz. (µM)
Oligo$(dT)_{18}$Primer	1	100 µM
5-fach Reaktionspuffer	4	250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 250 mM KCl, 20 mM MgCl2, 50 mM DTT
RNAse Inhibitor	1	20 U/µl
dNTP	2	10mM
Reverse Transkriptase	1	200 U/µL

Zu den 2 µg der RNA-Probe wird der Oligo$(dT)_{18}$Primer gegeben und nach kurzem Zentrifugieren für 5 min bei 70 °C im ThermoCycler inkubiert (*Denaturierung*). Anschließend wurde die Probe für eine Minute auf Eis gekühlt. Im nächsten Schritt wurden dem RNA-Ansatz die zuvor vermischten Reagentien 5-fach Probenpuffer, RNAse-Inhibitor und dNTPs zugefügt, die Reverse Transkriptase zugegeben und der Ansatz

im ThermoCycler inkubiert (4 min auf 22 °C). Dabei binden die Primer an die Proben-RNA (*Annealing*). Zuletzt erfolgte für eine Stunde bei 42 °C die cDNA-Synthese durch die Reverse Transkriptase (*Elongation*). Die Proben wurden anschließend bei -18 °C gelagert.

3.7.3.2 Polymerasekettenreaktion Mit der 1983 von Kary Mullis (damals noch mit E.coli Polymerase I) entwickelten Methode der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaktion = PCR*) lassen sich geringe Mengen an DNA in kurzer Zeit exponentiell amplifizieren und im Anschluss durch geeignete Methoden nachweisen [178, 220]. Pro durchlaufenen PCR-Zyklus verdoppelt sich die entstandene DNA-Menge bis ein Plateau durch vollständiges Aufbrauchen der freien Nucleotide erreicht wird. Je nach Ausgangsmenge des zu replizierenden DNA-Stranges wird dieses Plateau nach einer unterschiedlichen Zykluswiederholungsanzahl erreicht. Diese lässt dann Rückschlüsse auf die ursprüngliche DNA-Menge zu. Um beeinflussende Zwischenmessungen zu vermeiden, erfolgt der Nachweis der synthetisierten DNA in Echtzeit *(real time)* zum Beispiel durch einen interkalierenden Farbstoff wie SYBR Green. Seine Fluoreszenz nimmt linear zur Menge der amplifizierten Produkte zu. Die größte Fluoreszenz (bei einer Exzitation bei 530 nm Wellenlänge) liegt am Ende der Elongation vor, da hier am meisten doppelsträngige DNA vorliegt, in die sich SYBR Green einlagern kann. Zur Bestimmung der DNA-Menge wird diese meist nicht direkt, sondern im Verhältnis zur Transkriptmenge eines "house keeping"-Gens bestimmt, von dem man annimmt, dass es durch die Versuche unbeeinflusst geblieben ist. Für die vorliegenden Versuche wurde hierfür β-Aktin herangezogen.

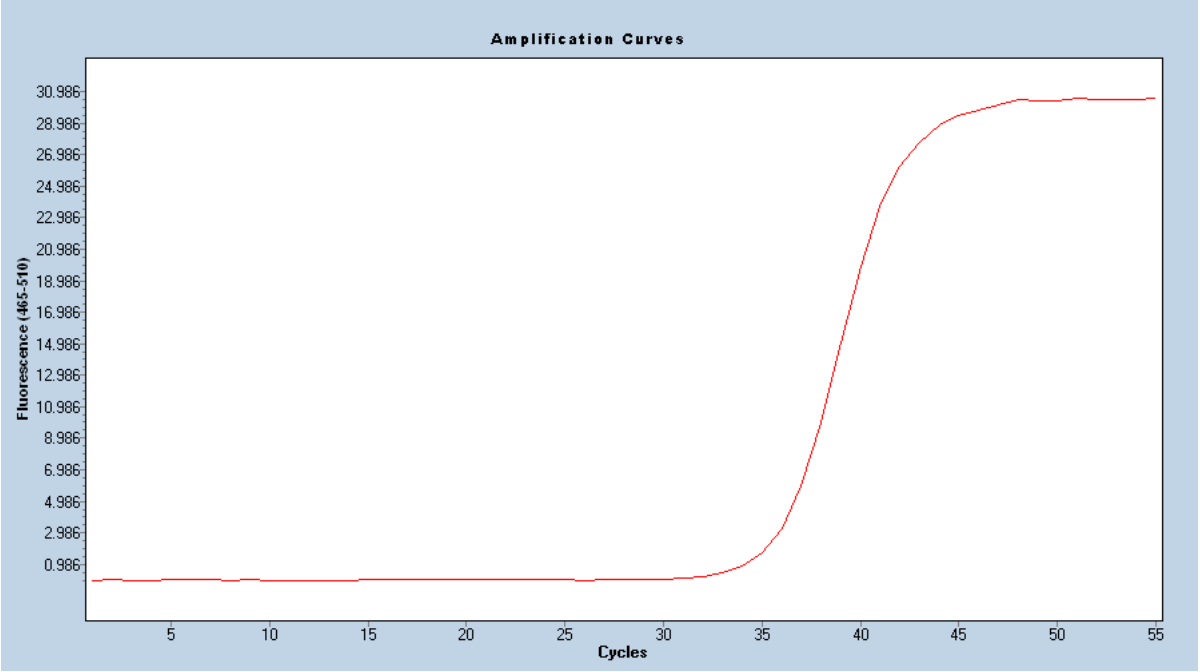


Abbildung 3.3: SYBR Green-Fluoreszenzkurve einer Amplifikation von in cDNA umgeschriebener β-Aktin-mRNA in HEK293-Zellen
x-Achse: Zykluszahl; y-Achse: Fluoreszenz (absolut)

Funktionsprinzip Das Verfahren beginnt mit einer Präinkubation. Diese dient der Aktivierung der termostabilen FastStart-T_{aq}-Polymerase. Eine eventuell noch vorhandene Reverse Transkriptase aus dem in 3.7.3.1 beschriebenen Schritt wird dadurch ebenfalls zerstört.

Es schließt sich der erste Schritt der eigentlichen PCR an. Bei 95 °C wird die im Ansatz enthaltene doppelsträngige DNA in Einzelstränge aufgetrennt (*Denaturierung*). Als nächstes lagern sich die Primer, die

den zu untersuchenden Bereich komplementär beschreiben und ihn von beiden Seiten her einschließen, an die Einzelstränge an (*Annealing*). Die dafür benötigte Temperatur hängt stark vom GC-Gehalt der Primer (3 statt 2 Wasserstoff-Brücken) ab. Für die hier durchgeführten Versuche wurde eine Temperatur von 55 °C gewählt. Im letzten Schritt, der *Elongation*, erfolgt die eigentliche DNA-Synthese bei 72 °C mit Hilfe der T_{aq}-Polymerase. Diese stammt aus dem thermophilen Bakterium Thermus aquaticus und ist für ihre Thermostabilität bekannt. So kann sie auch die hohen für die Denaturierung nötigen Temperaturen überleben, so dass die Zugabe einer Polymerase nicht nach jedem Zyklus erneut nötig ist. Durch 30-60 malige Wiederholung dieser Schritte wird die DNA nahezu exponentiell amplifiziert (siehe Abbildung 6.3 im Anhang). Die Amplifizierung des gesuchten DNA-Stranges spiegelt sich in der mit jedem Zyklusschritt zunehmenden Fluoreszenz des Ansatzes wider. Sind alle SYBR Green-Moleküle gebunden, stellt sich eine Sättigung ein. Es ergibt sich eine sigmoide Kurve wie Abb. 3.3 beispielhaft für β-Aktin zeigt.

Durchführung Für den Ansatz der PCR wurde das "LightCycler® 480 DNA SYBR Green I Master"-Kit von Roche nach Angaben des Herstellers verwendet. Die zu untersuchende cDNA wurde hierfür 1:100 in qPCR-H_2O verdünnt und der gewünschte Primer zugegeben (siehe Tabelle 3.2). Eine Einstellung der $MgCl_2$-Konzentration ist bei diesem Kit nicht nötig.

Tabelle 3.2: LightCycler® FastStart DNA Master ^{PLUS} SYBR Green I - Mengenangaben

Reagenz	*Volumen/Probe (µl)*
MasterMix:	5
FastStart T_{aq}-DNA-Polymerase, Reaktionspuffer, $MgCl_2$, SYBR Green I - Farbstoff und dNTPs	
cDNA	4
Primer	1

Nach Pipettieren des Ansatzes auf eine 96-Well-Platte wird diese mit einer Folie beklebt, zentrifugiert (3000 rpm, 3 min, RT, Zentrifuge Heraeus Biofuge Stratos, Fa. Thermo Scientific) und in den LightCycler eingelegt. Dort werden folgende Phasen nach Herstellerempfehlung durchlaufen (siehe Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Protokoll der real-time RT-qPCR entsprechend Herstellerangaben und Primerprofil

Schritt 2 bis 4 wird 55x wiederholt, Schritt 2 bis 4 beschreiben die Polymerasekettenreaktion im engeren Sinne

	Phase	*Temperatur (°C)*	*Dauer*
1	Präinkubation	95	15 min
2	*Denaturierung*	*95*	*10 s*
3	*Annealing*	*55*	*10 s*
4	*Elongation*	*72*	*10 s*
5	Denaturierung	95	10 s
6	Annealing	60	1 min
7	Schmelzkurve	60-95	7 s
8	Abkühlen	40	30 s

Am Ende erfolgt eine langsam steigende Temperaturkurve die zuerst zu einem vollständigen *Annealing* und bei weiterem Temperaturanstieg zu einer Auftrennung der Doppelstränge und somit einem Fluoreszenzabfall führt. Dieser findet in Abhängigkeit vom GC-Gehalt der Syntheseprodukte statt und setzt deshalb bei jedem Syntheseprodukt bei einer anderen Temperatur ein. So ergibt sich für jedes Syntheseprodukt eine charakteristische Schmelzkurve, die u.a. zur Überprüfung der Reinheit der Amplifikation herangezogen

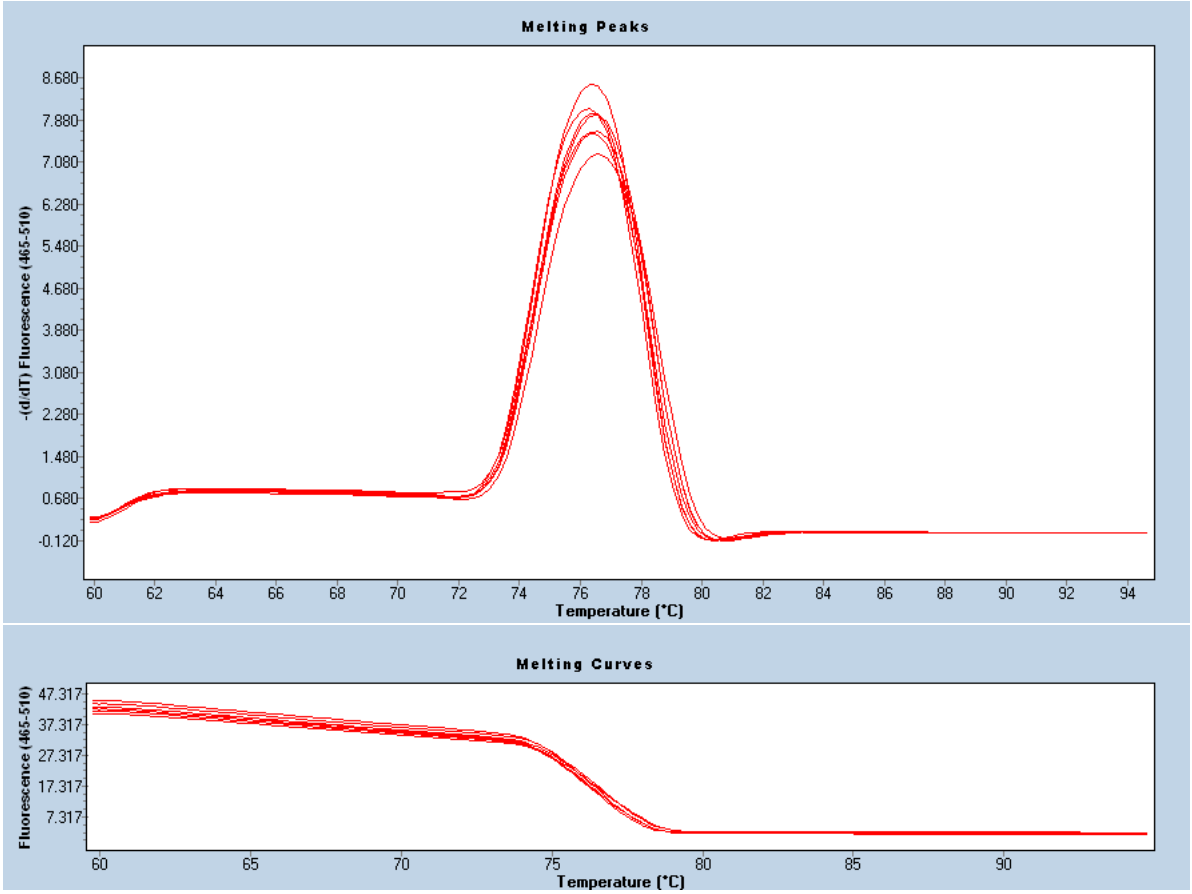


Abbildung 3.4: Schmelzkurve einer in DNA umgeschriebener hTRPA1-mRNA in HEK293-Zellen
x-Achse: Temperatur; y-Achse obere Abb.: Fluoreszenzänderung (Ableitung); y-Achse untere Abb.: Fluoreszenz (absolut);

werden kann. Abb. 3.4 zeigt zwei typische Schmelzkurven für in DNA umgeschriebene hTRPA1-mRNA. Eine doppelgipfelige Kurve würde für eine Verunreinigung sprechen.

3.8 Proteinanalyse mittels SDS-PAGE und Immunoblot

Die Phosphorylierung von Proteinen wurde mittels Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und anschließendem Immunoblot verifiziert. Der Nachweis einer Proteinaktivierung erfolgte dabei anhand der Darstellung dessen Proteinphosphorylierungsgrades durch eine Anfärbung der phosphorylierten Bereiche mit Antikörpern nach Auftrennung der Zellproteinmasse mittels SDS-PAGE nach Molekulargewicht.

Grundlage für die Analyse der Proteinaktivierung bildet die von Laemmli 1970 entwickelte Methode zur Auftrennung von Proteinen nach Molekulargewicht mittels Gelelektrophorese. In einem anschließenden zweiten Schritt wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, welche weitere Analyseverfahren wie z. B. eine Immunfärbung ermöglicht. Dieser als "*blotting*" bezeichnete Schritt wird in Anlehung an das 1975 von Edwin Southern erfundenen Verfahren als sogenannter "Western Blot" bezeichnet. Zur Visualisierung der auf einer Membran befindlichen Proteine können mit der 1983 von Ogata *et al.* entwickelten Methode die Proteine von Interesse mit Hilfe von Antikörpern, welche an ihrem F_c-Teil ein eine Chemilumineszenzreaktion katalysierendes Enzym tragen, sichtbar gemacht werden. In diesem Fall spricht man auch von einem "Immunoblot" [137, 195, 258, 238].

3.8.1 SDS-PAGE

Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine Methode, mit deren Hilfe Proteine elektrophoretisch in einem Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Gleichartige Proteine können dann unter einer entsprechenden Färbung als "Banden" im Gel sichtbar gemacht werden.

Das Polyacrylamidgel entsteht aus einer Reaktion von Acrylamid mit N,N'-Methylenbisacrylamid. Zur Katalyse dieser radikalischen Polymerisation wird der Polymerisierungskatalysator Tetramethylethylendiamin (TEMED) sowie der Radikalstarter Ammoniumperoxodisulfat (APS) hinzugegeben. Dabei bildet sich ein "Polyacrylamidnetz" innerhalb des Geles aus, welches größere durch SDS negativ geladene Proteine stärker an ihrer elektrophoretischen Migration Richtung Anode behindert als kleine und so die Proteine aufgetrennt werden. Durch die Acrylamidkonzentration des Gels lässt sich die Dichte des "Netzes" und somit die Trennschärfe des Gels, die für unterschiedlich große Proteine nötig ist, festlegen. Für die vorliegende Analyse wurde ein diskontinuierliches Verfahren angewandt und das Gel in Sammel- und Trenngel unterteilt. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Gele wurde eine 9 %ige Acrylamidlösung als Trenngel verwendet sowie eine 5,5 %ige Acrylamidlösung als Sammelgel. Zur Herstellung von zwei 9 %igen Gelen wurden 15 ml Trenngellösung verwendet und mit 67,5 µl APS und 135 µl TEMED versetzt. Mit einem speziellen Kamm wurden "Taschen" für die Proteinproben im Gel freigehalten. Verwendet wurde das Gelkammersystem von Amersham Biosciences. Die fertigen Gele wurden in die Kammer eingesetzt und von Laufpuffer umflossen.

Das Proteingemisch bzw. die Zellen, die im Polyacrylamidgel aufgetrennt werden sollten, wurden dafür zuvor mit dem sog. Laemmli-Puffer versetzt, der zur Zelllyse führt [137]. Er enthält unter anderem SDS, β-Mercaptoethanol und Glycin. Das darin enthaltene SDS, ein negativ geladenes Detergenz, lagert sich gleichmäßig an die Zellproteine an und führt neben einer Linearisierung der Proteine zu einem gleichmäßigen, homogenen Ladungs- zu Masseverhältnis (1,4 g SDS/g Protein). Letzteres ermöglicht eine Größenauftrennung entlang eines elektrischen Gradienten in einem Polyacrylamid-haltigen Gel. Des Weiteren enthält der Laemmli-Puffer β-Mercaptoethanol, welches die noch in den Proteinen verbliebenen Schwefelbrücken auflöst und so zur Auflösung von Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine beiträgt. Als weiterer Bestandteil ist Glycin enthalten. Es ist wichtig für die Konzentrierung des Proteingemisches am Boden der Geltaschen.

Nach Herstellung der Gele wurden die Lämmli-haltigen Zell-Lysate für die SDS-PAGE vor dem Übertragen in die Geltaschen für 5 min auf 90 °C erhitzt. Hierbei wurden je 20 µl der Lämmli-haltigen Proben pro Geltasche aufgetragen und für ca. 2,8 h bei 20 mA entlang eines elektrischen Gradienten aufgetrennt. Neben den Proben wurde ggf. in eine weitere Geltasche ein farbiger Proteinmarker mit bekannten Proteinmassen gegeben, um später die Proteinmasse der untersuchten Proteine bestimmen zu können.

3.8.2 Immunoblot

Die in den Gelen aufgetrennten Proteine werden nach dem 1979 entwickelten Verfahren nach Towbin *et al.* elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit Antikörpern, welche eine Immunofluorenzreaktion katalysieren visualisiert [258].

Elektrophoretisch wurden die im Gel nun aufgetrennt vorliegenden Proteine vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Das im hierbei verwendeten Transferpuffer enthaltene Methanol aktiviert die Bindungsstellen der Nitrocellulosemembran und ermöglicht so ein Anlagern der Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen. Das Gel wurde für die Übertragung auf die Membran gelegt und in einer Blottingkammer für 1,5 h bei 180 mA in Methanol-haltigem Transferpuffer "geblottet". Die nun proteinhaltige Nitrocellulosetransfermembran wurde für mindestens 1 Std. mit einer Blockierlösung (Roti-Block) behandelt um unspezifische Antikörperbindungen zu unterbinden. Anschließend wurde die Membran mit dem ersten Erstantikörper (z. B. Anti-pERK1/2) in 5 % Milchpulver in PBS über Nacht bei 4 °C im Kühlraum inkubiert. Am nächsten

Tag wurde der Antikörper mit dreimaligem Waschen mit PBS à 10 min entfernt und für mindestens zwei Stunden mit dem passenden Zweitantikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Zweitantikörper trägt nun an seinem F_c-Ende ein die Chemilumineszenzreaktion katalysierendes Enzym. Mit dreimaligen Waschen mit PBS + Tween und einmaligen Waschen mit PBS für jeweils 10 min wird überschüssiger Zweitantikörper entfernt. Mittels dem "SuperSignal™ West Pico/Femto Maximum Sensitivity"-Kit von ThermoFisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) wurde das "antikörpergefärbte" Protein durch eine Chemilumineszenzreaktion sichtbar gemacht. Zur Herstellung einer "Protein-Ladekontrolle" wurde die Membran über Nacht bei Raumtemperatur in Stripping-Puffer gegeben und am nächsten Tag dreimal mit PBS + Tween und einmal mit PBS jeweils 10 min gewaschen. Dadurch werden zum großen Teil die gebundenen Antikörper wieder entfernt. Anschließend wurde die Membran wieder mit der Blockierlösung behandelt und wie oben beschrieben ein zweiter Erstantikörper (z. B. Anti-ERK1/2) zur Ladekontrolle verwendet.

3.8.3 Semiquantitative Auswertung

Die Helligkeitssignale der Immunoblots wurden mittels Image Studio Lite ausgewertet. Hierbei wurde das Signal des phosphorylierten Proteins der jeweils unteren Bande (z. B. p-ERK2) gemessen und ins Verhältnis zum Helligkeitssignal der Gesamtproteinmenge dieses Bereiches (z. B. ERK2) gesetzt. Hierdurch erhielt man ein relatives Helligkeitsverhältnis. Als *Fold Change* wurde das Verhältnis zwischen dem relativen Helligkeitsverhältnis der Bande, welche dem Basalwert entspricht, und dem relativen Helligkeitsverhältnis der behandelten Bande berechnet:

$$Fold\,Change = \frac{Helligkeitsverhältnis\,behandelt}{Helligkeitsverhältnis\,basal}$$

Zur statistischen Auswertung wurden die Experimente mehrfach und unabhängig voneinander wiederholt. Es wurde für die statistische Auswertung der *Fold Change* herangezogen (siehe auch Abschnitt 3.9)

3.9 Statistische Methoden

Zum Vergleich der Helligkeitssignale der Immunoblots bzw. des gemessenen Fold Change (vergleiche Abschnitt 3.8.3) und zum Vergleich der verschiedenen Expressionslevel der TRP-Kanäle wurde bei Gaußscher Normalverteilung ein Paardifferenzentest durchgeführt. Bei nicht normalverteilten Variablen wurde ein nichtparametrischer Tests, wie der Mann-Whitney-U-Test, verwendet. Der Kolmogorov-Smirnov Test und der Shapiro–Wilk Test wurden zur Differenzierung zwischen normalverteilten und nicht-normalverteilten Variablen angewandt. Alle statistischen Analysen wurden mittels SPSS Statistics 20 (IBM) durchgeführt. Grafiken wurden mit Hilfe von Prism erstellt. Ein $p<0{,}05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Entwicklung eines HEK293-TRPA1-Modellsystems

Zur Untersuchung von TRPA1-vermittelten Effekten in Lungentumorzellen wurde zur besseren Unterscheidung von TRPA1-abhängigen und -unabhängigen Effekten ein TRPA1-Modellsystem in HEK293-Zellen etabliert. Hierzu wurden, wie in Abschnitt 3.2.4 beschrieben, HEK293-Zellen mit einem TRPA1-kodierenden Plasmid transfiziert. Anschließend erfolgte der Nachweis einer erfolgreichen Expression zum einen mittels Fluoreszenzmikroskopie und zum anderen mittels qPCR, welches die Zunahme der TRPA1-mRNA in transfizierten Zellen zeigt. Anschließend wurde die Anwesenheit des Kanal-Proteins mittels Western Blot bestätigt.

4.1.1 Fluoreszenznachweis nach erfolgreicher Transfektion von Zellen mit GFP/TRPA1

Die GFP-Expression und somit indirekt die hTRPA1-Kanalexpression wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Es wurde hierzu ein Plasmid transfiziert, das das sogenannte "grün-fluoreszierende Protein" (engl.: *green fluorescent protein*, GFP) und vorgeschaltet den TRPA1-Kanal enthält. Unter der Annahme, dass ein Ablesen des transfizierten Plasmides zu einer Produktion des hTRPA1-Kanal-Proteins und GFP führt, lässt sich die Kanalexpression indirekt durch eine Fluoreszenz des GFPs nach Anregung mit Licht in lebenden Zellen nachweisen. Abb. 4.1 zeigt exemplarisch eine Überlagerungsaufnahme von transfizierten HEK293-Zellen, in denen transkribiertes GFP nach Anregung grünes Licht emittiert (s. Abschnitt 3.5).

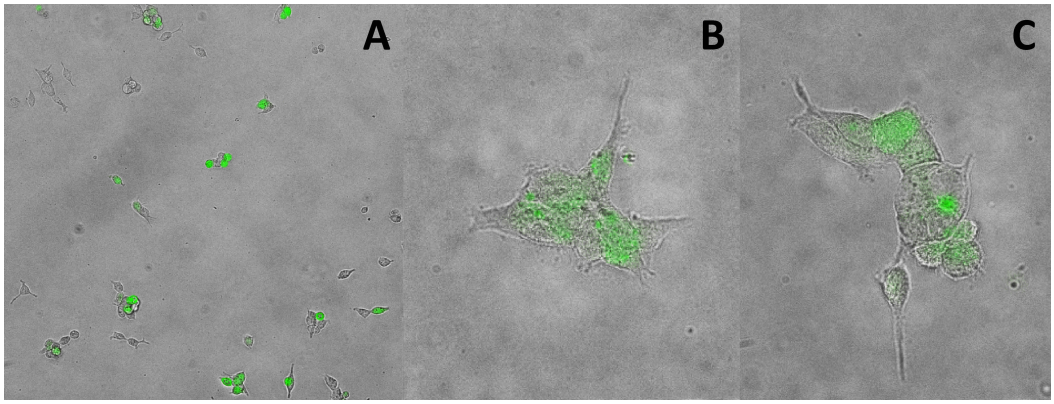


Abbildung 4.1: Fluoreszenz-Overlay-Aufnahme von hTRPA1/GFP-transfizierten HEK293-Zellen
HEK293-Zellen wurden auf einen Objektträger ausgesät, am zweiten Tag mittels PromoFectin mit 1µg Plasmid-DNA transfiziert und am dritten Tag unter dem Mikroskop beobachtet. Ein Durchlichtbild und ein bei 498 nm angeregtes Fluoreszenzbild wurden hierbei mittels Grafikverarbeitungsprogramm übereinandergelegt. Die Fluoreszenz ist hier in grüner Farbe dargestellt. Vergrößerung A: 10-fach B & C: 60-fach

Insgesamt lag die durch optische Kontrolle am Mikroskop erfasste Transfektionsrate unter Berücksichtigung der ausschließlich sehr stark fluoreszierenden Zellen bei 45-55 %. Zellen mit geringerer Fluoreszenz bei geringerer Transfektion wurden hierbei nicht berücksichtigt.

4.1.2 Nachweis der TRPA1-Expression in HEK293-Zellen auf mRNA-Ebene

Eine Quantifikation der Expressionslevel des TRPA1-Kanals in transfizierten und untransfizierten HEK293-Zellen wurde mittels quantitativer RT-PCR, wie in Abschnitt 3.7 beschrieben, ermittelt. Abbildung 4.2 zeigt exemplarisch die PCR-Zyklus-Fluoreszenzkurve von in cDNA umgeschriebener hTRPA1-mRNA und β-Aktin-mRNA in hTRPA1-transfizierten HEK293-Zellen. Der Cp-Wert – der Punkt, an dem die Fluoreszenz erstmals signifikant die Hintergrund-Fluoreszenz übersteigt – lag für β-Aktin im Mittel bei 34,7 Zyklen und

für hTRPA1 in nativen HEK293-Zellen bei 35,9 Zyklen. In transfizierten HEK293-Zellen lag der Cp-Wert für hTRPA1-cDNA im Durchschnitt bei 18,4 Zyklen.

Tabelle 4.1: Expressionslevel von TRPA1, TRPV1-6 und TRPM7 in TRPA1-untransfizierten und -transfizierten HEK293-Zellen relativ zur β-Aktin-Expression

Die relativen Expressionslevel wurden mit der folgenden Formel errechnet: Level x=$(2^{(\text{Cp-Aktin-Cp-cDNA})})$*100. Das Ergebnis wurde in Prozent relativ zu β-Aktin angegeben. Cp=Kurvenpunkt, an dem die Fluoreszenz erstmals exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt.

amplifizierte cDNA	TRPA1-untransf. HEK293-Zellen	TRPA1-transf. HEK293-Zellen	p-Wert
TRPA1	1,3 %	$3{,}1 \cdot 10^6$ %	<0,001
TRPV1	1,8 %	174,4 %	0,80
TRPV2	303,8 %	49,2 %	0,42
TRPV3	$37{,}5 \cdot 10^6$ %	$60{,}5 \cdot 10^6$ %	0,63
TRPV4	48,0 %	38,6 %	0,73
TRPV5	6,5 %	2,5 %	0,64
TRPV6	14,7 %	11,1 %	0,71
TRPM7	38,4 %	18,5 %	0,20

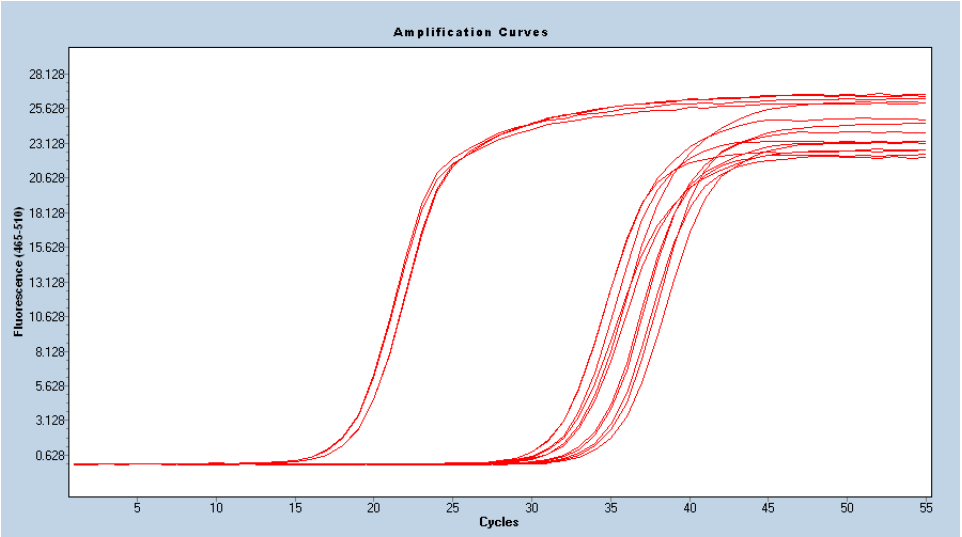


Abbildung 4.2: SYBR Green-Fluoreszenzkurven einer Amplifikation von in DNA umgeschriebener hTRPA1-mRNA (n=4) und β-Aktin-mRNA (n=11) in TRPA1-transfizierten HEK293-Zellen
x-Achse: Zyklenzahl; y-Achse: Fluoreszenz (absolut); hTRPA1 (linkes Kurvenbündel); β-Aktin (rechtes Kurvenbündel).

Eine Übersicht über die experimentell ermittelte, relative Expression des hTRPA1-Kanals und anderer TRP-Kanäle in den verwendeten HEK293-Zellen gibt Tabelle 4.1. Es zeigte sich eine vernachlässigbare Expression von hTRPA1-Kanälen in nativen HEK293-Zellen. Nach Transfektion war eine signifikante Zunahme nachgewiesener hTRPA1-cDNA als Ausdruck einer erfolgreichen Transfektion vorhanden. Der TRPV3-Kanal zeigte als einziger, untersuchter TRP-Kanal hohe, aber nach Transfektion gleichbleibende Expressionslevel. Die sonstigen TRP-Kanäle zeigten niedrig-basale Expressionslevel, die über die Transfektion hinweg konstant blieben.

4.1.3 Nachweis des TRPA1-Kanalproteins in transfizierten Zellen mittels Western Blot

Die erfolgreiche Translation eines hTRPA1-Kanal-Proteins wurde mittels Western-Blot-Verfahren nachgewiesen (Verfahren siehe Abschnitt 3.8). Abb. 4.3 zeigt einen Western Blot mit TRPA1-transfizierten und untransfizierten Zellen. In der Ladekontrolle (untere Banden) mit Antikörpern gegen unphosphoryliertes ERK1/2 zeigte sich eine gleichmäßige Beladung des Gels mit Protein. In transfizierten HEK293-Zellen ist im erwarteten Bereich von 120-130 kDa eine Bande sichtbar, sowie eine zweite Bande bei ca. 150 kDa (siehe Abschnitt 5.2). In untransfizierten HEK293-Zellen ließ sich kein TRPA1-Kanal-Protein nachweisen.

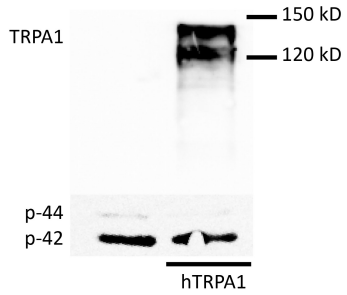


Abbildung 4.3: TRPA1-Kanalproteinnachweis
HEK293-Zellen wurden einen Tag nach ihrer Aussaat mit 1 µg hTRPA1-Plasmid mittels PromoFectin transfiziert und am darauffolgenden Tag lysiert. Die Auswertung erfolgte mittels SDS-PAGE und Immunoblot mit Antikörpern gegen TRPA1 (obere Banden) und ERK1/2 (untere Banden).

4.1.4 Nachweis eines funktionellen TRPA1-Kanals durch Aktivierung mittels AITC

Zum Nachweis einer funktionalen Expression des TRPA1-Kanals wurde dieser mit dem etablierten TRPA1-Agonist AITC in einer üblichen Konzentration von 30 µg stimuliert [47]. Eine aus eigenen Vorarbeiten in Lungentumoren bekannte ERK1/2-Phosphorylierung wurde als Zeichen einer erfolgreichen TRPA1-Kanalaktivierung gewertet. ERK1/2 selbst kann in einer aktivierten, phosphorylierten und unphosphorylierten Form vorliegen. Unphosphoryliertes ERK1/2 wurde als Kontrolle einer gleichmäßigen Proteinbeladung der Gele verwendet.

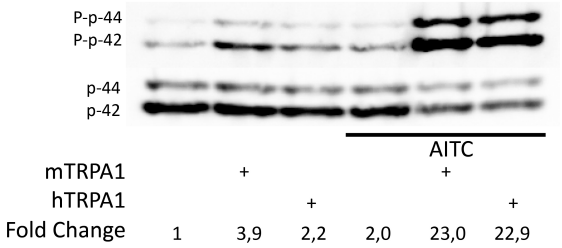


Abbildung 4.4: Mit hTRPA1 und mTRPA1 transfizierte HEK293-Zellen reagieren auf AITC-Stimulation mit einer ERK1/2-Phosphorylierung im Gegensatz zu untransfizierten HEK293-Zellen (exemplarische Darstellung mit semiquantitativer Auswertung, n=1).
HEK293-Zellen wurden einen Tag nach ihrer Aussaat mit 2 µg cDNA mTRPA1 und hTRPA1 mittels FuGENE transfiziert und am nächsten Tag mit 30 µM AITC für 5 min nach einer Nacht in serumfreien Medium stimuliert. Nach Lyse der Zellen erfolgte die Auswertung mittels SDS-PAGE und Immunoblot mit Antikörpern gegen p-ERK1/2 (obere Banden P-p-44/42) und ERK1/2 (untere Banden p-44/42). Durch ungenügendes Entfernen der vorherigen pERK1/2-Antikörper von der Membran sind potentielle Bindungsstellen für ERK1/2-Antikörpern bereits besetzt und es kommt zu einer Minderbeladung mit ERK1/2-Antikörpern. Die Ladekontrolle wird in ihrer Proteinmenge unterschätzt. Eine semiquantitative Auswertung der Helligkeiten wurde angegeben.

Für den Versuch in Abb. 4.4 wurden zwei verschiedene TRPA1-Kanäle verwendet – der murine und der humane TRPA1-Kanal, welche sich sehr ähnlich, aber nicht identisch, in ihrem Aufbau sind (siehe auch Abschnitt 1.3.2). Stimulierte TRPA1-transfizierte Zellen zeigen nach Stimulation mit dem TRPA1-spezifischen Ago-

nisten AITC eine deutliche ERK1/2-Phosphorylierung, wobei sowohl Zellen mit murinen als auch humanen TRPA1-Kanal auf AITC reagieren. Native HEK293-Zellen indessen zeigen keine relevante Reaktion auf AITC (p=0,22 ; n=3). Die angedeutete Anhebung des p-ERK1/2-Basallevels durch eine hTRPA1-Transfektion ist nicht signifikant (p=0,71; n=6). Das vermeintlich starke Signal in den Banden 5 und 6 könnte aus einem unzureichenden Stripping resultieren und könnte so zu einer Überinterpretation der Ergebnisse führen.

Des Weiteren ließ sich die beobachtete ERK1/2-Phosphorylierung durch den Pan-TRP-Blocker Rutheniumrot (RR) blockieren. Hierzu wurden die Zellen jeweils 30 min mit RR vorbehandelt, um ein Einlagern des RR-Moleküls in den Kanal zu ermöglichen, wodurch dieses seine Hemmung entfaltet.

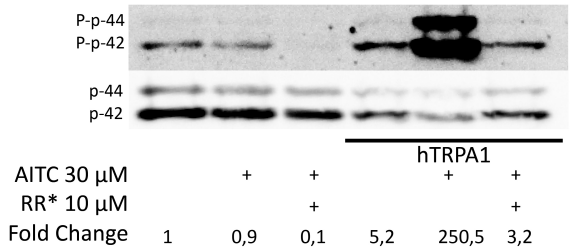


Abbildung 4.5: Inhibition der ERK1/2-Phosphorylierung durch RR in HEK293-Zellen (exemplarische Darstellung mit semiquantitativer Auswertung, n=1)
HEK293-Zellen wurden einen Tag nach ihrer Aussaat mit 2 µg hTRPA1-Plasmid mittels FuGENE transfiziert, über Nacht in serumfreien Medium gehalten und am nächsten Tag mit RR für 30 min vorbehandelt und anschließend mit 30 µM AITC für 5 min stimuliert. Nach Lyse der Zellen erfolgte die Auswertung mittels SDS-PAGE und Immunoblot mit Antikörpern gegen p-ERK1/2 (P-p-44/42) und ERK1/2 (p-44/42); *RR=Rutheniumrot; Eine semiquantitative Auswertung der Helligkeiten wurde angegeben.

Abbildung 4.5 zeigt neben einer deutlichen ERK1/2-Phosphorylierung TRPA1-transfizierter und AITC stimulierter Zellen (Bande 5), dass eine Behandlung von AITC-stimulierten, TRPA1-transfizierten Zellen mit RR zu einer Unterbindung der ERK1/2-Phosphorylierung führt (Bande 6).

In den TRPA1-untransfizierten Zellen (Abb. 4.5, Bande 1-3) fällt auf, dass unter RR das p-ERK1/2-Basallevel erniedrigt wird (Bande 3). Dies ist auch bei ausschließlicher Behandlung der Zellen mit RR zu beobachten und von AITC unbeeinflusst. (Daten nicht gezeigt). Ebenfalls ist dieser Effekt RR-konzentrationsabhängig (Daten nicht gezeigt).

4.2 Stickstoffmonoxid vermittelte TRPA1-Kanal-Aktivierung

Zur Untersuchung der Effekte von NO auf Tumorzellen und zur Überprüfung, ob NO ebenfalls Effekte über den TRPA1-Kanal vermittelt, wurden die zuvor mit AITC durchgeführten Versuche mit NO im Modellsystem wiederholt. Zuvor wurde jedoch die Freisetzungskinetik der NO-Donatoren näher betrachtet (Verfahren s. Abschnitt 3.6). Um sicherzustellen, dass es sich tatsächlich um NO-vermittelte Effekte handelt, wurden die Versuche jeweils mit zwei nicht-strukturgleichen NO-Donatoren durchgeführt. Hierbei wurden die NO-Donatoren SIN-1 (ein aktiver Metabolit des Molsidomins) und MAHMA NONOate (s. Abb. 3.2) verwendet.

4.2.1 Fluorometrische Bestimmung der NO-Freisetzung durch SIN-1 und MAHMA NONOate

Zur fluorometrischen Untersuchung der NO-Freisetzung unter Zellkulturbedingungen wurden HEK293-Zellen mit DAF-2 DA vorbehandelt. Die nach Zugabe der NO-Donatoren emittierte Fluoreszenz wurde dann relativ zum Basalwert gemessen und ist in Abb. 4.6 und 4.7 zu sehen. Um eine ähnliche Darstellung unterschiedlicher biologischer Replikate wegen unterschiedlich starker NO-Freisetzung zu gewährleisten, wurde der Verstärkungsfaktor (engl.: *gain*) angepasst. Dadurch sind die Kurven jedoch nicht mehr direkt miteinander vergleichbar.

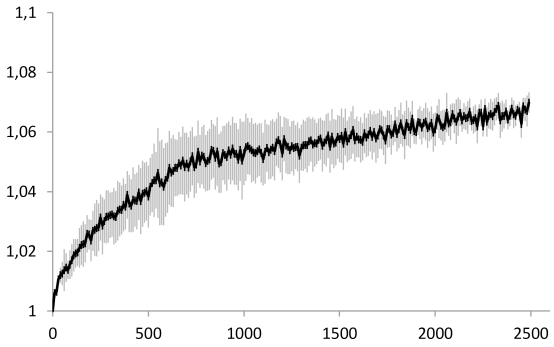


Abbildung 4.6: DAF-2 T-Assay: Messung der relativen DAF-2 T-Fluoreszenz zum Ausgangswert unter einer Endkonzentration von 100 µM SIN-1 bei einem Verstärkungsfaktor von 70 %.
Die x-Achse beschreibt die Zeit in 10 s-Intervallen. Messung der relativen DAF-2 T-Fluoreszenz zum Ausgangswert (n=3) unter einer Endkonzentration von 100 µM SIN-1 bei einem Verstärkungsfaktor von 70 %. Es wurde jeweils der Standardfehler des arithmetischen Mittels berechnet.

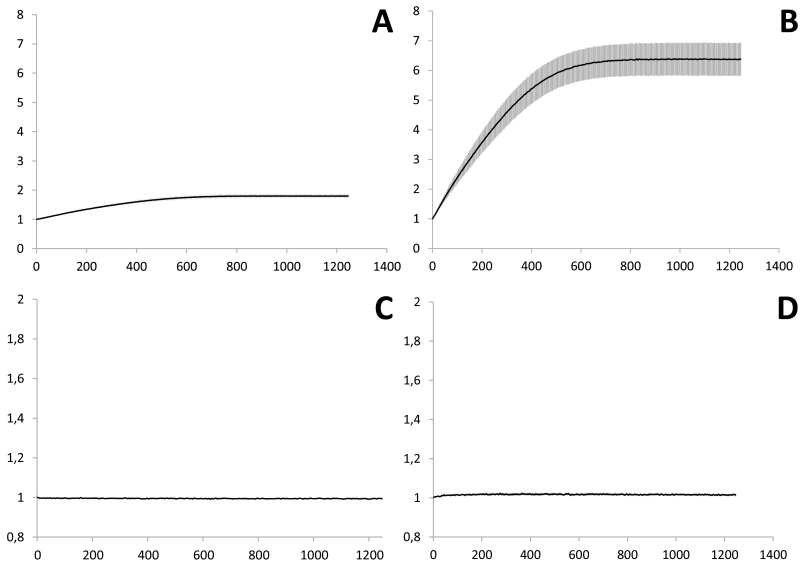


Abbildung 4.7: DAF-2 T-Assay: Messung der DAF-2 T-Fluoreszenz unter einer Endkonzentration von 10 µM (A) und 50 µM MAHMA NONOate (B), sowie unter 100 µM NaOH (D) und keiner Behandlung (Basalwert) (C)
Die x-Achse beschreibt die Zeit in 5 s-Intervallen. Alle Messwerte sind relativ zum Ausgangswert der jeweiligen Messung angegeben. Es wurde jeweils der Standardfehler des arithmetischen Mittels berechnet. (A) Messung der relativen DAF-2 T-Fluoreszenz zum Ausgangswert (n=4) unter einer Endkonzentration von 10 µM MAHMA NONOate bei einem Verstärkungsfaktor von 35 %. (B) Messung der relativen DAF-2 T-Fluoreszenz zum Ausgangswert (n=5) unter einer Endkonzentration von 50 µM MAHMA NONOate bei einem Verstärkungsfaktor von 1 %. (C) Messung der basalen DAF-2 T-Fluoreszenz im zeitlichen Verlauf bei einem Verstärkungsfaktor von 35 %. (D) Messung der relativen DAF-2 T-Fluoreszenz zum Ausgangswert (n=3) unter einer Endkonzentration von 100 µM NaOH bei einem Verstärkungsfaktor von 35 %, welche der Zugabemenge von 100 µM MAHMA NONOate entsprechen würde.

Abb. 4.6 zeigt den Kurvenverlauf nach Zugabe von 100 µM SIN-1 auf die mit DAF-2 DA vorbehandelte Zellmediumssuspension. Aufgrund der langsamen Freisetzungskinetik von SIN-1 ist eine geringe, aber deutlich erkennbare relative Fluoreszenzzunahme von ca. 6,5 % bei einem Verstärkungsfaktor von 70 % in Form einer Sättigungskurve erkennbar. Eine Sättigung ist nach ca. 320 Sekunden zur Hälfte erreicht.

Unter Zugabe von MAHMA NONOate mit einer Endkonzentration von 10 µM (Abb. 4.7 (A)) ist eine Fluoreszenzzunahme um das 1,8-Fache bei einem Verstärkungsfaktor von 35 % zu messen. Bei einer Endkonzentration von 50 µ M MAHMA NONOate (Abb. 4.7 (B)) ist eine Fluoreszenzzunahme bei einem Verstär-

kungsfaktor von 1 % um das Achtfache in Form einer Sättigungskurve zu beobachten. Durch die Verwendung von unterschiedlichen Verstärkungsfaktoren sind die Kurven A und B jedoch nicht direkt miteinander vergleichbar. Eine Sättigung ist bei beiden Konzentrationen nach ca. 210 Sekunden zur Hälfte erreicht.

In Abbildung 4.7 (C) ist der Basalwert ohne Zugabe von NO-freisetzenden Substanzen dargestellt. Die dabei stattfindende Fluoreszenzverminderung um ca. 0,5 % innerhalb von 1250 s ist am ehesten auf das Ausbleichen des DAF-2 T-Fluoreszenzfarbstoffes zurückzuführen. Abb. 4.7 (D) zeigt den Kurvenverlauf nach Zugabe von 10 mM NaOH Lösung, in dem MAHMA NONOate zur Stabilisierung gelöst ist, in entsprechender Endkonzentration. Zu Beginn kommt es dabei zu einer Fluoreszenzzunahme von ca. 1,5 %, welche dann durch Ausbleichen des DAF-2 T wieder leicht abfällt.

Für die Berechnung der Fluoreszenzkurven wurden aufgrund der in Abb. 4.7 (C+D) beschriebenen prozentual nur geringen Veränderung gegenüber der Zugabe von NO-Donatoren diese nicht in die Berechnungen miteinbezogen. Dadurch wird die tatsächliche NO-Freisetzung eher unterschätzt.

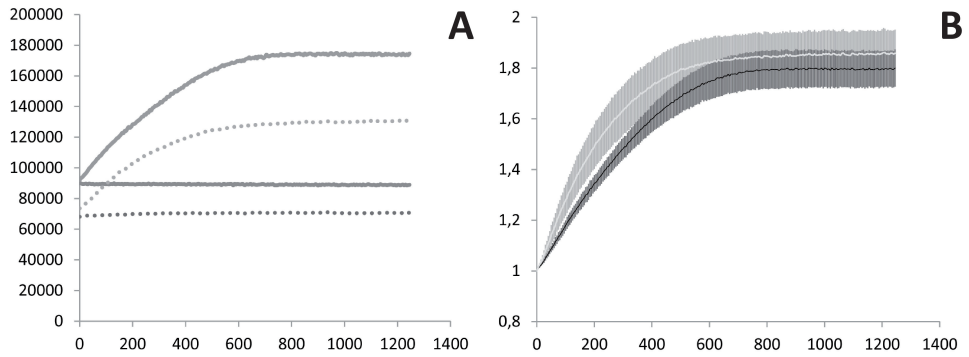


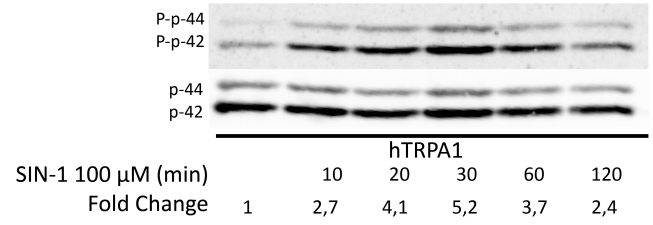
Abbildung 4.8: Messung der DAF-2 T-Fluoreszenz unter einer Endkonzentration von 10 µM MAHMA NONOate und 5µM RR
Die x-Achse beschreibt die Zeit in 5 s-Intervallen. (A) absolute Messwerte der DAF-2 T-Fluoreszenz auf einer Skala von 0 bis 250000 und zwei beispielhaften Messungen mit jeweiligem Basalwert; Die durchgezogenen Kurven beschreiben den DAF-2 T-Fluoreszenzanstieg nach Zugabe von 10 µM MAHMA NONOate Endkonzentration bei einem Verstärkungsfaktor von 35 %. Die gepunkteten Kurven beschreiben den gleichen Versuchsaufbau mit zusätzlicher Zugabe von 5 µM RR. (B) Die Kurve beschreibt die relative DAF-2 T-Fluoreszenz zum Ausgangswert des Standardfehlers des arithmetischen Mittels (n=3) unter einer Endkonzentration von 10 µM MAHMA NONOate (dunkelgrau) sowie unter Kombination von 10 µM MAHMA NONOate mit 5 µM RR (hellgrau) bei einem Verstärkungsfaktor von 35 %.

Der Einfluss von RR auf die Substanz NO selbst wurde anschließend untersucht um auszuschließen, dass RR die NO-Freisetzung moduliert oder freigesetztes NO inaktiviert. Hierzu wurden Fluoreszenzmessungen mit DAF-2 DA in Anwesenheit von RR und NO durchgeführt. Abb. 4.8 (A) zeigt vier beispielhafte Einzelmessungen mit absoluten Werten bei einem voreingestellten Verstärkungsfaktor von 35 %. Die durchgezogenen Linien stellen die NO-Freisetzung nach Zugabe von 10 µ M MAHMA NONOate mit zugehörigen Basalwert, wie zuvor schon beschrieben, dar. Bei den gepunkteten Kurven wurde zusätzlich noch 5 µ M RR zugegeben. RR führt zu einer Absenkung des Basalwertes und somit auch zu einer Herabsetzung aller Werte einschließlich einer leichten Abflachung der Sättigungskurve. RR selbst ist eine Rot emittierende Substanz, die das restliche Lichtspektrum absorbiert. Dies könnte die vorliegende Gesamtfluoreszenzminderung erklären ohne dass eine Interaktion mit NO selbst vorliegt. Abb. 4.8 (B) zeigt die sich überlappenden Standardfehler des arithmetischen Mittels der beiden Kurven ohne RR (dunkelgrau) sowie mit RR (hellgrau).

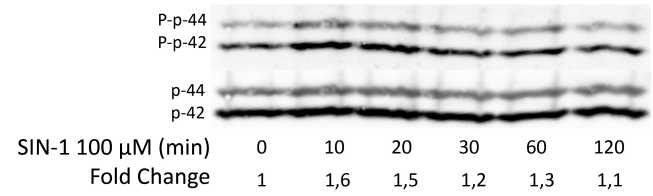
Die Versuche mit SIN-1 wurden bei einem weit höheren Verstärkungsfaktor aufgenommen als die mit MAHMA NONOate. Folglich wird deutlich weniger NO von SIN-1 als von MAHMA NONOate freigesetzt. Des weiteren wird die Hälfte der maximalen Fluoreszenz unter SIN-1-Zugabe deutlich später erreicht. Im Verlauf wurden deshalb unterschiedliche Zeitintervalle und Konzentrationen an NO-Donatoren verwendet, die diese Unterschiede widerspiegeln.

4.2.2 TRPA1-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung durch den NO-Donator SIN-1

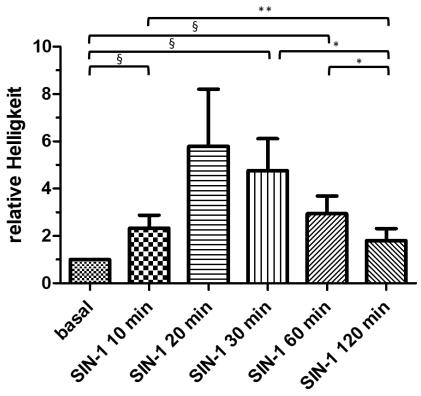
In Abschnitt 4.1.4 konnte ein Zusammenhang zwischen einer Aktivierung des TRPA1-Kanals durch AITC und einer ERK1/2-Phosphorylierung gezeigt werden. Zum Nachweis einer NO-abhängigen TRPA1-vermittelten ERK1/2-Phosphorylierung wurden die Versuche mit zwei NO-Donatoren – SIN-1 und MAHMA NONOate – wiederholt. Es wurden verschiedene Konzentrationen und Zeitintervalle basierend auf der Freisetzungsdynamik beider Substanzen verwendet (siehe Abschnitt 4.2.1).



(a) TRPA1-*transfizierte* HEK293-Zellen mit semiquantitativer Auswertung des gezeigten Blots



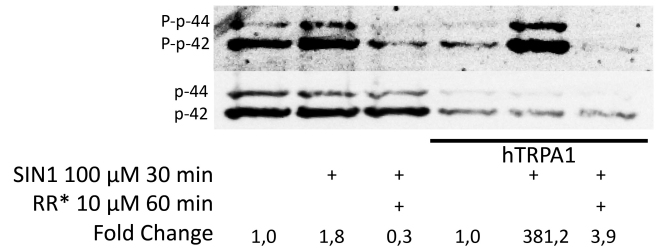
(b) TRPA1-*untransfizierte* HEK293-Zellen mit semiquantitativer Auswertung des gezeigten Blots



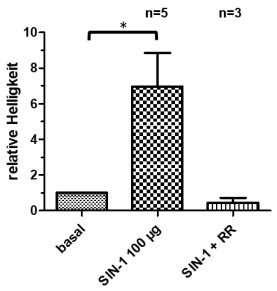
(c) Semiquantitative Auswertung in TRPA1-transfizierten Zellen, n=4;

Abbildung 4.9: Zeitkinetik der ERK1/2-Phosphorylierung unter 100 µM SIN-1
HEK293-Zellen wurden einen Tag nach ihrer Aussaat mit 1 µg hTRPA1-Plasmid mittels PromoFectin transfiziert (a) oder nativ belassen (b). Am nächsten Tag wurden sie mit 100 µM SIN-1 in Zeitintervallen von 0, 10, 20, 30, 60, 120 min nach einer Nacht in serumfreien Medium stimuliert. Nach Lyse der Zellen erfolgte die Auswertung mittels SDS-PAGE und Immunoblot mit Antikörpern gegen p-ERK1/2 (obere Banden P-p-44/42) und ERK1/2 (untere Banden p-44/42). Es wurde jeweils eine semiquantitative Auswertung der Helligkeiten angegeben. *=p<0,05; **=p<0,01; §=p=0,06;

Abbildung 4.9a zeigt eine deutliche ERK1/2-Phosphorylierung unter Zugabe von 100 µM SIN-1 in TRPA1-transfizierten HEK293-Zellen mit einem Maximum zwischen 20 und 30 min. Nach 120 min hat sich das Signal nahezu vollständig zurückgebildet und ist nicht mehr signifikant unterschiedlich vom Basalwert (p=0,19, n=4, Abb. 4.9c). In TRPA1-untransfizierten Zellen hingegen ist bei gleicher Versuchsanordnung die zuvor nach 30 min beobachtete ERK1/2-Phosphorylierung nicht zu erkennen, dafür eine leichte nach 10 min (Abb. 4.9b).



(a) Western Blot mit semiquantitativer Auswertung des gezeigten Blots



(b) Semiquantitative Auswertung in TRPA1-*transfizierten* Zellen

Abbildung 4.10: RR* blockiert eine ERK1/2-Phosphorylierung in TRPA1-transfizierten HEK293-Zellen unter SIN-1
HEK293-Zellen wurden einen Tag nach ihrer Aussaat zum Teil mit 1 µg hTRPA1-Plasmid mittels PromoFectin transfiziert, am nächsten Tag mit 10 µM RR vorbehandelt und 30 min später mit 100 µM SIN-1 für 30 min nach einer Nacht in serumfreien Medium stimuliert. Nach Lyse der Zellen erfolgte die Auswertung mittels SDS-PAGE und Immunoblot mit Antikörpern gegen p-ERK1/2 (obere Banden P-p-44/42) und ERK1/2 (untere Banden p-44/42); *RR=Rutheniumrot; Eine semiquantitative Auswertung der Helligkeiten wurde angegeben. *=$p<0{,}05$;

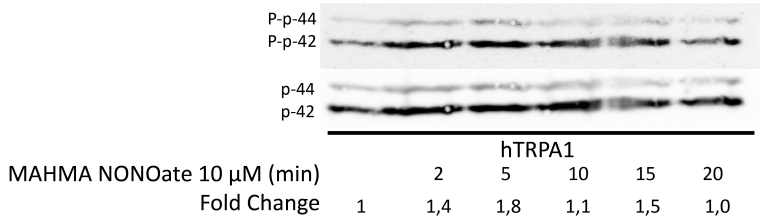
In Analogie zu Abschnitt 4.1.4 wurden die Versuche mit RR auch unter SIN-1-Zugabe, als alternativen TRPA1-Agonisten zu AITC, wiederholt (Abb. 4.10). In den untransfizierten Zellen (Bande 2) zeigt sich nach Zugabe von SIN-1 eine nicht signifikante Steigerung der ERK1/2-Phosphorylierung (n=4, p=0,16) gegenüber den unstimulierten Zellen (Bande 1). Ebenso zeigt sich in untransfizierten HEK293-Zellen (Bande 3) die bekannt RR-bedingte Absenkung des pERK1/2-Basallevels, was auch für TRPA1-unabhängige Effekte von RR in diesen Zellen spricht. Da RR einen unspezifischer TRP-Kanal-Blocker darstellt, ist dieser Effekt eventuell auf die Blockade anderer TRP-Kanäle zurückzuführen, die durch ihre Kanalöffnung zu einem geringen pERK1/2-Basallevel führen.

Eine gewisse zytotoxische Wirkung der Transfektion des TRPA1-Kanals sieht man speziell in Abb. 4.10 anhand der Ladekontrollen, welche über die Versuche hinweg jedoch nicht konsistent ist (n=6, p=0,71). Wie bereits in Abb. 4.9 gezeigt werden konnte, ist hier ebenfalls in TRPA1-transfizierten Zellen nach SIN-1-Zugabe eine ausgeprägte ERK1/2-Phosphorylierung zu beobachten (Bande 5), welche sich durch RR auf pERK1/2-Basalwerte absenken lässt (Bande 6).

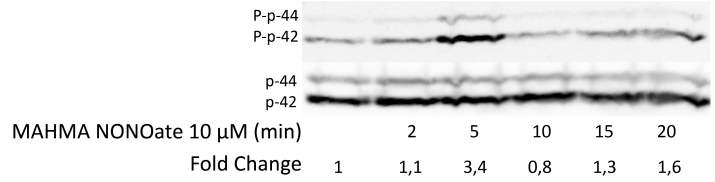
Zusammenfassend ist eine TRPA1-abhängige SIN-1-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung in Analogie zur Stimulation mit AITC zu beobachten (siehe Abschnitt 4.1.4). Eine TRPA1-Abhängigkeit zeigt sich durch die Blockierbarkeit des Signals durch den TRP-Blocker RR.

4.2.3 TRPA1-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung durch den NO-Donator MAHMA NONOate

Um Struktureffekte auszuschließen, wurden die Versuche mit einem zweiten zu SIN-1 nicht-strukturverwandten NO-Donator namens MAHMA NONOate wiederholt (siehe Abb. 3.2). Somit sind unter beiden Substanzen beobachtete Effekte sehr wahrscheinlich NO-vermittelt.



(a) TRPA1-*transfizierte* HEK293-Zellen mit semiquantitativer Auswertung des gezeigten Blots



(b) TRPA1-*untransfizierte* HEK293-Zellen mit semiquantitativer Auswertung des gezeigten Blots

Abbildung 4.11: p-ERK1/2-Zeitkinetik unter 10 µM MAHMA NONOate (exemplarische Darstellung mit semiquantitativer Auswertung, n=1)
HEK293-Zellen wurden einen Tag nach ihrer Aussaat mit 1 µg hTRPA1-Plasmid mittels PromoFectin transfiziert (a) oder nativ belassen (b). Am nächsten Tag wurden sie mit 10 µM MAHMA NONOate in Zeitintervallen von 0, 2, 5, 10, 15, 20 min nach einer Nacht in serumfreien Medium stimuliert. Nach Lyse der Zellen erfolgte die Auswertung mittels SDS-PAGE und Immunoblot mit Antikörpern gegen p-ERK1/2 (obere Banden P-p-44/42) und ERK1/2 (untere Banden p-44/42). Eine semiquantitative Auswertung der Helligkeiten wurde angegeben.

Abb. 4.11 zeigt die Kinetik der ERK1/2-Phosphorylierung nach Zugabe von 10 µ M MAHMA NONOate in TRPA1-transfizierten und -untransfizierten HEK293-Zellen. Dabei kommt es in TRPA1-transfizierten Zellen bereits nach 2 min zu einer ERK1/2-Phosphorylierung, die nach 5 und 20 min jeweils andeutungsweise einen Höhepunkt erreicht (Abb. 4.11a). Die Effekte sind aber insgesamt eher schwach ausgeprägt und stellen vermutlich unvollständige Effekte einer TRPA1-Kanalaktivierung dar .

Abb. 4.11b zeigt den gleichen Versuchsaufbau in TRPA1-untransfizierten HEK293-Zellen. Hier fällt eine isolierte ERK1/2-Phosphorylierung nach 5 min auf, welche nach 10 min wieder auf den Basalwert abgesunken ist. Dieses Ergebnis zeigt, dass es sich bei dem ersten Gipfel in TRPA1-transfizierten Zellen um einen TRPA1-unabhängigen Effekt handeln muss. Ähnliches ist in abgeschwächter Form auch in nativen HEK293-Zellen unter SIN-1 nach etwa 10 min zu beobachten (Abb. 4.9b)

Nach Verwendung höherer Konzentrationen von NO (50 µ M MAHMA NONOate) zeigt sich in TRPA1-transfizierten Zellen eine deutliche ERK1/2-Phosphorylierung mit einem Maximum nach 10 min (Abb. 4.12a). Die dargestellte Zeitkinetik passt insgesamt zur zuvor gemessenen Freisetzungskinetik von MAHMA NONOate und spiegelt somit im Gegensatz zu dem Versuch mit 10 µ M MAHMA NONOate vermutlich die tatsächlichen, TRPA1-vermittelten Effekte wider. In TRPA1-untransfizierten Zellen stellt sich die bereits zuvor beobachtete, isolierte Phosphorylierung nach 5 min in Analogie zu den Versuchen in Abb. 4.11 und 4.12 dar.

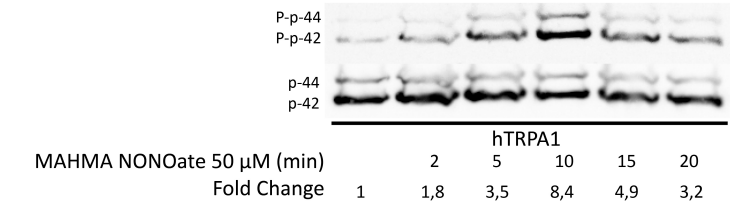
Um einen Vergleich der Effekte von NO auf transfizierte und untransfizierte Zellen ziehen zu können, wurden die Versuche zu den Zeitpunkten 0, 10 und 15 min in transfizierten und untransfizierten Zellen wiederholt (Abb. 4.13). Hierbei zeigt sich, dass in untransfizierten Zellen zu den Zeitpunkten 10 min und

15 min keine relevante NO-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung gegenüber transfizierten HEK293-Zellen mehr messbar ist. Somit sind die zuvor in untransfizierten Zellen beobachteten NO-Effekte nur sehr gering ausgeprägt und nehmen keinen relevanten Einfluss auf die TRPA1-abhängigen Signale im Modellsystem.

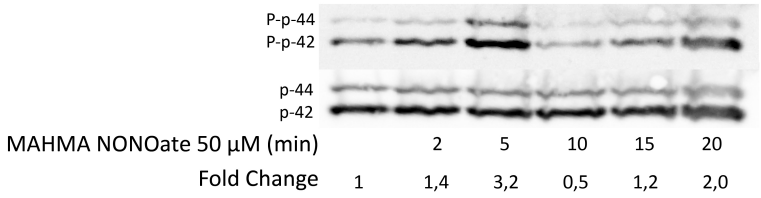
Zur Überprüfung einer TRPA1-Abhängigkeit der Befunde, wurde erneut mit dem pan-TRP-Blocker RR präinkubiert. Auch hier unterbleibt die ERK1/2-Phosphorylierung zu den Zeitpunkten 10 min und 15 min nach 50 µ M MAHMA NONOate (Abb. 4.14). Somit ist von einer NO-vermittelten TRPA1-abhängigen ERK1/2-Phosphorylierung auszugehen. Eine leichte Absenkung des Basalwertes unter RR ist wie zuvor beschrieben erneut zu beobachten.

Um Effekte der Trägerlösung von MAHMA NONOate auszuschließen, wurde abschließend noch ein Versuch mit der reinen NaOH-haltigen Trägerlösung durchgeführt. Vor allem in transfizierten HEK293-Zellen kommt es hierbei zu keiner relevanten ERK1/2-Phosphorylierung (siehe Abb. 4.15).

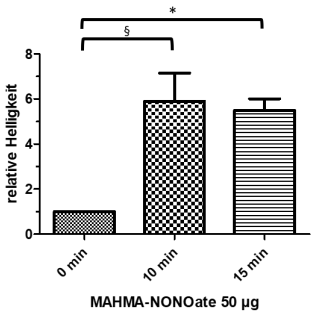
Zusammenfassend stellt sich das hier vorgestellte HEK293-Modellsystem als geeignet dar, um TRPA1-abhängige und unabhängige Effekte zu beobachten.



(a) TRPA1-*transfizierte* HEK293-Zellen mit semiquantitativer Auswertung des gezeigten Blots



(b) TRPA1-*untransfizierte* HEK293-Zellen mit semiquantitativer Auswertung des gezeigten Blots



(c) Semiquantitative Auswertung in TRPA1-*transfizierten* HEK293-Zellen, n=3

Abbildung 4.12: Zeitkinetik der ERK1/2-Phosphorylierung durch 50 µ M MAHMA NONOate mit semiquantitativer Auswertung

HEK293-Zellen wurden einen Tag nach ihrer Aussaat mit 1 µg hTRPA1-Plasmid mittels PromoFectin transfiziert (a) oder nativ belassen (b). Am nächsten Tag wurden sie mit 50 µM MAHMA NONOate in Zeitintervallen von 0, 2, 5, 10, 15, 20 min nach einer Nacht in serumfreien Medium stimuliert. Nach Lyse der Zellen erfolgte die Auswertung mittels SDS-PAGE und Immunoblot mit Antikörpern gegen p-ERK1/2 (obere Banden P-p-44/42) und ERK1/2 (untere Banden p-44/42); Es wurde jeweils eine semiquantitative Auswertung der Helligkeiten angegeben. *=p<0,05; §=0,06;

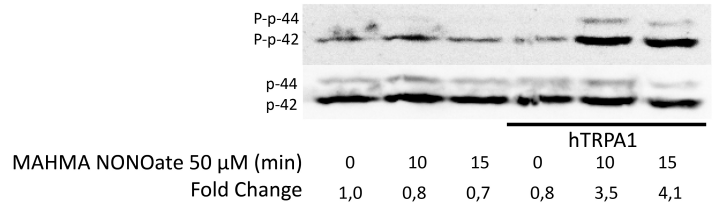


Abbildung 4.13: ERK1/2-Phosphorylierung durch 50 µ M MAHMA NONOate zu den Zeitpunkten 10 und 15 min (exemplarische Darstellung mit semiquantitativer Auswertung, n=1)
HEK293-Zellen wurden einen Tag nach ihrer Aussaat zum Teil mit 1 µg hTRPA1-Plasmid mittels PromoFectin transfiziert, über Nacht in serumfreien Medium gehalten und am nächsten Tag mit 50 µM MAHMA NONOate für 10 und 15 min stimuliert. Nach Lyse der Zellen erfolgte die Auswertung mittels SDS-PAGE und Immunoblot mit Antikörpern gegen p-ERK1/2 (P-p-44/42) und ERK1/2 (p-44/42); Eine semiquantitative Auswertung der Helligkeiten wurde angegeben.

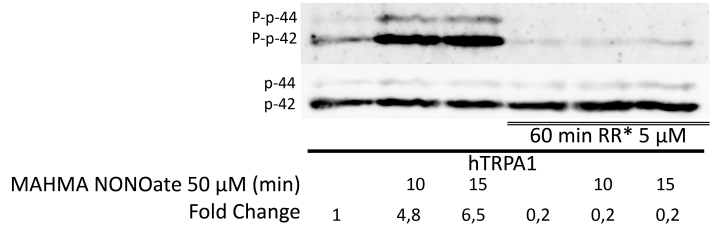


Abbildung 4.14: RR* blockiert eine ERK1/2-Phosphorylierung in TRPA1-transfizierten HEK293-Zellen unter MAHMA NONOate (exemplarische Darstellung mit semiquantitativer Auswertung, n=1)
HEK293-Zellen wurden einen Tag nach ihrer Aussaat mit 1 µg hTRPA1-Plasmid mittels PromoFectin transfiziert und am nächsten Tag mit 5 µM RR für 60 min behandelt und 10 bzw. 15 min vor Versuchsende mit 50 µM MAHMA NONOate nach einer Nacht in serumfreien Medium stimuliert. Nach Lyse der Zellen erfolgte die Auswertung mittels SDS-PAGE und Immunoblot mit Antikörpern gegen p-ERK1/2 (obere Banden P-p-44/42) und ERK1/2 (untere Banden p-44/42); *RR=Rutheniumrot; Eine semiquantitative Auswertung der Helligkeiten wurde angegeben.

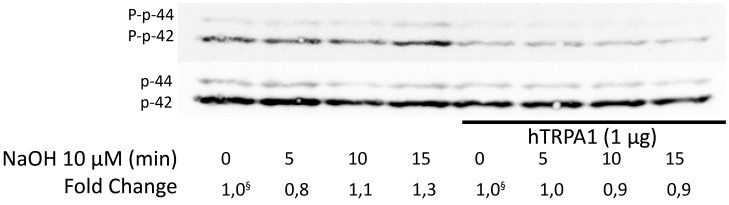


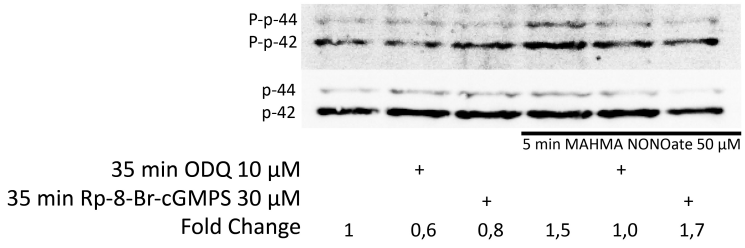
Abbildung 4.15: NaOH als Trägerlösung von MAHMA NONOate führt selbst nicht zu einer ERK1/2-Phosphorylierung in TRPA1-transfizierten HEK293-Zellen (exemplarische Darstellung mit semiquantitativer Auswertung, n=1).
HEK293-Zellen wurden einen Tag nach ihrer Aussaat zum Teil mit 1 µg hTRPA1-Plasmid mittels PromoFectin transfiziert und am nächsten Tag nach einer Nacht in serumfreien Medium mit 10 µM NaOH für 0, 5 und 15 min behandelt. Nach Lyse der Zellen erfolgte die Auswertung mittels SDS-PAGE und Immunoblot mit Antikörpern gegen p-ERK1/2 (obere Banden P-p-44/42) und ERK1/2 (untere Banden p-44/42); Eine semiquantitative Auswertung der Helligkeiten wurde angegeben. §= jeweils zur Normierung des Fold Change verwendeter Ausgangswert.

4.3 Aufklärung NO-TRPA1-vermittelter Signalwege

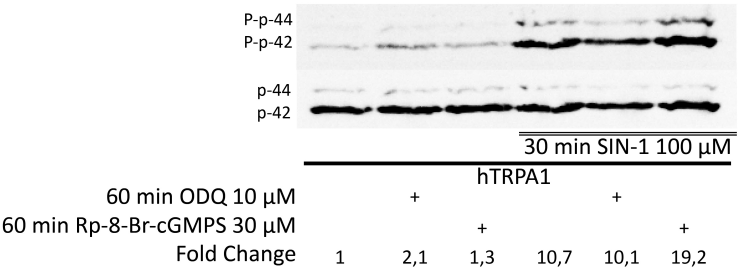
In den vorangegangenen Versuchen konnte ein Zusammenhang zwischen einer NO-vermittelten TRPA1-Aktivierung und einer ERK1/2-Phosphorylierung gezeigt werden. ERK1/2 steht am Ende der MAPK-Kaskade. Diese wiederum kann über verschiedenste andere Signalwege aktiviert werden [274]. Zur Identifizierung möglicher weiterer beteiligter Proteine, welche TRPA1-vermittelt in ERK1/2 münden, wurden im Folgenden verschiedene Inhibitoren eingesetzt. Das Ausbleiben einer ERK1/2-Phosphorylierung nach Zugabe eines bestimmten Inhibitors spricht für die Beteiligung des durch den Inhibitor gehemmten Signalmoleküls am NO/TRPA1/ERK1/2-Signalweg.

4.3.1 Unabhängigkeit der ERK1/2-Phosphorylierung über NO von sGC, cGMP und PKG

NO kann seine Effekte über zwei zentrale Mechanismen vermitteln. Zum einen beeinflusst es Proteine direkt über eine S-Nitrosylierung von Cysteinen, zum anderen vermittelt es, wie in Abschnitt 1.2 beschrieben, seine Effekte über die sGC, welche cGMP herstellt. Das cGMP kann wiederum die PKG oder andere Zielmoleküle aktivieren. In den vorangegangenen Versuchen wurde gezeigt, dass es zu einer NO-vermittelten TRPA1-abhängigen ERK1/2-Phosphorylierung im HEK293-Modellsystem kommt. Zur Klärung, ob im Fall der NO-vermittelten TRPA1-abhängigen ERK1/2-Phosphorylierung ein sGC-abhängiger Signalweg vorliegt, wurden die folgenden Experimente angeschlossen.



(a) TRPA1-*untransfizierte* HEK293-Zellen mit semiquantitativer Auswertung des gezeigten Blots



(b) TRPA1-*transfizierte* HEK293-Zellen mit semiquantitativer Auswertung des gezeigten Blots

Abbildung 4.16: ODQ und Rp-8-Br-cGMPS haben keinen Effekt auf die NO/TRPA1-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung in TRPA1-transfizierten HEK293-Zellen (exemplarische Darstellung mit semiquantitativer Auswertung, n=1).
HEK293-Zellen wurden einen Tag nach ihrer Aussaat zum Teil mit 1 µg hTRPA1-Plasmid mittels PromoFectin transfiziert. Am nächsten Tag wurden sie nach einer Nacht in serumfreien Medium für 60 min mit 10 µM ODQ oder 30 µM Rp-8-Br-cGMPS inkubiert und 30 min vor Lyse mit 100 µM SIN-1 stimuliert. Nach Lyse der Zellen erfolgte die Auswertung mittels SDS-PAGE und Immunoblot mit Antikörpern gegen p-ERK1/2 (obere Banden P-p-44/42) und ERK1/2 (untere Banden p-44/42). Eine semiquantitative Auswertung der Helligkeiten wurde angegeben.

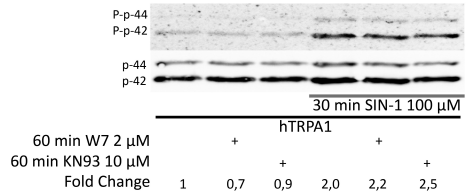
H-(1,2,4)oxadiazolo(4,3-a)quinoxalin-1-one (ODQ) ist ein hoch-selektiver irreversibler Inhibitor der sGC und Rp-8-Br-cGMPS, als Analogon von cGMP, ein Phosphodiesterasenresistenter Inhibitor der cGMP-abhängigen Proteinkinase (PKG). Abbildung 4.16 zeigt zwei Versuche mit jeweils TRPA1-transfizierten und

untransfizierten HEK293-Zellen. Die in Abb. 4.11b und 4.12b beschriebene ERK1/2-Phosphorylierung in untransfizierten Zellen stellt sich nach 5-minütiger Inkubation mit dem NO-Donator MAHMA NONOate erneut dar und ist durch ODQ vollständig blockbar. Der in nativen HEK293-Zellen beobachtete NO-Effekt scheint somit auf eine sGC-Aktivierung zurückzuführen zu sein und ist unabhängig vom der Anwesenheit des TRPA1-Kanals. Unter Rp-8-Br-cGMPS in Kombination mit MAHMA-NONOate scheint es zu einer leichten Verstärkung der ERK1/2-Phosphorylierung zu kommen. Die Hemmung der PKG scheint also eine NO-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung noch zu begünstigen und ist somit nicht an den beobachteten Effekten unmittelbar beteiligt.

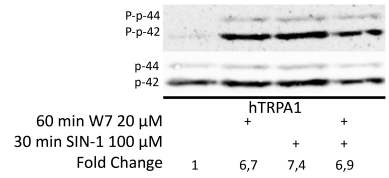
In TRPA1-transfizierten HEK293-Zellen bleibt die starke NO-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung nach Blockade mit ODQ und Rp-8-Br-cGMPS bestehen, so dass eine relevante Beteiligung dieser beiden Proteine an einer NO/TRPA1-vermittelten ERK1/2-Phosphorylierung nicht vorliegt. Erneut scheint eine Hemmung der PKG eine ERK1/2-Phosphorylierung unter der Anwesenheit von NO sogar noch zu begünstigen. Zusammenfassend handelt es sich bei der NO/TRPA1-vermittelten ERK1/2-Phosphorylierung um einen sGC/cGMP/PKG-unabhängigen Vorgang.

4.3.2 Unabhängigkeit der ERK1/2-Phosphorylierung über NO von Calmodulin, CaMKII, PI3-Kinase, PKC und PLC

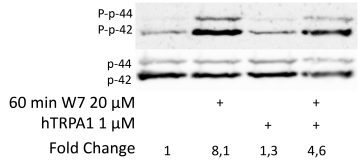
Neben den zuvor beschriebenen am NO/TRPA1/ERK1/2-Signalweg beteiligten Proteinen wurden im Folgenden weitere Proteine auf ihre Beteiligung an einem NO/TRPA1/ERK1/2-Signalweg getestet.



(a) W7 und KN93 haben keinen Effekt auf die SIN-1/TRPA1-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung.



(b) 20 µM W7 mit TRPA1-*transfizierten* HEK293-Zellen



(c) 20 µM W7 mit TRPA1-*untransfizierten* HEK293-Zellen

Abbildung 4.17: (a) Der Calmodulin-Inhibitor W7 und der CaMKII-Inhibitor KN93 haben keinen Effekt auf die SIN-1/TRPA1-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung in HEK293-Zellen. (b)+(c) In höheren Konzentrationen führt W7 (20 µM) ebenfalls zu einer ERK1/2-Phosphorylierung sowohl in TRPA1-transfizierten (b) als auch TRPA1-untransfizierten (c) HEK293-Zellen (exemplarische Darstellung mit semiquantitativer Auswertung, n=1).
HEK293-Zellen wurden einen Tag nach ihrer Aussaat zum Teil mit 1 µg hTRPA1-Plasmid mittels PromoFectin transfiziert. Am nächsten Tag wurden sie nach einer Nacht in serumfreien Medium für 60 min mit 2 µM oder 20 µM W2 oder 10 µM KN93 inkubiert und ggf. 30 min vor Lyse mit 100 µM SIN-1 stimuliert. Nach Lyse der Zellen erfolgte die Auswertung mittels SDS-PAGE und Immunoblot mit Antikörpern gegen p-ERK1/2 (obere Banden P-p-44/42) und ERK1/2 (untere Banden p-44/42). Eine semiquantitative Auswertung der Helligkeiten wurde jeweils angegeben.

Unabhängigkeit von Calmodulin und der Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII)

Liu *et al.* konnten zeigen, dass in Lungenkrebszellen gegenüber normalem Lungengewebe erhöhte Calmodulin-

Level nachweisbar sind und mit einem höherem Tumorstadium zunehmen [147]. Außerdem sind Interaktionen zwischen K-Ras, ein Protein der MAPK-Kaskade, und Calmodulin in Adenokarzinomen der Lunge beschrieben worden [147]. Auch für Verwandte des TRPA1-Kanals, wie z. B. dem TRPC1-Kanal oder den TRPC6-Kanal, ist die Fähigkeit zur Interaktionen mit Calmodulin bekannt [20, 53]. Lang nach der experimentellen Fertigstellung dieser Arbeit konnte auch eine Interaktion des TRPA1-Kanals mit einem CaMKII-abhängigen Signalweg in Kardiomyozyten gezeigt werden [6]. Vor diesem Hintergrund wurde eine mögliche Beteiligung am NO/TRPA1-vermittelten ERK1/2-Signals mittels Inhibition durch W7, einem Calmodulin-Inhibitor und KN93, einem CaMKII-Inhibitor untersucht.

In Abbildung 4.17a & 4.17b zeigen beide Inhibitoren keinen Effekt auf die ERK1/2-Phosphorylierung nach Stimulation TRPA1-transfizierter HEK293-Zellen. In höheren Konzentrationen führt W7 im Gegenteil zu einer ERK1/2-Phosphorylierung unabhängig vom Transfektionsstatus (Abb. 4.17c). Somit ist die Beteiligung dieser beiden Proteine im gesuchten Signalweg unwahrscheinlich.

Unabhängigkeit von der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-Kinase)

Bereits 1998 konnte in mehreren SCLC-Zelllinien eine dauerhaft aktivierte PI3-Kinase nachgewiesen werden, welche in diesen Zellen Proliferation begünstigt [173]. Ebenso zeigte aus Patienten mit SCLC gewonnenes Tumorgewebe in 36 % aller Fälle eine PI3-Kinase-Überexpression [260]. Zur Bewertung einer Beteiligung der PI3-Kinase am untersuchten Signalweg wurden deshalb die beiden PI3-Kinase-Inhibitoren LY-294002 und Wortmannin, welche sehr breit auf alle PI3-Kinase-Isoformen wirken, verwendet. In TRPA1-transfizierten HEK293-Zellen führte LY-294002 zu keiner signifikanten Inhibition der NO/TRPA1-vermittelten ERK1/2-Phosphorylierung. Für Wortmannin, zeigte sich jedoch eine Verringerung der ERK1/2-Phosphorylierung nach Stimulation (siehe Abb. 4.18a). Ursächlich könnte hierfür die unter Wortmannin zu beobachtende starke Ablösung der adherenten HEK293-Zellen sein. Diese könnte Zeichen einer verminderten Vitalität und somit auch verminderten Reaktionsfähigkeit auf SIN-1 darstellen. Im Analogie berichten von Maulik *et al.* von einer reduzierten Lebensfähigkeit und verminderten Proliferation von SCLC-Zellen (H69) nach Gabe des PI3-Kinase-Inhibitors LY-294002 [157]. Da LY-294002 in den vorliegenden Experimenten keine signifikanten Effekte vermittelt und Wortmannin zu einer deutlichen Veränderung der Zellmorphologie führt, ist der beobachtete Effekt in Bande 6 vermutlich nicht in Zusammenhang mit einer isolierten PI3-Kinase-Inhibition in transfizierten HEK293-Zellen zu sehen, sondern mehr mit einer zytotoxischen Wirkung von Wortmannin. Zusammenfassend ist eine Beteiligung der PI3-Kinase am gesuchten Signalweg eher unwahrscheinlich.

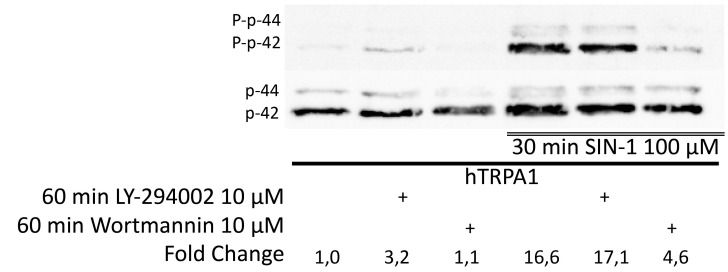
Unabhängigkeit von der Proteinkinase C (PKC)

In SCLC konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung von PKCs durch neurosekretorische Peptidhormone zu einer vermehrten Proliferation und Aktivierung von ERK1/2 führt [230]. Deshalb wurde der kompetitive PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimide (BIM) ebenfalls auf TRPA1-transfizierte NO-stimulierte HEK293-Zellen gegeben.

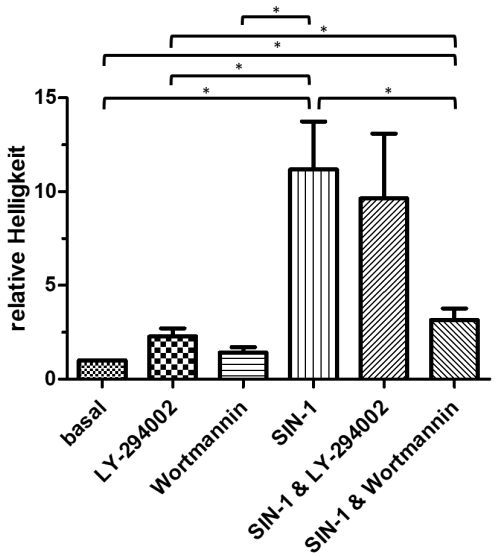
In den vorliegenden Experimenten zeigt sich keine verminderte ERK1/2-Phosphorylierung, was eine maßgebliche Beteiligung der PKC im gesuchten Signalweg ausschließt (siehe Abb. 4.19a). Zum Beweis der Funktionstüchtigkeit und Wahl der richtigen Konzentration wurde ergänzend ein Versuch mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), einem PKC-aktivierenden Diacylglycerol-Analogon durchgeführt. Wie zu erwarten lässt sich eine PMA-induzierte, PKC-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung durch BIM hemmen (siehe Abb. 4.19b).

Unabhängigkeit von der Phospholipase C (PLC)

Beekman *et al.* zeigte, dass die Inhibition der PLC in SCLC zu einem reduzierten Wachstum führt und dass eine über GPCR (hier: Acetylcholin-Rezeptoren) vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung über die PLC



(a) TRPA1-*transfizierte* HEK293-Zellen mit semiquantitativer Auswertung des gezeigten Blots

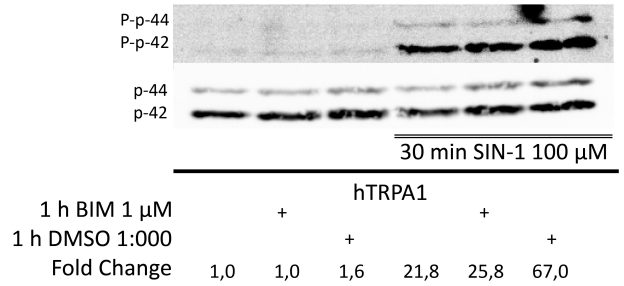


(b) Semiquantitative Auswertung, n=4

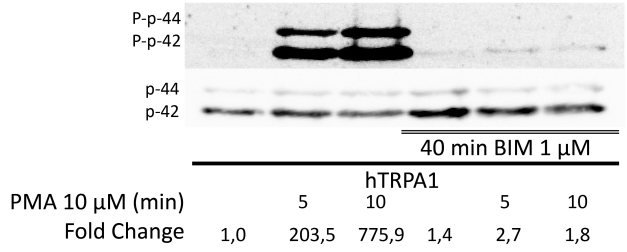
Abbildung 4.18: Keine Inhibition der SIN-1-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung durch die PI3-K-Inhibitoren LY-294002 und Wortmannin in TRPA1-transfizierten HEK293-Zellen.
HEK293-Zellen wurden einen Tag nach ihrer Aussaat mit 1 µg hTRPA1-Plasmid mittels PromoFectin transfiziert. Am nächsten Tag wurden sie nach einer Nacht in serumfreien Medium für 60 min mit 10 µM LY-294002 oder 10 µM Wortmannin inkubiert und 30 min vor Lyse mit 100 µM SIN-1 stimuliert. Nach Lyse der Zellen erfolgte die Auswertung mittels SDS-PAGE und Immunoblot mit Antikörpern gegen p-ERK1/2 (obere Banden P-p-44/42) und ERK1/2 (untere Banden p-44/42); Es wurde jeweils eine semiquantitative Auswertung der Helligkeiten angegeben. *=$p<0,05$;

vermittelt wird [21]. Für den Bradykinin-Rezeptor, ebenfalls ein GPCR, konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung des letzteren zu einer PLC-abhängigen Sensitivierung des TRPA1-Kanals führt [270]. Ebenso wurde bereits für andere Mitglieder der TRP-Familie eine Abhängigkeit von der PLC beschrieben [64]. So ist also eine Relevanz der PLC auch im gesuchten Signalweg möglich.

Zur Untersuchung einer Abhängigkeit des Signalweges von der PLC wurde der unspezifische PLC-Blocker U73122 verwendet. Im vorliegenden Experiment zeigt dieser keinen Effekt auf die TRPA1/NO-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung, sodass eine Beteiligung der PLC an diesem Signalweg unwahrscheinlich ist (siehe Abb. 4.20). Ob dennoch eine der TRPA1-Kanal-Aktivierung vorgeschaltete Interaktion zwischen dem TPRA1-Kanal und der PLC vorliegt, ist durch die Versuchsanordnung nicht zu beurteilen, jedoch auch nicht Teil der engeren Fragestellung. Nebenbefundlich sieht man einen leichten zuvor schon beschriebenen Anstieg der p-ERK1/2-Level in transfizierten HEK293-Zellen gegenüber untransfizierten, welcher jedoch nicht über die Versuche hinweg reproduzierbar ist ($p=0,71$; $n=6$).

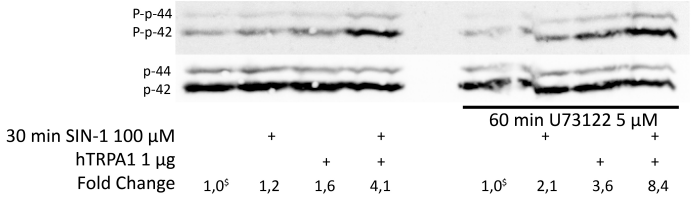


(a) BIM hat keinen Effekt auf die SIN-1/TRPA1-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung in TRPA1-transfizierten HEK293-Zellen. DMSO ist die Trägerlösung von BIM.

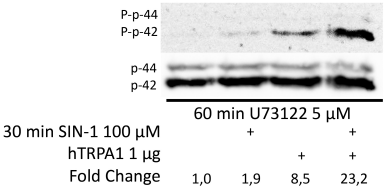


(b) Eine durch PMA induzierte PKC-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung lässt sich durch BIM unterbinden.

Abbildung 4.19: (a) Der PKC-Inhibitor BIM hat keinen Effekt auf die SIN-1/TRPA1-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung in TRPA1-transfizierten HEK293-Zellen, (b) ist aber in der Lage den PKC-Aktivator PMA zu blockieren (exemplarische Darstellung mit semiquantitativer Auswertung, n=1).
HEK293-Zellen wurden einen Tag nach ihrer Aussaat mit 1 µg hTRPA1-Plasmid mittels PromoFectin transfiziert. Am nächsten Tag wurden sie nach einer Nacht in serumfreien Medium für (a) 60 min mit 1 µM BIM inkubiert und 30 min vor Lyse mit 100 µM SIN-1 stimuliert oder (b) 40 min mit 1 µM BIM inkubiert und 5 min und 10 min vor Lyse mit 10 µM PMA stimuliert. Nach Lyse der Zellen erfolgte die Auswertung mittels SDS-PAGE und Immunoblot mit Antikörpern gegen p-ERK1/2 (obere Banden P-p-44/42) und ERK1/2 (untere Banden p-44/42); Eine semiquantitative Auswertung der Helligkeiten wurde angegeben.



(a) U73122 hat keinen Effekt auf die SIN-1/TRPA1-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung.



(b) Bande 6-9 aus (a)

Abbildung 4.20: Der PLC-Inhibitor U73122 hat keinen Effekt auf die SIN-1/TRPA1-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung in TRPA1-transfizierten HEK293-Zellen. Abbildung (b) stellt Bande 6-9 aus (a) erneut entwickelt dar (exemplarische Darstellung mit semiquantitativer Auswertung, n=1).
HEK293-Zellen wurden einen Tag nach ihrer Aussaat zum Teil mit 1 µg hTRPA1-Plasmid mittels PromoFectin transfiziert. Am nächsten Tag wurden sie nach einer Nacht in serumfreien Medium für 60 min mit 5 µM U73122 inkubiert und 30 min vor Lyse mit 100 µM SIN-1 stimuliert. Nach Lyse der Zellen erfolgte die Auswertung mittels SDS-PAGE und Immunoblot mit Antikörpern gegen p-ERK1/2 (obere Banden P-p-44/42) und ERK1/2 (untere Banden p-44/42); Eine semiquantitative Auswertung der Helligkeiten wurde angegeben. §= jeweils zur Normierung des Fold Change verwendeter Ausgangswert.

4.3.3 Identifizierung einer Pyk2/Src-Abhängigkeit

Als Transaktivierung wird im engeren Sinne das Übersprechen zwischen zwei Rezeptoren wie z. B. den GPCR und Rezeptor-Tyrosinkinase-Signalwegen bezeichnet. Für den Histaminrezeptor, einen GPCR, konnte z. B. gezeigt werden, dass er die Empfindung von Juckreiz in neuronalen Zellen über den TRPV1-Kanal vermittelt. Ähnliches konnte auch für den EGFR und dem TRPC3-Kanal gezeigt werden [232, 268]. Der EGF-Rezeptor (engl.: *epithelial growth factor*) und der PDGF-Rezeptor (engl.: *platelet derived growth factor*) gehören zu den Tyrosinkinase-Rezeptoren. Die Aktivierung des EGF-Rezeptors durch EGF führt u.a. zu einer starken ERK1/2-Phosphorylierung und EGF-Rezeptor-Mutationen finden sich in 15 % aller NSCLC in Europa [207, 286]. Unter der Annahme einer möglichen Transaktivierung zwischen dem EGF-Rezeptor bzw. dem PDGF-Rezeptor und dem TRPA1-Kanal wurden die folgenden Versuche durchgeführt.

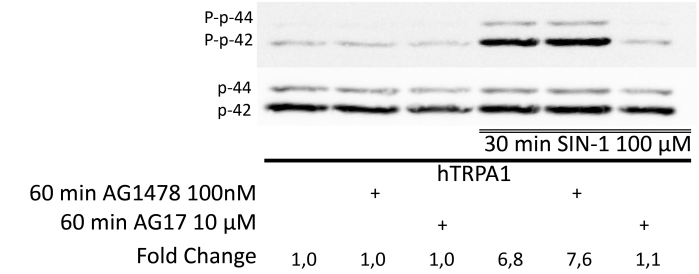
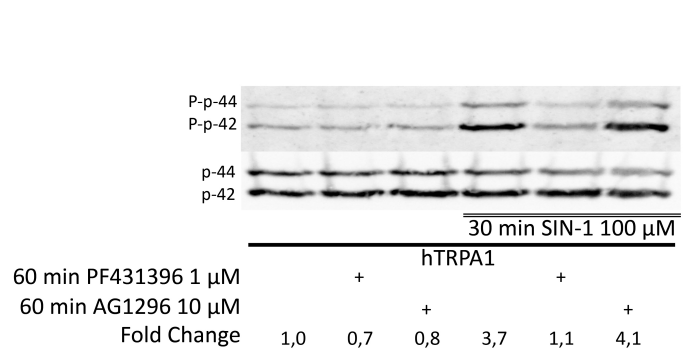
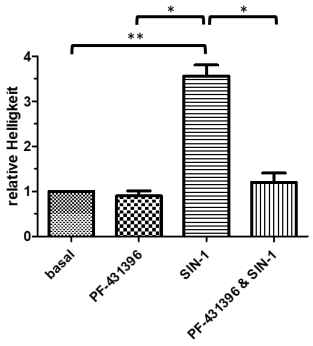


Abbildung 4.21: Der EGF-Rez.-Antagonist AG1478 hat keinen Effekt auf die NO/TRPA1-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung, wohingegen der unspezifische Tyrosinkinaseinhibitor AG17 eine ERK1/2-Phosphorylierung unterbindet (exemplarische Darstellung mit semiquantitativer Auswertung, n=1).
HEK293-Zellen wurden einen Tag nach ihrer Aussaat mit 1 µg hTRPA1-Plasmid mittels PromoFectin transfiziert. Am nächsten Tag wurden sie nach einer Nacht in serumfreien Medium für 60 min mit 100 nM AG1478 oder 10 nM AG17 inkubiert und 30 min vor Lyse mit 100 µM SIN-1 stimuliert. Nach Lyse der Zellen erfolgte die Auswertung mittels SDS-PAGE und Immunoblot mit Antikörpern gegen p-ERK1/2 (obere Banden P-p-44/42) und ERK1/2 (untere Banden p-44/42); Eine semiquantitative Auswertung der Helligkeiten wurde angegeben.



(a) **TRPA1-*transfizierte* HEK293-Zellen mit semiquantitativer Auswertung des gezeigten Blots**

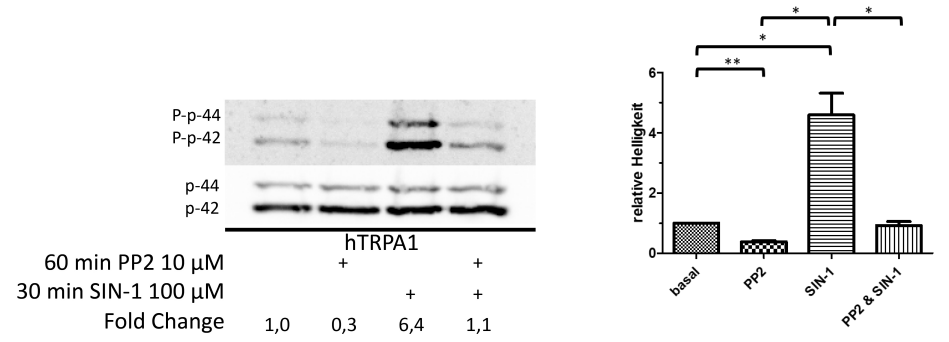


(b) **Semiquantitative Auswertung, n=3**

Abbildung 4.22: Der Pyk2-Inhibitor PF-431396 führt zu einer Hemmung der NO/TRPA1-vermittelten ERK1/2-Phosphorylierung wohingegen der PDGF-Inhibitor AG1296 eine ERK1/2-Phosphorylierung nicht unterbindet.
HEK293-Zellen wurden einen Tag nach ihrer Aussaat mit 1 µg hTRPA1-Plasmid mittels PromoFectin transfiziert. Am nächsten Tag wurden sie nach einer Nacht in serumfreien Medium für 60 min mit 1 µM PF431396 oder 1 µM AG1296 inkubiert und 30 min vor Lyse mit 100 µM SIN-1 stimuliert. Nach Lyse der Zellen erfolgte die Auswertung mittels SDS-PAGE und Immunoblot mit Antikörpern gegen p-ERK1/2 (obere Banden P-p-44/42) und ERK1/2 (untere Banden p-44/42); Es wurde jeweils eine semiquantitative Auswertung der Helligkeiten angegeben. *=$p<0{,}05$; **=$p<0{,}01$

Nach Zugabe von AG1478, einem spezifischen EGF-Rezeptor-Antagonisten lässt sich die SIN-1 induzierte ERK1/2-Phosphorylierung in TRPA1-transfizierten Zellen nicht unterbinden (Abb. 4.21). Somit ist von keiner Transaktivierung zwischen EGF-Rezeptoren und TRPA1-Kanälen auszugehen. Unter einer 30 minütigen Vorinkubation mit AG17, einem unspezifischen Tyrosinkinaseinhibitor, ist jedoch eine deutliche Inhibition der ERK1/2-Phosphoylierung sichtbar. Unter der Hypothese, dass dieser Effekt auf die Inhibition einer Tyrosinkinase-Aktivität zurückgeht, wurde nun mit einem weiteren Tyrosinkinaseinhibitor behandelt. Unter AG1217, einem PDGF-Rezeptor-Antagonisten, zeigte sich jedoch keine Inhibition (Abb. 4.22).

AG17 ist in der Literatur nicht nur als unspezifischer Tyrosinkinaseinhibitor bekannt, sondern auch als Pyk2-Inhibitor [188]. Sollte der beobachtete Effekt durch AG17 auf eine Pyk2-Inhibition zurückgehen, sollte er durch einen spezifischen Pyk2-Inhibitor reproduzierbar sein. Wie Abbildung 4.22 zeigt, konnte mithilfe des Pyk2-Inhibitor PF-431396 das Ergebnis mit AG17 (Abb. 4.21) wiederholt werden. Folglich ist für eine NO-vermittelte TRPA1-abhängige ERK1/2-Phosphorylierung Pyk2 notwendig. Hinweise auf eine Beteiligung von EGFR und PDGFR am NO/TRPA1/ERK1/2-Signalweg ergaben sich nicht.



(a) TRPA1-*transfizierte* HEK293-Zellen mit semiquantitativer Auswertung des gezeigten Blots

(b) Semiquantitative Auswertung, n=4

Abbildung 4.23: Der Src-Kinase-Inhibitor PP2 unterbindet eine NO/TRPA1-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung in HERK293-Zellen
HEK293-Zellen wurden einen Tag nach ihrer Aussaat mit 1 µg hTRPA1-Plasmid mittels PromoFectin transfiziert. Am nächsten Tag wurden sie nach einer Nacht in serumfreien Medium für 60 min mit 10 µM PP2 inkubiert und 30 min vor Lyse mit 100 µM SIN-1 stimuliert. Nach Lyse der Zellen erfolgte die Auswertung mittels SDS-PAGE und Immunoblot mit Antikörpern gegen p-ERK1/2 (obere Banden P-p-44/42) und ERK1/2 (untere Banden p-44/42); Es wurde jeweils eine semiquantitative Auswertung der Helligkeiten angegeben. *=p<0,05; **=p<0,01

Des Weiteren ist eine Interaktion von Pyk2 mit Src-Kinasen bekannt, über welche eine ERK1/2-Phosphorylierung vermittelt werden könnte [224]. Nach Zugabe von PP2, einem Src-Kinase-Inhibitor zeigt sich in TRPA1-transfizierten Zellen ein Basaleffekt des Inhibitors (Abb. 4.23). Ebenfalls zeigt sich eine signifikante Inhibition der ERK1/2-Phosphorylierung nach Stimulation mit SIN-1. Hierbei ist die Inhibition so stark, dass wieder die basalen ERK1/2-Phosphorylierungslevel erreicht werden. Somit scheinen auch Src-Kinasen eine essentielle Rolle in diesem Signalweg zu spielen.

Zusammenfassend konnte die Beteiligung von Rezeptor-Tyrosinkinasen ausgeschlossen werden. Dafür zeigte sich eine Beteiligung der beiden Proteine Src und Pyk2 an der NO/TRPA1-vermittelten ERK1/2-Phosphorylierung. Den somit identifizierten Signalweg, könnte man sich wie folgt vorstellen (siehe Abb. 4.24). Ausgeschlossene mögliche Signalwege wurden hierbei in grau dargestellt.

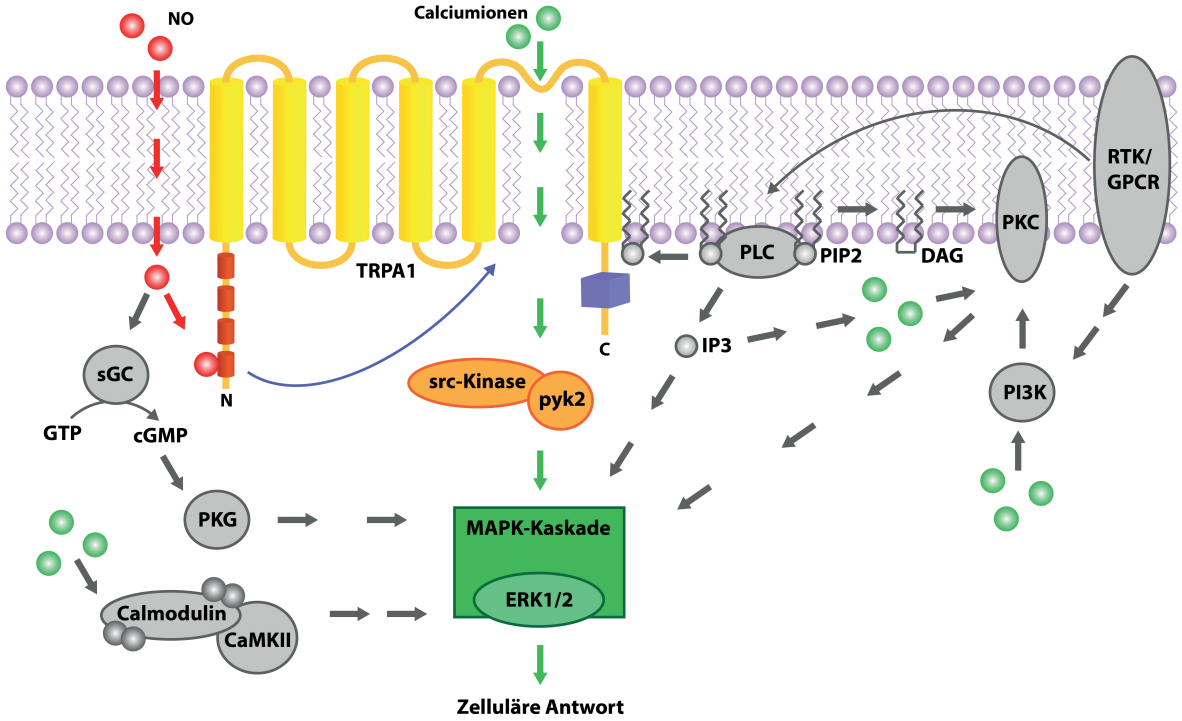


Abbildung 4.24: Angenommener, schematischer Aufbau einer NO/TRPA1-vermittelten Src/Pyk2-abhängigen ERK1/2-Phosphorylierung. Signalwege, deren Beteiligung weniger wahrscheinlich ist, sind in grau dargestellt. Grüne Kreise symbolisieren Calcium-Ionen, rote Kreise NO.

Dass eine mögliche Verallgemeinerbarkeit der hier vorliegenden Ergebnisse bezüglich des TRPA1-Aktivators vorliegt, zeigt Abb. 4.25. Auch unter Stimulation mit AITC ist eine ERK1/2-Phosphorylierung zu beobachten. Diese ist ebenso wie unter NO durch den zuvor verwendeten Pyk2-Inhibitor und den Src-Kinasen-Inhibitor blockierbar. Der neu identifizierte Signalweg scheint also vor allem von der Aktivierung des TRPA1-Kanals abhängig zu sein.

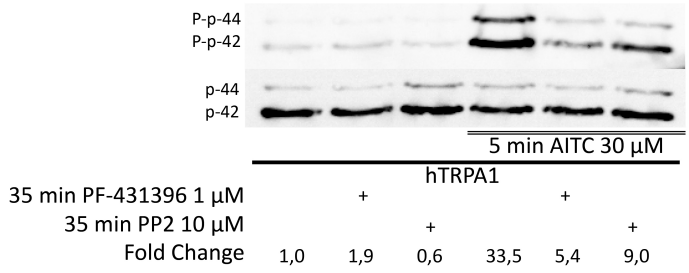


Abbildung 4.25: Der Pyk2-Inhibitor PF-431396 und der Src-Kinase-Inhibitor PP2 führen jeweils zu einer Hemmung der AITC/TRPA1-vermittelten ERK1/2-Phosphorylierung (exemplarische Darstellung mit semiquantitativer Auswertung, n=1).
HEK293-Zellen wurden einen Tag nach ihrer Aussaat mit 1 µg hTRPA1-Plasmid mittels PromoFectin transfiziert. Am nächsten Tag wurden sie nach einer Nacht in serumfreien Medium für 35 min mit 1 µM PF43139660 min oder mit 10 µM PP2 inkubiert und 5 min vor Lyse mit 30 µM AITC stimuliert. Nach Lyse der Zellen erfolgte die Auswertung mittels SDS-PAGE und Immunoblot mit Antikörpern gegen p-ERK1/2 (obere Banden P-p-44/42) und ERK1/2 (untere Banden p-44/42); Eine semiquantitative Auswertung der Helligkeiten wurde angegeben.

4.4 Übertragung in ein endogenes Expressionsmodell

Zur Validierung des im Modellsystem neu identifizierten Signalweges, wurde ein Versuch in H69-Zellen – einer *small cell lung cancer* Zellreihe (SCLC) – wiederholt. H69-Zellen besitzen endogen exprimierte TRPA1-Kanäle, wie in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte [221]. In Abbildung 4.26 ist eine Zeitkinetik mit SIN-1 dargestellt, welche vergleichbar mit der Zeitkinetik in TRPA1-transfizierten HEK293-Zellen ist. Insbesondere ist analog eine deutliche ERK1/2-Phosphorylierung nach 30 min zu erkennen, welche nach 120 min wieder vergangen ist. Als Kontrolle einer positiven ERK1/2-Phosphorylierung wurde hier ergänzend eine Stimulation mit FCS durchgeführt, welche, wie erwartet, zu einer starken ERK1/2-Phosphorylierung führt.

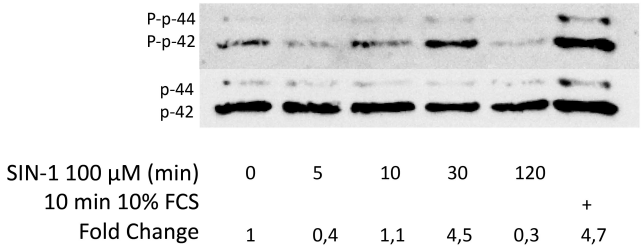


Abbildung 4.26: Nach SIN-1-Stimulation in H69-Zellen zeigt sich eine deutliche ERK1/2-Phosphorylierung nach 30 min (exemplarische Darstellung mit semiquantitativer Auswertung, n=1).
H69-Zellen wurden einen Tag nach ihrer Aussaat in serumfreien Medium inkubiert. Am nächsten Tag wurden sie für 5 min, 10 min, 30 min und 120 min mit 100 µM SIN-1 und 10 min mit 10 % FCS inkubiert. Nach Lyse der Zellen erfolgte die Auswertung mittels SDS-PAGE und Immunoblot mit Antikörpern gegen p-ERK1/2 (obere Banden P-p-44/42) und ERK1/2 (untere Banden p-44/42). Eine semiquantitative Auswertung der Helligkeiten wurde angegeben.

Die Ergebnisse sprechen klar für ein physiologisches Korrelat der in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse und unterstreichen die Validität des HEK293-TRPA1-Zellmodellsystems. In weitergehenden Untersuchungen, die nicht mehr Gegenstand dieser Dissertation waren, konnte von Dr. Thomas R. Büch und Dr. Eva A. M. Schäfer gezeigt werden, dass sich die durchgeführten Ergebnisse auch in der den TRPA1-Kanal endogen exprimierenden, nicht-neuronalen Lungen-Zelllinie A549 reproduzieren ließen (siehe [37] & Abb. 5.2).

4.5 Etablierung einer stabilen hTRPA1-HEK293-Zelllinie

Mit Abschluss der Arbeit gelang die Etablierung eines stabilen Überexpressionssystems des hTRPA1-Kanals in HEK293-Zellen (Verfahren siehe 3.3). Grundlage war die gleichzeitige Transfektion eines Zeocin-Resistenz-Plasmids und eines hTRPA1-tragenden Plasmids (siehe Abschnitt 3.3). Die Zellen tragen auch nach mehreren Passagen stabil den TRPA1-Kanal, was sich sowohl fluoreszenzmikroskopisch als auch auf RNA- und Proteinlevel nachweisen ließ (Büch *et al.*, persönliche Mitteilung, unpublizierte Daten).

5 Diskussion

NO stellt, wie ausführlich in Abschnitt 1.2 dargestellt, einen relevanten Einflussfaktor auf die Aggressivität von Lungentumoren dar. In der vorliegenden Arbeit konnte nun im Rahmen eines TRPA1-Überexpressionsmodells gezeigt werden, dass NO den TRPA1-Kanal aktivieren kann und konsekutiv eine potentiell wachstumsfördernde Signalkaskade anspricht. Die gleichen Zusammenhänge konnten in der SCLC-Zelllinie H69 beobachtet werden. Somit könnte der TRPA1-Kanal nachhaltig zur Unterhaltung eines Tumorgeschehens beitragen.

5.1 Stärken und Schwächen eines HEK293-TRPA1-Überexpressionsmodells

Für die vorliegende Arbeit wurde ein hTRPA1-Überexpressionsmodell generiert und für weitere Untersuchungen genutzt. Der Einsatz eines Überexpressionssystem ermöglicht die grundlegende Untersuchung von Signaltransduktionsvorgängen, die im endogenen System aufgrund geringer Expressionslevel oft maskiert werden und sich hierdurch einer Untersuchung entziehen. In dieser Arbeit wurden HEK293-Zellen als Expressionssystem gewählt, die endogen keine TRPA1-Kanäle exprimieren und unter basalen Bedingungen nur eine geringe p-ERK1/2 Aktivierung aufweisen. Somit stellen HEK293-Zellen ein ideales Zellmodell für die vorliegende Fragestellung dar.

Im Hinblick auf die Untersuchung endogener TRPA1-Funktionen in Neuronen, aber auch in *small cell lung cancer*-Zellen (SCLC), denen ein neuroendokriner Ursprung zugeschrieben wird, scheinen sich HEK293-Zellen besonders gut zu eignen, da sie auch neuronale Marker tragen. HEK293-Zellen wurden bei ihrer Etablierung mit dem humanen Adenovirus Typ 5 transfiziert. Für diese Transfektion wurden nur DNA-Schnittfragmente (sog. *sheared fragments*) verwendet, um eine Zelllyse durch den humanpathogenen Virus zu vermeiden. In den HEK293-Zellen blieb hiervon der linke "Arm" des Adenovirusgenomes in deren DNA integriert. Weiterführende Analysen durch Shaw *et al.* konnten zeigen, dass dies in Ad5-HEK293-Zellen zur Expression neuronaler Zellmuster führt. Unter anderem konnten die vier großen Neurofilamentuntereinheiten in HEK293-Zellen nachgewiesen werden [91, 231]. Auf Basis dieser Veröffentlichungen scheinen HEK293-Zellen eine nähere Verwandtschaft zu neuronalen Zellen zu besitzen als ihr Name bisher vermuten lässt und weisen so eine deutliche Ähnlichkeit zu der oben genannten endogenen neuro-endokrinen Zelllinie eines SCLC auf. Dies macht sie zu einem idealen sowohl neuronalen als auch nicht-neuronalen Modellsystem.

Die grundsätzliche Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die (patho-) physiologische, endogene Situation zeigt der Versuch zu Abb. 4.26 in SCLC-Zellen, welche endogene TRPA1-Kanäle tragen. SCLC-Zellen sind neuroendokrine Lungentumore und stammen vermutlich aus dem Neuroektoderm, aus dem sich auch Nervenzellen entwickeln [141]. So erscheint vor obigen Hintergrund die Wahl der HEK293-Zellen sehr passend. In den Versuchen mit SCLC-Zellen zeigt sich in Analogie zum HEK293-Modellsystem nach Zugabe des NO-Donators SIN-1 eine ERK1/2-Phosphorylierung mit vergleichbarer Zeitkinetik, so dass eine Übertragbarkeit gegeben zu sein scheint. Weitere Versuche mit SCLC waren nicht mehr Teil dieser Arbeit, jedoch konnte Dr. Eva Anna Maria Schäfer im Rahmen ihrer Dissertation an unserem Institut in der endogen TRPA1-Kanal-tragenden SCLC-Zelllinie H146 auch die in dieser Arbeit beschriebene Src-Kinase-Abhängigkeit des TRPA1/ERK1/2-Signalweges nachweisen (siehe Abb. 5.1) [221]. Dies unterstreicht die Validität des entwickelten Zellmodels.

Des Weiteren gibt es aber auch Hinweise, dass sich das hier vorliegende HEK293-TRPA1-Überexpressionsmodell auch auf nicht-neuronale Bereiche ausweiten lässt. Mukhopadhyay *et al.* führten 2011 den Nachweis von TRPA1-Kanälen in einer nicht-neuronalen humanen Alveolarepithelzelllinie der Lunge (A549-Zelllinie, Adenokarzinom der Lunge) [177]. Unsere Arbeitsgruppe konnte experimentell in eben dieser Lungenkarzinomzellreihe, den A549-Zellen, zeigen, dass sich die in dieser Arbeit nachgewiesenen Zusammenhänge ebenfalls in A549-Zellen reproduzieren lassen (Abb. 5.2, Kongressbeitrag [24]). Auch in A549-Zellen findet sich eine

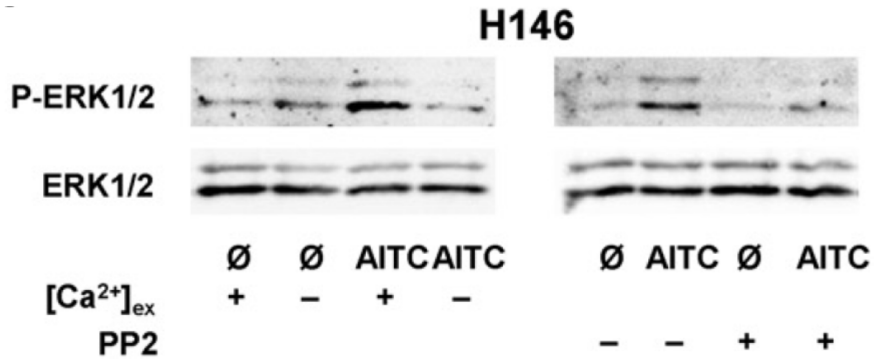


Abbildung 5.1: Inhibition der AITC/TRPA1-vermittelten ERK1/2-Phosphorylierung durch den Src-Inhibitor PP2 in der SCLC-Zelllinie H146; aus [221]
TRPA1-positive H146-Zellen wurden mit dem TRPA1-Agonisten AITC behandelt. Hierbei zeigt sich eine ERK1/2-Phosphorylierung, welche extrazellulär vorhandenes Calcium voraussetzt, und sich durch den Src-Inhibitor PP2 blockieren lässt.

TRPA1-abhängige NO-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung, welche sich durch Src-Kinase- und Pyk2-Inhibitoren unterdrücken lässt, so dass es sich bei dem entdeckten Signalweg nicht um einen ausschließlich Neuronen-spezifischen TRPA1-vermittelten Signalweg handelt. Gestützt wird dies noch von Wang *et al.*, welche in A549-Zellen ebenfalls eine Src-abhängige ERK1/2-Phosphorylierung nachweisen konnten [269]. Aus diesem Grund werden die im Modellsystem erhaltenen Ergebnisse im Folgenden für beide Lungentumorentitäten diskutiert.

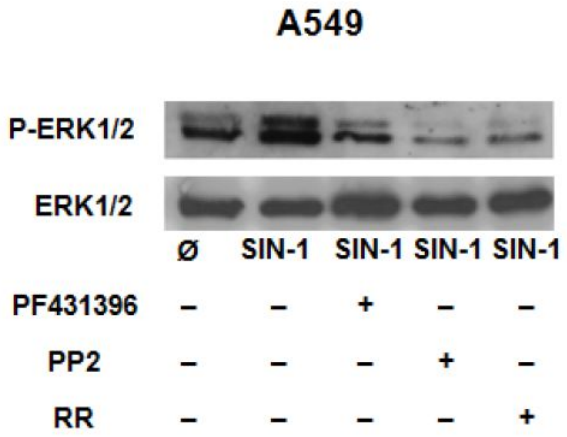


Abbildung 5.2: ERK1/2-Phosphorylierung in TRPA1-tragenden A549-Zellen nach Zugabe von SIN-1, welche sich durch den Pyk2-Inhibitor PF-431396, dem Src-Inhibitor PP2 und dem Pan-TRP-Blocker Rutheniumrot (RR) blockieren lässt; aus [24]

In Hinblick auf das Modellsystem und seine Aussagekraft muss kritisch angemerkt werden, dass bei den durchgeführten Experimenten in den untransfizierten HEK293-Zellen keine mock-Transfektion durchgeführt wurde. Hierbei handelt es sich um eine Transfektion ohne Kanal/GFP, mit der ein möglicher Einfluss durch das verwendete Transfektionsreagenz sicher ausgeschlossen werden kann. Aus der Gesamtheit der Ergebnisse ergibt sich aber kein Verdacht, dass das Transfektionsreagenz eine größere Einflussgröße darstellen könnte. Als Weiteres muss eingeschränkt werden, dass einige Western Blots nur einmal durchgeführt wurden, wenn sich im Rahmen des Screenings kein Verdacht ergab, dass die verwendete Substanz Einfluss auf den gesuchten NO/TRPA1-abhängigen Signalweg nimmt.

5.2 Funktioneller Nachweis des TRPA1-Kanals in transfizierten HEK293-Zellen

Der Nachweis eines funktionstüchtigen TRPA1-Kanals in HEK293-Zellen wurde über mehrere Verfahren erbracht. Ein erster indirekter Nachweis wurde mittels Fluoreszenznachweis des GFPs geführt, welches Teil des transfizierten TRPA1-tragenden Plasmids ist und co-exprimiert wird. Eine diffus über die Zellen verteilte Fluoreszenz des GFP ließ sich in einem Großteil der Zellen nachweisen, so dass wegen der Co-Expression von GFP und dem TRPA1-Kanal auch die Expression des TRPA1-Kanalprotein postuliert werden kann. Ähnliche Nachweisverfahren einer erfolgreichen Transfektion wurden auch in anderen Arbeiten geführt [182, 159]. Die tatsächliche Anzahl transfizierter Zellen wird hierbei meist unterschätzt, da erst ab einer bestimmten Expressionsmenge von GFP eine Fluoreszenz nach Anregung mittels Laser sichtbar wird.

Das Protein konnte mit Hilfe des Western Blot-Verfahrens detektiert werden. Hierbei zeigte sich im erwarteten Bereich von 120-130 kDa eine Bande ausschließlich in transfizierten HEK293-Zellen. Darüber erscheint noch eine zweite Bande von ca. 150 kDa, welche in Atoyan *et al.* 2009 und Dai *et al.* 2007 nicht zu beobachten ist [8, 61]. Im Gegensatz hierzu beschreiben Che *et al.* 2007 eine weitere 150 kDa-Bande in hTRPA1-transfizierten A8-P5-Zellen [47]. Bei der zusätzlichen Bande könnte es sich um eine Form der posttranslationellen Proteinmodifikation handeln. Ähnliche Doppelbanden wurden auch bereits für andere Kanäle wie dem TRPM4 beschrieben [148]. Gegen eine Proteinmodifikation spricht, dass Nagata *et al.* 2005 von einer 150 kDa schwereren, zweiten Bande in mTRPA1-transfizierten HEK293-Zellen berichten, welche nach Zugabe von Harnstoff verschwindet. Die Autoren mutmaßen, dass "TRPA1 eine abnorme Beweglichkeit in Standard-SDS-PAGE-Gelen" haben könnte [183]. Eine erst 2016 von Egan *et al.* publizierte Arbeit zeigt jedoch, dass es sich in HEK293-Zellen tatsächlich um eine N-Gykosylierung handelt, welche auch funktionelle Relevanz bezüglich der Dosis-Wirkungs-Kurven von TRPA1-Agonisten hat [71].

Für den Nachweis eines funktionell aktiven Kanals wurde AITC, einer der potentesten und am besten charakterisiertesten Agonisten, in üblicher Dosierung auf die Zellen gegeben [163, 47]. Hierauf konnte eine Phosphorylierung von ERK1/2, Vertreter der MAPK-Familie, wie vorbeschrieben, gezeigt werden, was für einen funktionell aktiven Kanal spricht [221]. Dies konnte sowohl für den humanen als auch den murinen TRPA1-Kanal in dieser Arbeit demonstriert werden. Auch konnte diese Aktivierung mit dem TRP-Blocker Rutheniumrot wieder unterbunden werden, so dass es sich bei der Phosphorylierung um einen TRP-vermittelten Prozess handelt [206, 263]. Einzuwenden ist, dass Rutheniumrot kein spezifischer TRPA1-Blocker ist und auch potentiell zytotoxisch wirken kann. Neuere Antagonisten wie AP18, HC030031 oder A-967079 würden die Ergebnisse hier weiter stützen können [205, 72, 161].

Beim Vergleich von TRPA1-transfizierten mit untransfizierten HEK293-Zellen lässt sich vor allem bei mit dem mTRPA1-Kanal transfizierten Zellen eine leichte Anhebung des p-ERK1/2-Basallevels beobachten. Der TRPA1-Kanal ist bereits im unstimulierten Zustand leicht geöffnet, so dass ein geringer Ionenfluss möglich ist [266]. Die erhöhten p-ERK1/2-Level könnten bei starker Expression des Kanals auf diesem geringen Ionenfluss beruhen. So zeigt sich auch bei Karashima *et al.* nach Transfektion von TRPA1-Kanälen ein erhöhtes intrazelluläres Calcium [121]. Ebenfalls führt eine Behandlung mit Rutheniumrot, einem wasserlöslichen polykationischen Farbstoff und TRP-Blocker, zu einer Absenkung des p-ERK1/2-Levels auf das untransfizierte Basalniveau, da Rutheniumrot die Kanalpore vollständig durch Einlagerung in die Pore blockieren kann [240, 85]. Über die Versuche hinweg lässt sich die vermehrte ERK1/2-Phosphorylierung jedoch nicht statistisch signifikant reproduzieren und scheint Ausdruck einer variierenden Expressionsmenge des TRPA1-Kanals zu sein.

5.3 Einfluss der NO Freisetzung auf die ERK1/2-Phosphorylierungsdynamik

Da NO eng mit einer Lungentumorgenese assoziiert ist (siehe Abschnitt 1.2), wurde, nach dem Nachweis von funktionell exprimierten TRPA1-Kanälen in HEK293-Zellen, NO als endogener Agonist für die weiteren Experimente verwendet. Um Struktureffekte durch den Agonisten selbst auszuschließen, wurden zwei NO-freisetzende Substanzen mit verschiedenem molekularen Aufbau verwendet. Zunächst wurde die Freisetzungsgeschwindigkeit von NO durch die beiden Substanzen SIN-1 und MAHMA NONOate mittels DAF2 T-Messung getestet. Shirai *et al.* und Bohn *et al.* konnten eine ähnliche NO-Freisetzungskinetik wie in dieser Arbeit für SIN-1 unter Anwesenheit von Sauerstoff darstellen [234, 34]. Homer *et al.* zeigten für MAHMA NONOate sogar eine noch kürzere Freisetzungs-Halbwertszeit von nur 1,3 min statt 3,5 min. Diese Unterschiede könnten durch die bei den vorliegenden Experimenten vermutlich höher gelegenen pH-Werte und eine somit langsamere Freisetzung von NO aus MAHMA NONOate zu erklären sein [105]. Blachier *et al.* konnten zeigen, dass gerade die Zugabe von MAHMA NONOate zu einer extrem starken, schnellen, fast vollständigen NO-Freisetzung führt. So bestimmten sie für 100 µM eine Nitrit-Produktion von 103,8 µM (±12,6), was die frühe, bereits nach 2 min beginnende ERK1/2-Phosphorylierung in den vorliegenden Ergebnissen erklären könnte [31].

Insgesamt zeigte sich eine signifikant schnellere und stärkere Freisetzung von NO durch 10 µM und 50 µM MAHMA NONOate als durch 100 µM SIN-1. Die NO-Menge, nicht aber die Geschwindigkeit, war hierbei dosisabhängig. In Analogie zur NO-Freisetzung zeigte sich unter MAHMA NONOate ebenfalls eine schnellere und stärkere TRPA1-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung in den Zellen passend zur Freisetzungskinetik. Versuche mit NaOH, der Trägerreagenz von MAHMA NONOate, zeigten, dass NaOH keinen Einfluss auf die Versuche nimmt. Da SIN-1 in Wasser gelöst war, waren diesbezüglich keine weiteren Versuche nötig.

Die vorliegende Arbeit zeigt klar, das der TRPA1-Kanal durch NO aktiviert werden kann. Eine funktionelle Aktivierung von TRPA1-Kanälen durch NO mittels S-Nitrosylierung ist anzunehmen [249, 169]. Wie in den Versuchen mit AITC ist auch hier eine ERK1/2-Phosphorylierung zu beobachten, welche sich kongruent zur NO-Freisetzungsdynamik der verschiedenen NO-Donatoren verhält und nur in TRPA1-transfizierten Zellen auftritt. Ebenso ist eine Blockade der ERK1/2-Phosphorylierung durch Rutheniumrot induzierbar. Somit handelt es sich hier um eine NO-abhängige TRPA1-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung in HEK293-Zellen.

5.4 Guanylylcyclase-unabhängige Stickstoffmonoxid Effekte

Wie eingangs beschrieben kann NO seine Effekte klassischerweise über die lösliche Guanylylcyclase (sGC) vermitteln, welche über die Synthese von cGMP weitere Proteine wie die PKG aktiviert [180]. Es konnte gezeigt werden, dass diese für die beobachtete NO-abhängige TRPA1-vermittelte ERK1/2-Phosphorylierung nicht relevant ist und dass auch weitere Proteine wie die PKG nicht involviert sind.

Ein denkbarer Mechanismus über NO/cGMP/PKG wäre eine Aktivierung des Kanals über eine Phosphorylierung durch die PKG. Ähnliches konnte bei dem verwandten TRPC1-Kanal in glatter Gefäßwandmuskulatur gezeigt werden. Hier kommt es über NO/cGMP/PKG zu einer direkten TRPC1-Phosphorylierung durch die PKG, die eine Hyperpolarisation der Muskulatur verhindert [294]. Eine ähnliche Regulation über NO konnte auch für TRPC6-Kanäle gezeigt werden [250]. Da dies ausgeschlossen werden konnte, ist es wahrscheinlicher, dass die vorliegende Kanalaktivierung über eine direkte S-Nitrosylierung des Kanals erfolgt [249].

Nebenbefundlich zeigten native HEK293-Zellen eine kurzzeitige NO/cGMP/PKG-abhängige ERK1/2-Phosphorylierung. Im Rahmen der Experimente konnte aber eine relevante Beeinflussung der zuvor gezeigten TRPA1-abhängigen Ergebnisse ausgeschlossen werden.

5.5 Mögliche Beteiligung des neu identifizierten TRPA1-abhängigen Signalweges an der Lungentumorgenese

In der vorliegenden Arbeit konnte eine NO/TRPA1- abhängige ERK1/2-Phosphorylierung im Modell gezeigt werden, welche sich durch Rutheniumrot, einem TRP-Blocker, unterbinden lässt. Die Inhibition von Src-Kinasen und Pyk2 unterband ebenfalls diese ERK1/2-Phosphorylierung vollständig, so dass diese beiden Proteine einen essentiellen Beitrag zu diesem Signalweg leisten. Im Weiteren soll dieser neue TRPA1-abhängige Signalweg und seine mögliche Bedeutung *in vivo* sowohl im SCLC als auch im NSCLC diskutiert werden.

5.5.1 Relevanz von TRPA1-Kanälen in Lungentumoren

Nach der Fertigstellung des experimentellen Teils dieser Arbeit wurden weitere Arbeiten zur Expression des TRPA1-Kanals auf Lungentumorzellen veröffentlicht. In diesem Abschnitt soll ein kurzer Überblick über den derzeitigen Wissensstand gegeben werden. Mittlerweile ist bekannt, dass sich im Vergleich zu normalem Lungengewebe bei Adenokarzinomen eine 3,5-fach und in Plattenepithelkarzinomen eine 7,8-fach erhöhte Expression des TRPA1-Kanals findet [197]. Bei SCLC ist die Expression sogar nochmal deutlich höher (siehe Abb. 5.3). Unsere Arbeitsgruppe konnte als erste und bisher einzige eine funktionelle Expression des TRPA1-Kanals auf SCLC-Zelllinien nachweisen. Hierbei war der TRPA1-Kanal sowohl in 5 von 6 Zelllinien als auch in Gewebeproben von SCLC-Patienten exprimiert [221]. Ebenso konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die Anwesenheit stimulierter TRPA1-Kanäle sich positiv auf das Wachstum von SCLC auswirkt [221]. Ähnliches konnte die Gruppe um Gang-Jun Du auch anschaulich in einem Mausmodell für Lungenkrebs darlegen. Hier zeigen v.a. Lungentumore, welche den TRPA1- und TRPM8-Kanal gemeinsam exprimieren, ein besonders invasives Wachstum.

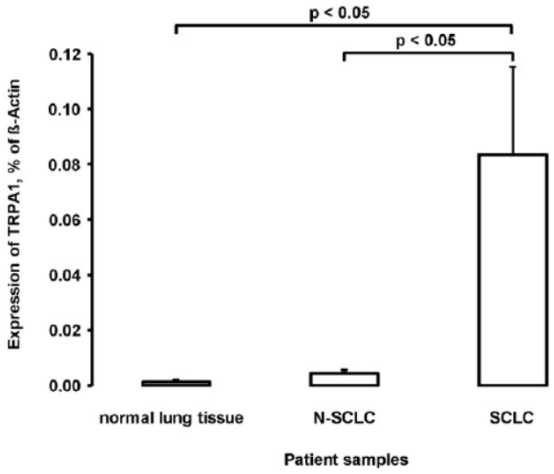


Abbildung 5.3: Expression des TRPA1-Kanals in Gewebeproben von Personen mit gesunden Lungen und Patienten mit NSCLC und SCLC; aus [221]

Für die Ursachen, die zu einer vermehrten Expression von TRPA1-Kanälen auf Lungentumoren führen, lassen sich mehrere Hypothesen generieren. Zum einen wurde mittlerweile ein Zusammenhang zwischen Tabakrauch und der TRPA1-Expression hergestellt. Der TRPA1-Kanal stellt einen Sensor für potentiell schädliche und irritierende Stoffe dar, welche u.a. auch volatil und damit inhalierbar sind (siehe Abschnitt 1.3.2). Gerade Zigarettenrauch beinhaltet einige Bestandteile, wie z. B. Crotonaldehyde, Acrolein oder – wie in dieser Arbeit gezeigt – NO, welche den TRPA1-Kanal aktivieren können [5]. Gleichzeitig stellt das Rauchen den

Hauptrisikofaktor für die Entwicklung von Lungentumoren dar. Nie *et al.* konnten für die Adenokarzinomzellreihe A549 zeigen, dass die Exposition dieser Zellen mit Zigarettenrauch zu einer deutlichen Erhöhung der TRPA1-Expressionslevels führt [190]. Aufgrund der zuvor genannten Punkte erscheint es wahrscheinlich, dass Zigarettenrauch auch *in vivo* zu einer erhöhten TRPA1-Expression in der Lunge führt.

Mittlerweile liefert die Literatur mehrere Ansätze wie Zigarettenrauch zu einer erhöhten TRPA1-Expression führen könnte. Eine Substanz des Zigarettenrauches – das Nikotin – könnte hierfür unmittelbar ursächlich sein. Nikotin fördert innerhalb von Lungenzellen die Bildung des *Hypoxia-Inducible-Factor-1*α (HIF-1α). Wie der Name bereits sagt, ist die Bildung von HIF-1α eine Reaktion auf Hypoxie, welche oft gerade im Inneren von schnell wachsenden Tumoren herrscht, da oft das zusätzliche Wachstum von Gefäßen dem Gesamttumorwachstum hinterherhinkt. Interessanterweise besitzt das TRPA1-kodierende Gen mehrere Promotoren – unter anderem auch einen mit einer Bindungsstelle namens *Hypoxia Response Element*, an das HIF-1α binden kann [98]. Hatano *et al.* konnten zeigen, dass HIF-1α die Expression des TRPA1-Kanals induzieren kann [98]. Nikotin wiederum ist in der Lage über die Bindung an nikotinerge Acetylcholinrezeptoren auf A549-Zellen zu einer HIF-1α-Expression und somit womöglich zu einer HIF-1α-abhängigen TRPA1-Expression zu führen [295]. Interessanterweise ist Nikotin gleichzeitig selbst ein TRPA1-Agonist [251] wie auch andere Bestandteile des Zigarettenrauches [5]. Somit führt Zigarettenrauch möglicherweise über Nikotin sowohl zu einer Zunahme der TRPA1-Expression in NSCLC als auch zu einer TRPA1-Kanal-Aktivierung. Hierdurch könnte ein Tumorwachstum bei rauchenden Lungenkrebspatienten kontinuierlich befeuert werden. Das könnte erklären, warum Patienten mit Lungenkrebs von einer Beendigung des Rauchens auch nach Diagnosestellung prognostisch profitieren [198].

Eine weitere Hypothese ist, dass die vermehrte Anwesenheit von TRPA1-Kanälen durch Il-1α induziert wird. Sowohl in menschlichem Lungengewebe von Rauchern als auch im provozierten Sputum ist eine vermehrte Expression von Il-1α-kodierender mRNA beziehungsweise vermehrt Il-1α im Vergleich zu Nichtrauchern messbar [200]. Für Adenokarzinome, die zu den NSCLC zählen, konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Il-1α eine vermehrte Translokation von TRPA1-Kanälen in der Adenokarzinomzellreihe A549-Zellen an die Zelloberfläche bewirkt und so eine vermehrte Responsivität der Zellen auf TRPA1-Agonisten fördern könnte [248]. Als Quelle für Il-1α könnte man plasmazytoide dendritische Zellen vermuten, die sich in NSCLC-Tumorgeweben vermehrt und pathologisch verändert ansammeln und viele pro-inflammatorische Zytokine wie Il-1α produzieren [237]. Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Mäusetracheae und Hamsterlungen auf eine Zigarettenrauchexposition mit einer Proteinextravasion im Sinne einer inflammatorischen Gewebsreaktion als auch einer Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Calcitonin Gene–Related Peptide und Substanz P reagieren, sofern der TRPA1-Kanal vorhanden ist [125, 5]. Möglicherweise könnte es bei dieser pro-inflammatorischen Reaktion auf Zigarettenrauch auch zu einer Il-1α-Ausschüttung kommen, so dass das Rauchen hierüber ebenfalls eine dauerhafte TRPA1-Kanal-Expression unterhält. Erwähnenswert ist auch, dass die oben genannte Il-1α-induzierte Translokation von TRPA1-Kanälen ERK1/2-abhängig ist, so dass man mutmaßen könnte, dass die in dieser Arbeit beschriebene ERK1/2-Phosphorylierung nach TRPA1-Aktivierung auch zu einer Verstärkung des eigenen Signals beitragen könnte [248]. Neben plasmazytoiden dendritischen Zellen, könnten auch Makrophagen eine Il-1α-Quelle darstellen, da im Tierversuch diese ebenfalls nach längerer Zigarettenrauchexposition eine vermehrte Il-1α-Expression aufweisen [175].

Woher die starke o. g. TRPA1-Kanal-Expression in SCLC herrührt, ist bisher nicht näher untersucht worden. Ein möglicher Mechanismus könnte, wie zuvor beschrieben, Hypoxie sein. Wie bereits erwähnt ist Hypoxie häufig in soliden, schnell wachsenden Tumoren wie dem SCLC vorzufinden und wird meist noch begünstigt von oft begleitenden Lungenerkrankungen wie COPD in dieser Patientengruppe oder die Obstruktion von Lungenarealen durch den Tumor. Eine Hypoxie zieht meist eine konsekutive HIF-1α-Expression in betroffenen Zellen nach sich [179]. So weisen auch 49 - 61 % aller SCLC-Tumor eine deutliche HIF-1α-Expression

auf [144, 151]. SCLC-Tumore, welche HIF-1α-positiv sind, gehen mit einem aggressiveren Tumorwachstum, mehr Metastasen, einem fortgeschrittenerem Tumorstadium und Chemotherapie-Resistenz einher [214]. Auch weisen Patienten mit SCLC-Tumoren, die HIF-1α exprimieren, gegenüber Patienten mit HIF-1α-negativen SCLC-Tumoren eine deutlich verkürzte Überlebenszeit sowie ein 39,2-fach erhöhtes Risiko früh zu versterben auf (durchschnittlich 102 Tage vs. 311 Tage nach Diagnosestellung) [151, 144]. Wie bereits oben beschrieben, kann HIF-1α eine TRPA1-Kanal-Expression induzieren [98]. Interessanterweise ist eine Parallelität in der HIF-1α- und TRPA1-Expression in Lungengeweben zu beobachten. So exprimieren gesundes Lungengewebe, Adenokarzinome, Plattenepithelkarzinome und SCLC jeweils kaum, mäßig, viel und sehr viel HIF-1α- und TRPA1-Kanäle [214, 221, 197]. Jedoch gab es hierzu noch keine vergleichenden Studien. Man kann nur vermuten, dass aufgrund der oben beschriebenen Promotorregion des TRPA1-Kanal-Gens eine HIF-1α-Expression auch zu einer verstärkten TRPA1-Expression führt und somit vor allem die aggressiveren (HIF-1α-positiven) Tumore TRPA1-Kanäle tragen. Ob nun die Aggressivität des SCLC auf der Expression von TRPA1-Kanälen beruht oder auf der durch weitere von HIF-1α-induzierte Genprodukte wie z. B. VEGF, lässt sich derzeit nicht abschließend sagen [179]. Die Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe mit SCLC und TRPA1-Kanälen legen zumindest einen zusätzlichen Wachstumsvorteil von SCLC-Zellen mit aktivierten TRPA1-Kanälen nahe [221].

5.5.2 TRPA1-Kanäle und ERK1/2

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine TRPA1-Kanalaktivierung zu einer ERK1/2-Phosphorylierung im Modellsystem führt. Auch im Übertrag auf ein endogen TRPA1-exprimierendes Zellsystem, der Zellreihe H69, welche aus SCLC-Zellen kultiviert wurde, lässt sich diese ERK1/2-Phosphorylierung nach TRPA1-Kanalaktivierung nachweisen. Der TRPA1-Kanal stellt hierbei jedoch nicht den einzigen TRP-Kanal dar, der zu einer ERK1/2-Phosphorylierung führen kann. Für den TRPC6-Kanal, dessen Mutation, wie in der Einleitung erwähnt, zur FSGS führen kann, ist hierzu ebenfalls in der Lage [53]. Ebenso konnte dies für den TRPV1-Kanal beschrieben werden [290].

Die Versuche mit den SCLC-Zellen und die konsekutive ERK1/2-Phosphorylierung könnte auch *in vivo* eine Relevanz besitzen, da in den meisten SCLC-Zellen eine sehr starke TRPA1-Kanalexpression vorhanden ist [221]. Gleichzeitig konnte unsere Arbeitsgruppe auch für die NSCLC-Zellreihe A549, die ebenfalls TRPA1-Kanäle exprimiert, eine ERK1/2-Phosphorylierung nach Zugabe eines TRPA1-Agonisten beobachten, weshalb im folgenden die mögliche Relevanz einer ERK1/2-Phosphorylierung allgemein in Lungentumoren beleuchtet werden soll.

Bezüglich ERK1/2 müssen NSCLC und SCLC differenziert betrachtet werden, da hier ERK1/2 zum Teil verschiedene Rollen bzw. nach aktuellem Kenntnisstand einen unterschiedlichen Stellenwert einnimmt. In NSCLC-Zellen sind häufig Mutationen in der MAPK-Signalkaskade oberhalb von ERK1/2 zu finden, die in der Folge zu einer ERK1/2-Aktivierung führen. So liegt in 15 % aller NSCLC zum Beispiel eine EGF-Rezeptor-Mutation (eine Rezeptor-Tyrosinkinase) oder in 30 % der Fälle eine K-Ras-Mutation vor. Somit führen beide zu einer ERK1/2-Aktivierung (siehe Abb. 5.4) [44] . Hierhingegen sind in SCLC-Zellen quasi nie Mutationen in diesen Signalwegen zu finden [167, 265].

SCLC und ERK1/2-Phosphorylierung In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine TRPA1-Kanalaktivierung zu einer ERK1/2-Phosphorylierung in der SCLC-Zelllinie H69 führt. Ebenso konnte dies für die SCLC-Zelllinie H146 gezeigt werden [221]. Dies ist vor dem Hintergrund, dass in SCLC-Zellen im Grunde keine Mutationen im Bereich der MAPK-Kaskade gefunden wurden, ein überraschender Befund [167, 265]. Vielmehr wäre zu erwarten, dass wachstumsrelevante Signalwege bevorzugt Mutationen erwerben, die zu einer dauerhaften Aktivierung dieses Signalweges führen. Jedoch führt eine Aktivierung der MAPK-Kaskase z. B. durch eine Überexpression von Raf-1, sogar zu einem Wachstumsarrest in SCLC [212]. Vielleicht deswegen

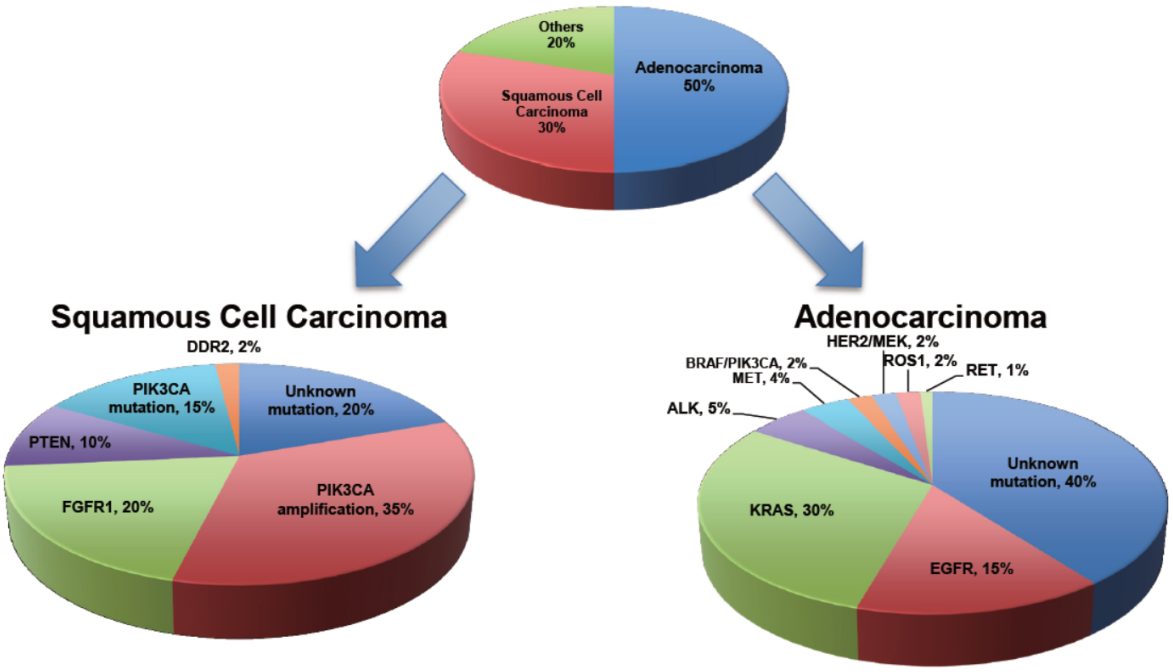


Abbildung 5.4: Aufteilung der NSCLC-Tumore nach Histologie sowie darin häufig auftretender Mutationen, Translokationen und Veränderungen in der Kopienanzahl; aus [44] ***Stand: 2014***

findet sich auch in 80 % der Fälle eine Deletion auf Chromosom 3, die meistens Raf-1 einschließt und so zu einem Verlust der heterozygoten Raf-1 Expression führt [93].

Obwohl dies auf den ersten Blick somit eine Relevanz der hier im Modell gezeigten, TRPA1-abhängigen ERK1/2-Phosphorylierung in Frage stellen könnte, gibt es auch Befunde, die eine Aktivierung der MAPK-Kaskade und ihre Relevanz in SCLC-Zellen zeigen: SCLC-Zellen, die sich wie neuroendokrine Zellen verhalten, reagieren auf eine Stimulation mit neuroendokrinen Botenstoffen wie Galanin, Neurotensin, Gastrin-Releasing Peptide, Bradykinin, Oxytocin, Bombesin und Vasopressin mit einer ERK1/2-Phosphorylierung, die die Proliferation von SCLC anregt [230, 202, 215, 141, 62, 100]. Es konnte gezeigt werden, dass SCLC-Zellen diese Neuropeptide einerseits selbst bilden und andererseits, weil sie auch Rezeptoren hierfür tragen, dass sie auch wieder von diesen Neuropeptiden stimuliert werden können. Deshalb wird hier auch ein auto- und parakriner Wachstumsreiz durch Neuropeptide bei SCLC-Zellen angenommen [100]. Folglich scheint gerade im Kontext von neuroendokrin-vermitteltem Wachstum von SCLC-Zellen der MAPK-Kaskade eine zentrale Rolle zuzukommen.

Dass ein ERK1/2-abhängiger Wachstumsreiz bei gleichzeitiger Raf-1-Deletion, welcher sich somit auf die MAPK-Kaskade und ERK1/2 auswirkt, kein Widerspruch sein muss, legen Park *et al.* anschaulich dar. In der Tumorbiologie wird ERK1/2 vornehmlich mit malignem Wachstum in Verbindung gebracht und deshalb werden z. B. Ras und Raf als (Proto-) Onkogene bezeichnet. Folglich würde man erwarten, dass die Einbringung eines mutierten, dauerhaft aktivierten Onkogens zu einer Entartung einer bisher gesunden Zelle führt. Die von Park, Newbold und Serrano beschriebenen Zusammenhänge zeigen, dass in gesunden Zellen genau das Gegenteil der Fall ist. So führte die Überexpression von aktiviertem Ras-1 in gesunden Zellen zu keiner malignen Transformation, sondern zu einem Wachstumsarrest [196, 189, 228]. Dies könnte eine Art Schutzmechanismus sein, um eine Entartung bisher gesunder Zellen zu verhindern. Da Mutationen regelmäßig in allen Körperzellen vorkommen, sind solche Mechanismen in jeder Zelle nötig, um eine mutationsbedingte Entartung zu verhindern. Als Antwort auf eine überaktivierte MAPK-Kaskade werden in gesunden Zellen

vermehrt Tumorsuppressoren hochreguliert [228]. Allem voran sind hier das Tumorsuppressorgen p53 und Rb (Retinoblastom-Protein) zu nennen, welche in nahezu allen SCLC-Zellen inaktiviert sind [273, 277], denn erst die Inaktivierung dieser Tumorsuppressorgene kann den ERK1/2-induzierten Wachstumsarrest durchbrechen und eine Entartung der Zelle ermöglichen [196]. Gerade neuroendokrine Tumore wie SCLC-Zellen und Phäochromozytome scheinen zu einem bestimmten Teil noch diesen Schutzmechanismus gegen Entartung, nämlich den ERK1/2-induzieren Wachstumsarrest, zu beherrschen [261]. So führt z. B. eine Überexpression von p53 zur Apoptose von SCLC-Zellen und eine Ras-Überaktivierung in Phäochromozytoma zur Ausdifferenzierung und Wachstumsarrest [1, 261]. Deshalb erscheint hier eine Reduktion der möglichen Gesamt-Raf-1-Menge durch Deletion des Raf-1-tragendenden Chromosomenarms als auch die Inaktivierung von Arrest-fördernden Proteinen wie p53 und Rb in SCLC als sinnvoll [93, 277]. Hierdurch ist möglicherweise das für neuroendokrine Zellen nötige, neuropeptid-vermittelte Wachstum über eine ERK1/2-Aktivierung möglich ohne die kritischen zu einem Zellarrest führenden hohen ERK1/2-Level zu erreichen. Der TRPA1-Kanal könnte somit ähnlich wie Neuropeptide zu dieser ausgewogenen leicht erhöhten, proliferationsfördernden ERK1/2-Phosphorylierung beitragen. Dass eine TRPA1-Kanal-Aktivierung in SCLC-Zellen wachstumsfördernd ist, konnten Schäfer *et al.* zeigen [221].

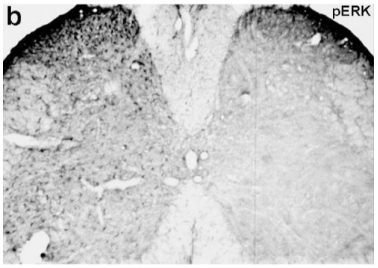
Das Neuropeptid-induzierte Wachstum in SCLC-Zellen wird über GPCR vermittelt [219]. Hierbei spielt Calcium eine zentrale Rolle, über das verschiedene Signalwege in SCLC-Zellen angestoßen werden [215]. GPCR können jedoch als reine Rezeptoren selbst kein Calcium in die Zelle hineinlassen und benötigen hierzu Calcium-gängige Kanäle oder interne Calciumspeicher. Roelle *et al.* konnten zeigen, dass das Calcium unter anderem in SCLC-Zellen von extrazellulär stammt und relevant für das Wachstum dieser Zellen ist. Denkbar in diesem Zusammenhang wäre, dass der Calciumeinstrom über TRPA1-Kanäle erfolgt, da dieser die selben nachgeschalteten Signalmoleküle wie bei Roelle *et al.* anspricht, wie im vorliegenden Zellmodell als auch durch Schäfer *et al.* in SCLC-Zellen gezeigt werden konnte [215, 221]. Auch die vermehrte Expression von TRPA1-Kanälen führt bereits zu einer erhöhten intrazellulären Calciumkonzentration und könnte hierüber proliferativ wirken [121]. Somit könnten die TRPA1-Kanäle möglicherweise unterstützend beim neuropeptid-vermittelten Wachstum sein.

Wie bereits zuvor erwähnt, sind TRPA1-Kanäle bereits im unstimulierten Zustand leicht geöffnet, so dass es hierdurch zu einem geringen Calciumfluss kommt. Auch dieser könnte gerade bei der ausgeprägten Expression des TRPA1-Kanals auf SCLC-Zellen das Wachstum durch eine leichte Anhebung der phosphorylierten ERK1/2-Basallevel positiv fördern (siehe Abschnitt 5.2 & 5.5.1) und eine Aktivierung des TRPA1-Kanals das Wachstum ähnlich wie nach Neuropeptidstimulation verstärken.

Relevanz einer ERK1/2-Phosphorylierung in der pulmonalen Adenokarzinom-Zellreihe A549 und anderen NSCLC-Zelllinien Wie eingangs erwähnt, stellt die MAPK-Kaskade einen wichtigen Wachstumsfaktor für Adenokarzinome dar (Abb. 5.4) [44]. So ist z. B. die Zellmigration und damit die Tumorinvasivität deutlich verringert in NSCLC-Zellreihen, wenn ERK1/2 inhibiert wird [289]. Auch in Zelllinien, die v.a. über eine Mutation verfügen, die die MAPK-Kaskade aktiviert, wie z. B. eine MET-Mutation, stellt sich die Inhibition von MEK, welche für die Phosphorylierung von ERK1/2 verantwortlich ist, als wachstumshemmend dar [51]. Mittlerweile wurden viele Substanzen entwickelt, die entweder Mitglieder der MAPK-Kaskade oder vorgeschaltete Rezeptor-Tyrosinkinasen, die ihre Effekte meist über eine ERK1/2-Phosphorylierung vermitteln, inhibieren. Diese Substanzen konnten bereits deutliche Erfolge in der Therapie des Adenokarzinoms verbuchen [94]. Zum Teil stellten sich diese Therapieansätze erfolgreicher als die gängigen Chemotherapien dar [94]. Jedoch ist hierbei auf das Vorliegen einer passenden Mutation zu achten, da diese Therapeutika im Sinne einer *targeted therapy*, also einer gezielten Krebstherapie, nicht generell auf alle Adenokarzinome gleichermaßen effektiv wirken [94].

Ob eine Inhibition des TRPA1-Kanals auf NSCLC-Tumoren zu einer reduzierten Proliferation führt, ist unklar. Nach unserem Wissen gibt es keine Studien, die eine Untersuchung eines direkten Zusammenhangs zwischen dem Wachstum von A549-Zellen und dem TRPA1-Kanal bisher unternommen hätten. Jedoch ist denkbar, dass eine Reduzierung der TRPA1-vermittelten ERK1/2-Phosphorylierung in Tumoren, in denen keine z. B. Ras-Mutation vorliegt, erfolgversprechend sein könnte. Eventuell könnten gerade Raucher oder Patienten mit inflammatorischen Lungenerkrankungen, also Patienten, die TRPA1-Kanal-Agonisten ausgesetzt sind und keine intrinsische mutationsbedingte ERK1/2-Aktivierung besitzen, hier einen zusätzlichen Vorteil haben.

Der TRPA1-Kanal und die ERK1/2-Aktivierung in Neuronen Dass der TRPA1-Kanal in SCLC-Zellen zu einer ERK1/2-Phosphorylierung führt ist gut vereinbar vor dem Hintergrund der weiteren Expression dieses Kanals im Körper. So ist der TRPA1-Kanal stark auf nozizeptiven und chemosensorischen Neuronen exprimiert. Gerade im Kontext mit Neuronen konnte bereits ein Zusammenhang zwischen dem TRPA1-Kanal und einer ERK1/2-Phosphorylierung demonstriert werden. So konnte in Spinalganglienzellen (DRG) gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Senföl (AITC) als auch Kälte, zwei typischen TRPA1-Aktivatoren, zu einer ERK1/2-Phosphorylierung in DRG-Neuronen führt [65] (siehe auch [66]). Ähnliches konnte auch im Bereich des akuten viszeralen Schmerzes in gastralen DRG-Zellen gezeigt werden. In diesen Zellen konnte eine durch eine Magendehnung induzierte ERK1/2-Phosphorylierung nachgewiesen werden, welche sich spezifisch sowohl durch ein TRPA1-Antisense-Oligodeoxynucleotid als auch durch den hochpotenten TRPA1-Blocker HC-030031 unterbinden lässt [132, 131].



(a) ERK1/2-Phosphorylierung (p-ERK1/2) im Rückenmark im Bereich des Hinterstrangs nach Ligation des Nervus ischiadicus. Die Ratten wurden hierfür 2 Tage nach Nervendurchtrennung untersucht. Der L5 Bereich des Rückenmarks wurde für eine Immunohistochemie mit p-ERK1/2-Antikörpern behandelt; aus [115]

(b) Immunhistochemische Färbung des lumbalen Rückenmarkes von Ratten zeigt eine positive Immunoreaktivität für TRPA1 im Bereich des Hinterstrangs. aus [3]

Abbildung 5.5: Verteilungsmuster von p-ERK1/2 nach Nervendurchtrennung und TRPA1-Kanälen im lumbalen Rückenmark

Der TRPA1-Kanal ist ein essentieller Bestandteil bei der Entwicklung von mechanischer Hypersensitivität unter anderem nach Nervenligation [72, 60]. Exemplarisch für eine ERK1/2-Phosphorylierung nach externen Reiz zeigt Abb 5.5a das Rückenmark nach Ligation des Nerves L5 mit einer deutlichen Immunoreaktivität auf p-ERK1/2. Die TRPA1-Kanäle sind im Rückenmark in den selben Regionen nachweisbar (Abb. 5.5b). Viele Versuche zu chronischen Schmerzen werden oft im Tiermodell mit TRPA1-Aktivatoren durchgeführt. Die darauffolgende chronischen Anpassungsreaktion im Sinne eines Schmerzgedächtnisses sind ebenfalls mit einer ERK1/2-Phosphorylierung vergesellschaftet (weiterführende Literatur siehe: [70, 58, 115, 32, 203, 247]). Somit

gibt es bereits aus der Schmerzforschung viele Hinweise, dass eine TRPA1-Aktivierung zu einer ERK1/2-Phosphorylierung führt, so dass es sehr wahrscheinlich ist, dass der hier in HEK293-Zellen nachgewiesene Signalweg ein physiologischen Korrelat hat und sich nicht rein auf das hier dargestellte Modellsystem und Lungentumorzellen beschränkt.

5.5.3 Src-Kinasen und Pyk2 in Lungentumorzellen

Diese Arbeit beschreibt zum ersten Mal einen Zusammenhang zwischen dem TRPA1-Kanal und den Kinasen Src und Pyk2. Hierbei führte im hTRPA1-HEK293-Zellmodell eine TRPA1-Kanalaktivierung zu einer ERK1/2-Phosphorylierung als Folge einer Aktivierung der Src-Kinase und der Kinase Pyk2. Im Folgenden soll sowohl ein möglicher Mechanismus als auch eine potentielle Relevanz im Rahmen eines endogenen Zellmodells beleuchtet werden.

Möglicher Mechanismus einer Src/Pyk2-abhängigen ERK1/2-Phosphorylierung Für die zelluläre Src-Kinase als auch die Kinase Pyk2 konnte gezeigt werden, dass sie Bestandteil der TRPA1-abhängigen ERK1/2-Phosphorylierung im vorliegenden Modellsystem sind. Die zelluläre Src-Kinase ist ein Prototyp der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase-Familie, welche als Signalüberträger verschiedenster membrangebundener Rezeptoren fungiert [140]. Tyrosinkinasen wie *focal adhesion kinase* (FAK), zu denen auch Pyk2 (engl.: *proline rich tyrosine kinase*) gehört, sind bekannte Substrate von Src-Kinasen. Pyk2 ist ebenfalls eine Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase und wird vornehmlich im zentralen Nervensystem exprimiert. Sie ist aber auch in anderen Geweben beschrieben worden [27, 52, 33]. Pyk2 zeichnet sich gegenüber anderen Mitgliedern seiner Familie aus, dass es durch Calcium aktiviert werden kann [158]. Ein Mechanismus, der Src/Pyk2 mit ERK1/2 verknüpft, wird wie folgt angenommen: Die Aktivierung eines Src-Pyk2-Komplexes – im Sinne einer gegenseitigen Phosphorylierung – ermöglicht die Bindung von Grb2 (engl.: *growth factor receptor-bound protein 2*) über seine SH2-Domäne an die phosphorylierten Tyrosine von Pyk2. Grb2 kann wiederum im Komplex mit SOS (engl.: *son of sevenless*) vorliegen, einem GTP-Austauschfaktor, der die Bildung von Ras-GTP induziert. Ras-GTP ist hierbei die aktive Form des G-Proteins Ras, welches Teil der MAPK-Kaskade ist und in eine ERK1/2-Phosphorylierung mündet [224, 223, 33, 225]. Inwiefern der vorliegende Mechanismus über Grb2/SOS an einer TRPA1-abhängigen Src/Pyk2-Phosphorylierung beteiligt ist, ist bisher noch nicht näher untersucht worden und Gegenstand zukünftiger Forschung.

Pyk2 wird klassischerweise als Ausgangspunkt für die weitere Aktivierung von Signalwegen beschrieben, welche Zellproliferation, -wanderung und -überleben kontrollieren [199]. Ähnliches wurde ebenfalls für Src-Kinasen und ERK1/2 beschrieben [291, 140, 63]. Eine TRPA1-vermittelte Src/Pyk2/ERK1/2-Aktivierung könnte also relevant in Zellwachstum und Zellmigration bzw. Tumormetastasierung sein.

SCLC-Zellen Normales Lungengewebe weist nur einen geringen Anteil an Src und phosphorylierten Src-Kinasen auf [218]. Hierhingegen ist Src in SCLC-Zellen exprimiert und aktiviert [164]. Roelle *et al.* konnten zeigen, dass die Kinasen Src und Pyk2 eine relevante Rolle beim neuropeptid-vermittelten Wachstum von SCLC-Zellen spielen [215]. Eine Herabregulierung von Src und Pyk2 führte in SCLC-Zellen zu einer deutlich verminderten Proliferation und reduzierten Leveln an phosphoryliertem ERK1/2, was sich mit den Ergebnissen des HEK293-Zellmodels deckt [215]. Auch Maulik *et al.* konnten eine neuropeptid-vermittelte Pyk2-Phosphorylierung zeigen [158]. Eine Herabregulierung von Pyk2 führte zu einer reduzierten Akt-Phosphorylierung und in der Kombination mit Amrubicin, einem Chemotherapeutikum aus der Familie der Anthracycline, zu einem vermindertem Wachstum von SCLC-Zellen [259]. Ebenso konnte der in dieser Arbeit gezeigte Zusammenhang von Src und ERK1/2 durch Schäfer *et al.* in SCLC-Zellen nachgewiesen werden [221].

Basierend auf den wachstumshemmenden *in vitro* Versuchen, wurden klinische Studien mit Src-Kinase-Inhibitoren wie Dasatinib und Saracatinib durchgeführt. Leider zeigte die alleinige Therapie mit diesen Substanzen weder ein verlängertes progressionsfreies Überleben noch ein verlängertes Gesamtüberleben [165, 170]. Somit hat sich die alleinige Src-Inhibition nicht als sinnvoll herausgestellt. Ursächlich für das Therapieversagen könnte sein, dass in den Experimenten von Roelle *et al.* die Herabregulierung von Src und Pyk2 nur zu einer verminderten Proliferation der Zellen führte. Die Arbeitsgruppe um Roelle konnte aber gleichzeitig zeigen, dass es zu keiner vermehrten Apoptose dieser Zellen kam [215]. Dass die alleinige Gabe von Src-Inhibitoren also keinen Effekt in SCLC-Patienten zeigte, erscheint unter diesem Aspekt nicht verwunderlich, da hierdurch kein Absterben induziert wird, wie man es von der Wirkung anderer Substanzen auf NSCLC-Zellen kennt. Deshalb könnte man weiterhin postulieren, dass Src und Pyk2 als wachstumsrelevant gelten könnten. Möglicherweise würde die Kombination eines Src-Inhibitors zur Unterbindung weiteren Wachstums in Kombination mit einer zytotoxischen oder apoptoseinduzierenden Substanz vielversprechendere klinische Ergebnisse in der Zukunft liefern.

NSCLC Src-Kinasen sind in NSCLC exprimiert und vermehrt aktiviert [160, 155]. Ihre Inhibition führt in den meisten NSCLC-Zelllinien zur Apoptose und einer reduzierten Zellmigration und somit zu einer geringeren Metastasierung [117, 291, 142, 269]. Die im vorliegenden HEK293-Zellmodell postulierte Src-abhängige ERK1/2-Phosphorylierung konnte unsere Arbeitsgruppe in der NSCLC-Zelllinie A549 ebenfalls zeigen. Diese Beobachtung deckt sich auch mit den Befunden weiterer Arbeitsgruppen [117, 269, 291].

Wie zuvor erwähnt, liegen in NSCLC häufig Mutationen des EGFR oder von ALK (engl.: *anaplastic lymphoma kinase*), zwei Rezeptor-Tyrosinkinasen, vor (siehe Abb. 5.4). Für beide sind auf dem Markt mehrere Inhibitoren entwickelt worden, welche sich bereits in klinischer Anwendung befinden. Als Beispiele sind hier Erlotinib, Afatinib, Gefitinib und Osimertinib als EGFR-Inhibitoren und Alectinib, Crizotinib und Ceritinib als ALK-Inhibitoren zu nennen [94]. Eine *targeted therapy* mit diesen Substanzen hat sich bei vorliegender Mutation als z. T. effektiver als die klassische Chemotherapie herausgestellt. Zum Beispiel führt Erlotinib bei europäischen Patienten mit NSCLC und bekannter EGFR-Mutation zu einem verlängertem progressionsfreien Überleben von 9,7 Monaten gegenüber der Therapie mit einer Platin-basierten Chemotherapie (5,2 Monate). Auch die (partielle) Ansprechrate auf die Therapie lag mit 56 % bei Erlotinib deutlich höher als mit 15 % bei Chemotherapie [217]. Jedoch kommt es unter diesen Therapien im Verlauf häufig zu einer Resistenz gegen die Rezeptor-Tyrosinkinaseinhibitoren innerhalb von 9-12 Monaten nach Therapiebeginn [227, 217, 94]. Die häufigste Resistenz bei EGFR-Inhibitoren ist in 50 % der Fälle die Miss-Sense Mutation T790M des EGFR [243]. Alternativ ist als Resistenzmechanismus auch eine sogenannte *epithelial to mesenchymal transition* (EMT) oder eine Progression zu einem SCLC möglich, welche beide mit einem aggressiveren und invasiveren Phänotyp einhergehen [243, 229].

Auf molekularer Ebene konnten mehrere Arbeitsgruppen zeigen, dass die Resistenzbildung gegen Rezeptor-Tyrosinkinaseinhibitoren jeweils mit einer Src-Aktivierung einhergeht [297, 272]. Eine Hemmung von Src führte *in vitro* wieder zu einer Sensibilisierung für Rezeptor-Tyrosinkinaseinhibitoren sowohl in EGFR- als auch ALK-positiven, inhibitorresistenten NSCLC-Zellen [288, 181, 272, 297]. Hieraus ergab sich der Ansatz NSCLC mit entsprechender Mutation sowohl mit einem Rezeptor-Tyrosinkinaseinhibitor als auch mit Src-Inhibitoren gleichzeitig zu behandeln. Erste Phase II Studien zeigten jedoch gemischte Ergebnisse [89, 99]. Auch die reine Src-Inhibition war zwar *in vitro* vielversprechend, konnte jedoch in klinischen Studien ähnlich wie beim SCLC nicht überzeugen und ist eventuell nur für eine molekular noch nicht klassifizierte Subgruppe geeignet [117, 116, 123]. Eine Schwäche der genannten Studien liegt darin, dass die Src-Inhibitoren in einem unselektionierten Patientengut mit unbekanntem Rezeptormutationsstatus und multiplen Vortherapien getestet wurden. Ein mögliches Anwendungsgebiet von Src-Inhibitoren könnte jedoch in selektionierten

Patienten und in der Verhinderung von bestimmten Resistenzmechanismen gegen Rezeptor-Tyrosinkinaseinhibitoren in NSCLC liegen. Sesumi *et al.* konnten *in vitro* zeigen, dass eine kombinierte Erstlinientherapie von Src-Inhibitoren mit Osimertinib eine Resistenzentwicklung im Sinne einer EMT verhindern konnte [229, 272].

Eine mögliche Relevanz des TRPA1-Kanals in diesem Kontext könnte in Zusammenhang mit der Beobachtung stehen, dass Raucher insgesamt schlechter auf Rezeptor-Tyrosinkinaseinhibitoren ansprechen und früher einen Progress ihrer Erkrankung erleben [82, 128]. Sowohl das progressionsfreie Überleben (6,4 gegenüber 11,8 Monate) als auch das Gesamtüberleben (34 Monate gegenüber 46 Monate) war in Patienten mit mehr als 30 Packyears deutlich schlechter als bei Nichtrauchern [128]. Mit Abstand am schlechtesten war das progressionsfreie und das Gesamtüberleben unter Rezeptor-Tyrosinkinaseinhibitor-Therapie bei Patienten mit aktivem Zigarettengebrauch (jeweils 5 Monate und 11 Monate) [257]. Möglicherweise ist dies auf die in Abschnitt 1.2 beschriebenen oxidativen Kurz- und Langzeiteffekte des Rauchens zurückzuführen, die eine TRPA1-Kanalaktivierung auf Lungenzellen begünstigen.

Sowohl Zhang *et al.* als auch Li *et al.* konnten zeigen, dass eine Zigarettenrauchexposition von Lungentumorzellen, welche mit einer vermehrten Freisetzung von ROS einhergeht, zu einer Resistenzbildung des EGFR gegenüber Rezeptor-Tyrosinkinaseinhibitoren führt [293, 143]. Die Arbeitsgruppe um Tzipora Goldkorn konnte in diesem Kontext zeigen, dass diese Resistenz unter oxidativen Stress bzw. Zigarettenrauchexposition auf einer Phosphorylierung von anderen Tyrosinresten am EGFR beruht als sie nach EGF-Zugabe erfolgt [124]. Diese andersartige Phosphorylierung führt wie auch EGF zu einer Aktivierung des EGFR und einer ERK1/2-Phosphorylierung, reduziert jedoch dessen Responsivität auf Rezeptor-Tyrosinkinaseinhibitoren und beeinträchtigt dessen Ubiquitinierung, so dass hierdurch ein EGFR-abhängiges Tumorwachstum verstärkt wird [124, 78]. Zigarettenrauch führt des Weiteren zu einer Src-Aktivierung in Lungentumorzellen und zu einer unüblichen Bindung von phosphoryliertem Src an den EGFR [77]. Die Bindung von Src an den zigarettenrauchexponierten EGFR geht wiederum mit einer Konfirmationsänderung des EGFR einher, welche eine Inhibition durch Rezeptor-Tyrosinkinaseinhibitoren verhindert und deshalb zu einer Resistenz führt [78, 124]. Eine zelluläre Konsequenz dieser Src-abhängigen Resistenzbildung ist die bereits oben erwähnte EMT [143]. Die Zugabe eines Src-Inhibitors (PP2 und Dasatinib) oder von N-Acetyl-L-Cysteine, einem Radikalfänger, konnte die zigarettenrauchinduzierte Rezeptor-Tyrosinkinaseinhibitor-Resistenz wieder aufheben [293, 77]. Die Autoren vermuten, dass Zigarettenrauch vor allem über ROS eine Aktivierung von Src und eine Veränderung des EGFR bewirkt und so eine Rezeptor-Tyrosinkinaseinhibitor-Resistenz entsteht [293, 143]. Da der TRPA1-Kanal eben über Zigarettenrauch und ROS aktiviert wird und, wie in dieser Arbeit gezeigt, konsekutiv Src aktivieren kann, könnte er an dem beschriebenen Prozess beteiligt sein [221]. Gestützt wird diese Hypothese ebenfalls durch die Beobachtung, dass sowohl NO als auch Zigarettenrauch eine EMT in NSCLC-Zelllinien induzieren können [210, 292]. Auch konnte für N-Acetyl-L-Cystein, welches eine Rezeptor-Tyrosinkinaseinhibitor-Resistenz unterbinden kann, gezeigt werden, dass dieser den TRPA1-Kanal-Calcium-Influx nahezu vollständig hemmen kann, so dass neben einer Reduzierung der ROS auch ein TRPA1-Kanal-Antagonismus die beobachteten Effekte von N-Acetyl-L-Cystein erklären könnte, sofern der TRPA1-Kanal mit der resistenzinduzierenden Src-Aktivierung in Zusammenhang steht [242]

Interessanterweise sind nach einer Zigarettenrauchexposition sowohl der wild-typ EGFR als auch mehrere dauerhaft aktivierte Mutanten des EGFR, die ohne Zigarettenrauchexposition sensibel auf Rezeptor-Tyrosinkinaseinhibitoren wären, nicht mehr durch Rezeptor-Tyrosinkinaseinhibitoren zu inhibieren [78]. Dies schließt auch den EGFR-spezifischen Rezeptor-Tyrosinkinaseinhibitor AG1478 ein, der in dieser Arbeit verwendet wurde. In dieser Arbeit sollte eine Interaktion zwischen dem TRPA1-Kanal und dem EGFR-Rezeptor unter anderem unter Verwendung von AG1478 untersucht werden. Die Arbeitsgruppe um Goldkorn *et al.* legt nahe, dass AG1478 in Anwesenheit von oxidativen Substanzen wie Zigarettenrauch durch Src-Aktivierung und Konfirmationsänderung des EGFR keine Wirkung mehr auf den EGFR hat. Sollte NO also vergleichbar

mit Zigarettenrauch wirken, ist hier anzunehmen, dass AG1478 wegen den beschriebenen Mechanismen *per se* in den vorliegenden Versuchen (Abschnitt Ergebnisse, Abb. 4.21) keine Wirkung auf den EGFR hat. Auch konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der TRPA1-Kanal über Src seine Effekte vermittelt. Über Src könnte es zu einer konstitutiven AG1478-unabhängigen Aktivierung des EGFR kommen, so dass kein Effekt von AG1478 zu beobachten wäre. Somit kann rückblickend eine Interaktion zwischen dem TRPA1-Kanal und dem EGFR-Rezeptor nicht mehr sicher ausgeschlossen werden [78, 77]. Ganz im Gegenteil ist, da für den EGFR bereits gezeigt werden konnte, dass er über Src transaktiviert werden kann, nun auch denkbar, dass eine TRPA1-vermittelte Src-abhängige Transaktivierung des EGFR vorliegen könnte [285].

Das ebenso im Modellsystem als relevant identifizierte Pyk2 ist auch *in vivo* in NSCLC-Zellen überexprimiert [296]. Auch zeigte sich eine stärkere Pyk2-Phosphorylierung in Zelllinien mit höherem Potential zur Metastasierung, welche ebenfalls mit einer vermehrten ERK1/2-Phosphorylierung positiv korrelierte [296]. Dies deckt sich auch mit der klinischen Beobachtung, dass eine vermehrte Pyk2-Expression vor allem in fortgeschritteneren Tumorstadien und Metastasen zu finden ist [136]. Unabhängig vom Tumorstadium war eine erhöhte Pyk2-Expression in NSCLC mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert [136]. Der Einfluss von Pyk2 auf die oben beschriebene Resistenz gegen Rezeptor-Tyrosinkinaseinhibitoren in NSCLC, ist bisher noch nicht untersucht worden.

Ob Src oder Pyk2 bereits in unbehandelten NSCLC ein relevantes Treibermolekül für die Tumorgenese darstellen, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht sicher sagen, auch wenn bereits in Lungenpräkanzerosen erste Veränderungen im Sinne einer Überexpression von Src und FAK, einem Verwandten von Pyk2, zu finden sind und Pyk2 in NSCLC ebenfalls überexprimiert ist [184, 296]. Jedoch scheint Pyk2 für die Gesamtprognose und Src vor allem bei der Resistenzentwicklung gegenüber Rezeptor-Tyrosinkinaseinhibitoren in NSCLC bei Rauchern eine zentrale Rolle zu spielen. Da der TRPA1-Kanal, wie in dieser Arbeit gezeigt, über zigarettenrauchinduzierten, oxidativen Stress Src aktivieren kann, könnte er einen neuen, bisher nicht identifizierten Angriffspunkt bei der Vermeidung einer Resistenz gegen Rezeptor-Tyrosinkinaseinhibitoren darstellen. Eine Inhibition des Kanals könnte möglicherweise eine vorzeitige Resistenzbildung bei Rauchern oder ehemaligen Rauchern verhindern.

5.5.4 TRPA1-Kanäle und Wachstum von Lungentumorzellen

Da der TRPA1-Kanal bisher nur wenig im Kontext von Lungentumorzellen untersucht wurde, gibt es nach jetzigem Kenntnisstand nur die Publikation von Schäfer *et al.* zur Proliferation von SCLC-Zellen. Die Herabregulierung der TRPA1-Expression mittels siRNA führte hier zu einem massiven Wachstumsarrest trotz Anwesenheit von wachstumsstimulierenden FCS. Gleichzeitig führte eine TRPA1-Stimulation zu einer Unterbindung von Apoptose-Signalen und förderte das Wachstum von SCLC-Zellen [221]. Dies lässt vermuten, dass die Anwesenheit mit Aktivierung des TRPA1-Kanals hoch relevant für das Wachstum von SCLC ist, was sich auch mit seiner starken Expression in SCLC-Zellen gegenüber normalem Lungengewebe decken würde. Des Weiteren scheint der TRPA1-Kanal, gerade in einem Umfeld mit TRPA1-Agonisten wie Zigarettenrauch und vermehrter endogener NO-Produktion (siehe Abschnitt 1.2), das Zellwachstum zusätzlich zu fördern und Apoptose-Mechanismen gleichzeitig zu unterbinden. Möglicherweise könnte der TRPA1-Kanal deshalb ursächlich für die Beobachtung sein, dass die Beendigung des Rauchens nach Diagnosestellung eines SCLC das Sterberisiko um 45 % und die Wahrscheinlichkeit eines Rezidives beziehungsweise eines Therapieversagens um 41 % reduziert [45].

6 Ausblick: der TRPA1-Kanal als neue Zielstruktur in Lungentumoren

In der vorliegenden Arbeit konnte erfolgreich ein Modellsystem etabliert werden, welches ein besseres Verständnis des TRPA1-Kanals und der von ihm induzierten Signalwege ermöglicht. Nach aktuellem Wissensstand ist eine Übertragbarkeit der im Modellsystem gewonnen Befunde in ein endogenes Zellsystem gegeben. Bei einer Übertragung des Modellsystems in den Kontext von Lungentumoren könnte der TRPA1-Kanal die beobachteten Zusammenhänge zwischen Lungentumoraggressivität, Zigarettenrauchexposition und NO verknüpfen und neu erklären.

Der TRPA1-Kanal lässt sich sowohl durch NO als auch durch andere Entzündungsmediatoren und ROS aktivieren. Ebenso kann Zigarettenrauch über verschiedene Inhaltsstoffe (unter anderem NO) den TRPA1-Kanal aktivieren und gleichzeitig in der Lunge eine chronische Inflammation anstoßen. Deshalb könnte der TRPA1-Kanal auch als ein Mittler zur Bündelung von inflammatorisch-toxischen Stoffen in der Lungen angesehen werden [249, 4, 252, 246, 200, 5, 186, 80, 40]. Des Weiteren wird die Expression des TRPA1-Kanals in der Lunge durch Zigarettenrauch induziert und ist deutlich stärker auf Lungentumoren als in gesundem Lungengewebe zu finden [190, 197, 221].

Ein SCLC entsteht nahezu ausschließlich bei Rauchern und die stärkste Expression des TRPA1-Kanals im Vergleich zu anderen Lungentumoren findet sich auf SCLC-Zellen [221, 74]. Für SCLC-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit eines aktivierten TRPA1-Kanals sich positiv auf die Zellproliferation auswirkt, Apoptosesignale vermindert werden und eine Herabregulierung der TRPA1-Expression zu einem massiven Rückgang des Tumorwachstums führt [221]. Hier könnte also der TRPA1-Kanal ein mögliches Bindeglied zwischen Rauchen und der Entstehung von SCLC darstellen. In NSCLC könnte der TRPA1-Kanal vor allem bei der Resistenzentwicklung gegenüber Rezeptor-Tyrosinkinaseinhibitoren bei Rauchern relevant sein, da sich hier eine starke Korrelation zwischen dem Rauchverhalten und dem Therapieansprechen auf Rezeptor-Tyrosinkinaseinhibitoren zeigt, die auch mit der Menge an vorhandenen ROS in Zusammenhang steht [143, 293, 128, 82]. Letztendlich bleibt der Beweis dieser Hypothesen jedoch Aufgabe zukünftiger Forschung.

Sollten sich die hier generierten Hypothesen bewahrheiten, kommt den noch zu entwickelnden klinischen TRPA1-Antagonisten ein neues Anwendungsgebiet zu. Bisherige Bemühungen TRPA1-Antagonisten zu entwickeln entstammen dem eigentlichen großen Hauptforschungsbereich des TRPA1-Kanals – der Schmerzforschung. Da der TRPA1-Kanal diesbezüglich ausgiebig untersucht wurde, gibt es Bemühungen TRPA1-Antagonisten zur Behandlung chronischen Schmerzes oder inflammatorischer (Schmerz-) Erkrankungen zu entwickeln [236, 185, 235]. Sollte ein klinisch anwendbarer Antagonist des TRPA1-Kanals in den nächsten Jahren auf den Markt kommen, so könnte er basierend auf der vorliegenden Arbeit gegebenenfalls auch Anwendung im Bereich der Lungenkrebstherapie finden.

Zusammenfassend könnte der TRPA1-Kanal einen neuen Angriffspunkt in der Behandlung von Lungentumoren darstellen und so neue therapeutische Möglichkeiten eröffnen. Ein Anwendungsgebiet von TRPA1-Antagonisten könnte vor allem in der Prävention zigarettenrauchbedingter Tumorprogression, -aggressivität, Chemotherapie- oder Rezeptor-Tyrosinkinaseinhibitor-Resistenz oder der allgemeinen Prognoseverschlechterung bei aktivem oder ehemaligem Zigarettenkonsum liegen.

Literatur

[1] Jun-ichi Adachi, Keizou Ookawa, Masayuki Shiseki, Tomoko Okazaki, Shigeki Tsuchida, Kazuhiro Morishita, and Jun Yokota. Induction of apoptosis but not g1 arrest by expression of the wild-type p53 gene in small cell lung carcinoma. *Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 7(7):879–886, 1996.

[2] B. Alberts. Molecular biology of the cell by bruce alberts, alexander johnson, julian lewis, martin raff, keith roberts, and peter walter, taylor & francis ltd., 2007. isbn-10: 0815341067 isbn-13: 978-0815341062. 5(12):1392, Dec 2007.

[3] David A. Andersson, Clive Gentry, Lisa Alenmyr, Dan Killander, Simon E. Lewis, Anders Andersson, Bernard Bucher, Jean-Luc Galzi, Olov Sterner, Stuart Bevan, Edward D. Högestätt, and Peter M. Zygmunt. Trpa1 mediates spinal antinociception induced by acetaminophen and the cannabinoid delta(9)-tetrahydrocannabiorcol. *Nat Commun*, 2:551, 2011.

[4] David A. Andersson, Clive Gentry, Sian Moss, and Stuart Bevan. Transient receptor potential a1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J Neurosci*, 28(10):2485–2494, Mar 2008.

[5] Eunice Andre, Barbara Campi, Serena Materazzi, Marcello Trevisani, Silvia Amadesi, Daniela Massi, Christophe Creminon, Natalya Vaksman, Romina Nassini, Maurizio Civelli, et al. Cigarette smoke–induced neurogenic inflammation is mediated by α, β-unsaturated aldehydes and the trpa1 receptor in rodents. *The Journal of clinical investigation*, 118(7):2574, 2008.

[6] Spencer R Andrei, Monica Ghosh, Pritam Sinharoy, Souvik Dey, Ian N Bratz, and Derek S Damron. Trpa1 ion channel stimulation enhances cardiomyocyte contractile function via a camkii-dependent pathway. *Channels*, pages 1–17, 2017.

[7] W. P. Arnold, C. K. Mittal, S. Katsuki, and F. Murad. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(8):3203–3207, Aug 1977.

[8] Ruzanna Atoyan, Doug Shander, and Natalia V. Botchkareva. Non-neuronal expression of transient receptor potential type a1 (trpa1) in human skin. *J Invest Dermatol*, 129(9):2312–2315, Sep 2009.

[9] Katrin Julia Audrit, Lucas Delventhal, Oeznur Aydin, and Christina Nassenstein. The nervous system of airways and its remodeling in inflammatory lung diseases. *Cell and tissue research*, 367:571–590, March 2017.

[10] Michaela Auer-Grumbach, Andrea Olschewski, Lea Papic, Hannie Kremer, Meriel E. McEntagart, Sabine Uhrig, Carina Fischer, Eleonore Fröhlich, Zoltán Bálint, Bi Tang, Heimo Strohmaier, Hanns Lochmueller, Beate Schlotter-Weigel, Jan Senderek, Angelika Krebs, Katherine J. Dick, Richard Petty, Cheryl Longman, Neil E. Anderson, George W. Padberg, Helenius J. Schelhaas, Conny M A. van Ravenswaaij-Arts, Thomas R. Pieber, Andrew H. Crosby, and Christian Guelly. Alterations in the ankyrin domain of trpv4 cause congenital distal sma, scapuloperoneal sma and hmsn2c. *Nat Genet*, 42(2):160–164, Feb 2010.

[11] Neelam Azad, Val Vallyathan, Liying Wang, Vimon Tantishaiyakul, Christian Stehlik, Stephen S Leonard, and Yon Rojanasakul. S-nitrosylation of bcl-2 inhibits its ubiquitin-proteasomal degradation. a novel antiapoptotic mechanism that suppresses apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 281:34124–34134, November 2006.

[12] G. Bach. Mucolipidosis type iv. *Mol Genet Metab*, 73(3):197–203, Jul 2001.

[13] D Baltimore. Rna-dependent dna polymerase in virions of rna tumour viruses. *Nature*, 226:1209–1211, June 1970.

[14] Michael Bandell, Gina M. Story, Sun Wook Hwang, Veena Viswanath, Samer R. Eid, Matt J. Petrus, Taryn J. Earley, and Ardem Patapoutian. Noxious cold ion channel trpa1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron*, 41(6):849–857, Mar 2004.

[15] Sangsu Bang and Sun Wook Hwang. Polymodal ligand sensitivity of trpa1 and its modes of interactions. *J Gen Physiol*, 133(3):257–262, Mar 2009.

[16] Diana M Bautista, Sven-Eric Jordt, Tetsuro Nikai, Pamela R Tsuruda, Andrew J Read, Jeannie Poblete, Ebenezer N Yamoah, Allan I Basbaum, and David Julius. Trpa1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell*, 124:1269–1282, March 2006.

[17] Diana M. Bautista, Pouya Movahed, Andrew Hinman, Helena E. Axelsson, Olov Sterner, Edward D. Högestätt, David Julius, Sven-Eric Jordt, and Peter M. Zygmunt. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel trpa1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(34):12248–12252, Aug 2005.

[18] Diana M. Bautista, Maurizio Pellegrino, and Makoto Tsunozaki. Trpa1: A gatekeeper for inflammation. *Annu Rev Physiol*, 75:181–200, 2013.

[19] Lydia A Bazzano, Jiang He, Paul Muntner, Suma Vupputuri, and Paul K Whelton. Relationship between cigarette smoking and novel risk factors for cardiovascular disease in the united states. *Annals of internal medicine*, 138:891–897, June 2003.

[20] DJ Beech, SZ Xu, D McHugh, and R Flemming. Trpc1 store-operated cationic channel subunit. *Cell calcium*, 33(5):433–440, 2003.

[21] Andrew Beekman, Barbara Helfrich, Paul A Bunn, and Lynn E Heasley. Expression of catalytically inactive phospholipase cβ disrupts phospholipase cβ and mitogen-activated protein kinase signaling and inhibits small cell lung cancer growth. *Cancer Research*, 58(5):910–913, 1998.

[22] S. Benemei, C. Fusi, Gabriela Trevisan, and Pierangelo Geppetti. The trpa1 channel in migraine mechanism and treatment. *Br J Pharmacol*, 171(10):2552–2567, May 2014.

[23] Y Beny and T Kimchi. Conditioned odor aversion induces social anxiety towards females in wild-type and trpc2 knockout male mice. *Genes, brain, and behavior*, 15:722–732, November 2016.

[24] C Berr, EAM Schaefer, T Gudermann, and TRH Buech. Guanylyl cyclase independent signaling of nitric oxide via trpa1. In *Naunyn-Schmiedebergs Archives Of Pharmacology*, volume 386, pages S9–S9, 2013.

[25] Bret F Bessac and Sven-Eric Jordt. Sensory detection and responses to toxic gases: mechanisms, health effects, and countermeasures. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 7:269–277, July 2010.

[26] Bret F Bessac, Michael Sivula, Christian A von Hehn, Jasmine Escalera, Lauren Cohn, and Sven-Eric Jordt. Trpa1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons. *The Journal of clinical investigation*, 118:1899–1910, May 2008.

[27] Anirban Bhattachariya, Karolina M. Turczynska, Mario Grossi, Ina Nordström, Leonard Buckbinder, Sebastian Albinsson, and Per Hellstrand. Pyk2 selectively mediates signals for growth versus differentiation in response to stretch of spontaneously active vascular smooth muscle. *Physiol Rep*, 2(7), 2014.

[28] Ka Bian, Marie-Françoise Doursout, and Ferid Murad. Vascular system: role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 10(4):304–310, Apr 2008.

[29] P L BIDSTRUP. Cancer of the lung in nickel, arsenic and chromate workers. *Archives belges de medecine sociale, hygiene, medecine du travail et medecine legale. Belgisch archief van sociale geneeskunde, hygiene, arbeidsgeneeskunde en gerechtelijke geneeskunde*, 8:500–506, October 1950.

[30] Andreas Binder, Denisa May, Ralf Baron, Christoph Maier, Thomas R. Tölle, Rolf-Detlef Treede, Achim Berthele, Frank Faltraco, Herta Flor, Janne Gierthmühlen, Sierk Haenisch, Volker Huge, Walter Magerl, Christian Maihöfner, Helmut Richter, Roman Rolke, Andrea Scherens, Nurcan Uçeyler, Mike Ufer, Gunnar Wasner, Jihong Zhu, and Ingolf Cascorbi. Transient receptor potential channel polymorphisms are associated with the somatosensory function in neuropathic pain patients. *PLoS One*, 6(3):e17387, 2011.

[31] F. Blachier, D. Briand, M. Selamnia, V. Robert, G. Guihot, and C. Mayeur. Differential inhibitory effects of three nitric oxide donors on ornithine decarboxylase activity in human colon carcinoma cells. *Biochem Pharmacol*, 55(8):1235–1239, Apr 1998.

[32] Kim T. Blackwell and Joanna Jedrzejewska-Szmek. Molecular mechanisms underlying neuronal synaptic plasticity: systems biology meets computational neuroscience in the wilds of synaptic plasticity. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 5(6):717–731, 2013.

[33] A. Blaukat, I. Ivankovic-Dikic, E. Grönroos, F. Dolfi, G. Tokiwa, K. Vuori, and I. Dikic. Adaptor proteins grb2 and crk couple pyk2 with activation of specific mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem*, 274(21):14893–14901, May 1999.

[34] H. Bohn and K. Schönafinger. Oxygen and oxidation promote the release of nitric oxide from sydnonimines. *J Cardiovasc Pharmacol*, 14 Suppl 11:S6–12, 1989.

[35] D C BRAUN and T D TRUAN. An epidemiological study of lung cancer in asbestos miners. *A.M.A. archives of industrial health*, 17:634–653, June 1958.

[36] F V Brozovich, C J Nicholson, C V Degen, Yuan Z Gao, M Aggarwal, and K G Morgan. Mechanisms of vascular smooth muscle contraction and the basis for pharmacologic treatment of smooth muscle disorders. *Pharmacological reviews*, 68:476–532, April 2016.

[37] Thomas Robert Heinrich Büch, Eva Anna Maria Schäfer, Maria-Theresia Demmel, Ingrid Boekhoff, Horst Thiermann, Thomas Gudermann, Dirk Steinritz, and Annette Schmidt. Functional expression of the transient receptor potential channel trpa1, a sensor for toxic lung inhalants, in pulmonary epithelial cells. *Chemico-biological interactions*, 206(3):462–471, Dec 2013.

[38] S. A. Bustin. Absolute quantification of mrna using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25(2):169–193, Oct 2000.

[39] Ana I Caceres, Marian Brackmann, Maxwell D Elia, Bret F Bessac, Donato del Camino, Marc D'Amours, JoAnn S Witek, Chistopher M Fanger, Jayhong A Chong, Neil J Hayward, Robert J Homer, Lauren Cohn, Xiaozhu Huang, Magdalene M Moran, and Sven-Eric Jordt. A sensory neuronal ion channel essential for airway inflammation and hyperreactivity in asthma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106:9099–9104, June 2009.

[40] Carlos Campos, Rodrigo Guzman, Encarnacion Lopez-Fernandez, and Angela Casado. Urinary biomarkers of oxidative/nitrosative stress in healthy smokers. *Inhalation toxicology*, 23:148–156, February 2011.

[41] Chao Cao, Tianwen Lai, Miao Li, Hongbin Zhou, Dan Lv, Zaichun Deng, Songmin Ying, Zhihua Chen, Wen Li, and Huahao Shen. Smoking-promoted oxidative dna damage response is highly correlated to lung carcinogenesis. *Oncotarget*, 7:18919–18926, April 2016.

[42] M J Caterina, M A Schumacher, M Tominaga, T A Rosen, J D Levine, and D Julius. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389:816–824, October 1997.

[43] J Chameaud, R Perraud, and J Lafuma. [experimental cancers of the lung induced in the rat by radon inhalation]. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences. Serie D: Sciences naturelles*, 273:2388–2389, December 1971.

[44] Bryan A Chan and Brett GM Hughes. Targeted therapy for non-small cell lung cancer: current standards and the promise of the future. *Translational lung cancer research*, 4(1):36, 2015.

[45] Jun Chen, Ruoxiang Jiang, Yolanda I Garces, Aminah Jatoi, Shawn M Stoddard, Zhifu Sun, Randolph S Marks, Yunpeng Liu, and Ping Yang. Prognostic factors for limited-stage small cell lung cancer: a study of 284 patients. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 67:221–226, February 2010.

[46] Jun Chen and Philip R. Kym. Trpa1: the species difference. *J Gen Physiol*, 133(6):623–625, Jun 2009.

[47] Jun Chen, Marc R. Lake, Reza S. Sabet, Wende Niforatos, Steve D. Pratt, Steven C. Cassar, Jing Xu, Sujatha Gopalakrishnan, Ana Pereda-Lopez, Murali Gopalakrishnan, Thomas F. Holzman, Robert B. Moreland, Karl A. Walter, Connie R. Faltynek, Usha Warrior, and Victoria E. Scott. Utility of large-scale transiently transfected cells for cell-based high-throughput screens to identify transient receptor potential channel a1 (trpa1) antagonists. *J Biomol Screen*, 12(1):61–69, Feb 2007.

[48] Lu Chen, Qian Li, Xiang-dong Zhou, Yu Shi, Lang Yang, Sen-lin Xu, Cong Chen, You-hong Cui, Xia Zhang, and Xiu-wu Bian. Increased pro-angiogenic factors, infiltrating neutrophils and cd163(+) macrophages in bronchoalveolar lavage fluid from lung cancer patients. *International immunopharmacology*, 20:74–80, May 2014.

[49] Wen-Liang Chen, Andrew Barszczyk, Ekaterina Turlova, Marielle Deurloo, Baosong Liu, Burton B. Yang, James T. Rutka, Zhong-Ping Feng, and Hong-Shuo Sun. Inhibition of trpm7 by carvacrol suppresses glioblastoma cell proliferation, migration and invasion. *Oncotarget*, 6(18):16321–16340, Jun 2015.

[50] Dezhi Cheng, Liang Zhao, Yunsheng Xu, Rongying Ou, Gang Li, Han Yang, and Wenfeng Li. K-ras promotes the non-small lung cancer cells survival by cooperating with sirtuin 1 and p27 under ros stimulation. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36:7221–7232, September 2015.

[51] Masato Chiba, Yosuke Togashi, Shuta Tomida, Hiroshi Mizuuchi, Yu Nakamura, Eri Banno, Hidetoshi Hayashi, Masato Terashima, Marco A De Velasco, Kazuko Sakai, Yoshihiko Fujita, Tetsuya Mitsudomi, and Kazuto Nishio. Mek inhibitors against met-amplified non-small cell lung cancer. *International journal of oncology*, 49:2236–2244, December 2016.

[52] Peter Tzu-Yu Chien, Chih-Chung Lin, Li-Der Hsiao, and Chuen-Mao Yang. c-src/pyk2/egfr/pi3k/akt/creb-activated pathway contributes to human cardiomyocyte hypertrophy: Role of cox-2 induction. *Mol Cell Endocrinol*, 409:59–72, Jul 2015.

[53] David Chiluiza, Sneha Krishna, Valérie A Schumacher, and Johannes Schlöndorff. Gain-of-function mutations in transient receptor potential c6 (trpc6) activate extracellular signal-regulated kinases 1/2 (erk1/2). *Journal of Biological Chemistry*, 288(25):18407–18420, 2013.

[54] P. Chomczynski and N. Sacchi. Single-step method of rna isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162(1):156–159, Apr 1987.

[55] Mukaddes Colakogullari, Engin Ulukaya, Arzu Yilmaztepe, Gokhan Ocakoglu, Meryem Yilmaz, Mehmet Karadag, and Asuman Tokullugil. Higher serum nitrate levels are associated with poor survival in lung cancer patients. *Clinical biochemistry*, 39:898–903, September 2006.

[56] David P. Corey, Jaime Garcia-Anoveros, J.a-Anoveros, Jeffrey R. Holt, Kelvin Y. Kwan, Shuh-Yow Lin, Melissa A. Vollrath, Andrea Amalfitano, Eunice L-M. Cheung, Bruce H. Derfler, Anne Duggan, Gwénaëlle S G. Géléoc, Paul A. Gray, Matthew P. Hoffman, Heidi L. Rehm, Daniel Tamasauskas, and Duan-Sun Zhang. Trpa1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature*, 432(7018):723–730, Dec 2004.

[57] D. J. Cosens and A. Manning. Abnormal electroretinogram from a drosophila mutant. *Nature*, 224(5216):285–287, Oct 1969.

[58] Eric D. Crown. The role of mitogen activated protein kinase signaling in microglia and neurons in the initiation and maintenance of chronic pain. *Exp Neurol*, 234(2):330–339, Apr 2012.

[59] Teresa L. Cvetkov, Kevin W. Huynh, Matthew R. Cohen, and Vera Y. Moiseenkova-Bell. Molecular architecture and subunit organization of trpa1 ion channel revealed by electron microscopy. *J Biol Chem*, 286(44):38168–38176, Nov 2011.

[60] Diogo Santos M. da Costa, Flavia Carla Meotti, Edinéia Lemos Andrade, Paulo César Leal, Emerson Marcelo Motta, and João B. Calixto. The involvement of the transient receptor potential a1 (trpa1) in the maintenance of mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation. *Pain*, 148(3):431–437, Mar 2010.

[61] Yi Dai, Shenglan Wang, Makoto Tominaga, Satoshi Yamamoto, Tetsuo Fukuoka, Tomohiro Higashi, Kimiko Kobayashi, Koichi Obata, Hiroki Yamanaka, and Koichi Noguchi. Sensitization of trpa1 by par2 contributes to the sensation of inflammatory pain. *J Clin Invest*, 117(7):1979–1987, Jul 2007.

[62] Thomas P Davis, Susan Crowell, Brena McInturff, Renee Louis, and Terry Gillespie. Neurotensin may function as a regulatory peptide in small cell lung cancer. *Peptides*, 12(1):17–23, 1991.

[63] Xavier Deschênes-Simard, Filippos Kottakis, Sylvain Meloche, and Gerardo Ferbeyre. Erks in cancer: friends or foes? *Cancer Res*, 74(2):412–419, Jan 2014.

[64] Alexander Dietrich, Michael Mederos y Schnitzler, Hermann Kalwa, Ursula Storch, and Thomas Gudermann. Functional characterization and physiological relevance of the trpc3/6/7 subfamily of cation channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 371(4):257–265, Apr 2005.

[65] Josef Donnerer and Ingrid Liebmann. Phosphorylation of erk1/2 in dorsal root ganglia following sequential mustard oil and thermal stimulation of the rat hind paw. *Pharmacology*, 89(1-2):7–12, 2012.

[66] Josef Donnerer, Ingrid Liebmann, and Rufina Schuligoi. Capsaicin- and mustard oil-induced extracellular signal-regulated protein kinase phosphorylation in sensory neurons in vivo: effects of neurokinins 1 and 2 receptor antagonists and of a nitric oxide synthase inhibitor. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 104(1):11–16, Jan 2009.

[67] L. M. Duncan, J. Deeds, J. Hunter, J. Shao, L. M. Holmgren, E. A. Woolf, R. I. Tepper, and A. W. Shyjan. Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Res*, 58(7):1515–1520, Apr 1998.

[68] Scott Earley. Trpa1 channels in the vasculature. *Br J Pharmacol*, 167(1):13–22, Sep 2012.

[69] Mirjam Eberhardt, Maria Dux, Barbara Namer, Jan Miljkovic, Nada Cordasic, Christine Will, Tatjana I Kichko, Jeanne de la Roche, Michael Fischer, Sebastián A Suárez, Damian Bikiel, Karola Dorsch, Andreas Leffler, Alexandru Babes, Angelika Lampert, Jochen K Lennerz, Johannes Jacobi, Marcelo A Marti, Fabio Doctorovich, Edward D Högestätt, Peter M Zygmunt, Ivana Ivanovic-Burmazovic, Karl Messlinger, Peter Reeh, and Milos R Filipovic. H2s and no cooperatively regulate vascular tone by activating a neuroendocrine hno-trpa1-cgrp signalling pathway. *Nature communications*, 5:4381, July 2014.

[70] Rebecca M. Edelmayer, Jill-Desiree Brederson, Michael F. Jarvis, and Robert S. Bitner. Biochemical and pharmacological assessment of map-kinase signaling along pain pathways in experimental rodent models: a potential tool for the discovery of novel antinociceptive therapeutics. *Biochem Pharmacol*, 87(3):390–398, Feb 2014.

[71] Timothy J Egan, Mario A Acuña, Marcy Zenobi-Wong, Hanns Ulrich Zeilhofer, and David Urech. Effects of n-glycosylation of the human cation channel trpa1 on agonist-sensitivity. *Bioscience reports*, 36(5):e00390, 2016.

[72] Samer R. Eid, Eric D. Crown, Eric L. Moore, Hongyu A. Liang, Kar-Chan Choong, Shelley Dima, Darrell A. Henze, Stefanie A. Kane, and Mark O. Urban. Hc-030031, a trpa1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity. *Mol Pain*, 4:48, 2008.

[73] Hidir Esme, Mustafa Cemek, Murat Sezer, Hayrettin Saglam, Adalet Demir, Huseyin Melek, and Mehmet Unlu. High levels of oxidative stress in patients with advanced lung cancer. *Respirology (Carlton, Vic.)*, 13:112–116, January 2008.

[74] Majid Ezzati, S Jane Henley, Alan D Lopez, and Michael J Thun. Role of smoking in global and regional cancer epidemiology: current patterns and data needs. *International journal of cancer*, 116:963–971, October 2005.

[75] Otto Fajardo, Victor Meseguer, Carlos Belmonte, and Félix Viana. Trpa1 channels: novel targets of 1,4-dihydropyridines. *Channels (Austin)*, 2(6):429–438, 2008.

[76] Carlos K B. Ferrari, Paula C S. Souto, Eduardo L. França, and Adenilda C. Honorio-França. Oxidative and nitrosative stress on phagocytes' function: from effective defense to immunity evasion mechanisms. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 59(6):441–448, Dec 2011.

[77] Simone Filosto, David S Baston, Samuel Chung, Cathleen R Becker, and Tzipora Goldkorn. Src mediates cigarette smoke-induced resistance to tyrosine kinase inhibitors in nsclc cells. *Molecular cancer therapeutics*, 12:1579–1590, August 2013.

[78] Simone Filosto, Cathleen R Becker, and Tzipora Goldkorn. Cigarette smoke induces aberrant egf receptor activation that mediates lung cancer development and resistance to tyrosine kinase inhibitors. *Molecular cancer therapeutics*, 11:795–804, April 2012.

[79] Alessandra Fiorio Pla, Daniele Avanzato, Luca Munaron, and Indu S. Ambudkar. Ion channels and transporters in cancer. 6. vascularizing the tumor: Trp channels as molecular targets. *Am J Physiol Cell Physiol*, 302(1):C9–15, Jan 2012.

[80] T M Flicker and S A Green. Comparison of gas-phase free-radical populations in tobacco smoke and model systems by hplc. *Environmental health perspectives*, 109:765–771, August 2001.

[81] H Fujimoto, Y Ando, T Yamashita, H Terazaki, Y Tanaka, J Sasaki, M Matsumoto, M Suga, and M Ando. Nitric oxide synthase activity in human lung cancer. *Japanese journal of cancer research : Gann*, 88:1190–1198, December 1997.

[82] Tatsuro Fukuhara, Makoto Maemondo, Akira Inoue, Kunihiko Kobayashi, Shunichi Sugawara, Satoshi Oizumi, Hiroshi Isobe, Akihiko Gemma, Masao Harada, Hirohisa Yoshizawa, Ichiro Kinoshita, Yuka Fujita, Yasuo Saijo, Koichi Hagiwara, Satoshi Morita, and Toshihiro Nukiwa. Factors associated with a poor response to gefitinib in the nej002 study: smoking and the l858r mutation. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 88:181–186, May 2015.

[83] Dai Fukumura, Satoshi Kashiwagi, and Rakesh K Jain. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nature reviews. Cancer*, 6:521–534, July 2006.

[84] Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut (Hrsg). Bericht zum krebsgeschehen in deutschland 2016., Berlin 2016.

[85] C. García-MartÃnez, C. Morenilla-Palao, R. Planells-Cases, J. M. Merino, and A. Ferrer-Montiel. Identification of an aspartic residue in the p-loop of the vanilloid receptor that modulates pore properties. *J Biol Chem*, 275(42):32552–32558, Oct 2000.

[86] Rachelle Gaudet. A primer on ankyrin repeat function in trp channels and beyond. *Mol Biosyst*, 4(5):372–379, May 2008.

[87] Ruiliang Ge, Yilin Tai, Yuanyuan Sun, Kechun Zhou, Shenglian Yang, Tianlin Cheng, Qifei Zou, Feng Shen, and Yizheng Wang. Critical role of trpc6 channels in vegf-mediated angiogenesis. *Cancer letters*, 283:43–51, September 2009.

[88] Sharon A Glynn, Brenda J Boersma, Tiffany H Dorsey, Ming Yi, Harris G Yfantis, Lisa A Ridnour, Damali N Martin, Christopher H Switzer, Robert S Hudson, David A Wink, Dong H Lee, Robert M Stephens, and Stefan Ambs. Increased nos2 predicts poor survival in estrogen receptor-negative breast cancer patients. *The Journal of clinical investigation*, 120:3843–3854, November 2010.

[89] Kathryn A Gold, J Jack Lee, Nusrat Harun, Ximing Tang, Justina Price, Jitesh D Kawedia, Hai T Tran, Jeremy J Erasmus, George R Blumenschein, William N William, Ignacio I Wistuba, and Faye M Johnson. A phase i/ii study combining erlotinib and dasatinib for non-small cell lung cancer. *The oncologist*, 19:1040–1041, October 2014.

[90] Megan S. Grace and Maria G. Belvisi. Trpa1 receptors in cough. *Pulm Pharmacol Ther*, 24(3):286–288, Jun 2011.

[91] F. L. Graham, J. Smiley, W. C. Russell, and R. Nairn. Characteristics of a human cell line transformed by dna from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36(1):59–74, Jul 1977.

[92] J. D. Graves, J. S. Campbell, and E. G. Krebs. Protein serine/threonine kinases of the mapk cascade. *Ann N Y Acad Sci*, 766:320–343, Sep 1995.

[93] Stephen L Graziano, Andrea M Pfeifer, Joseph R Testa, George E Mark, Bruce E Johnson, Edward J Hallinan, Olive S Pettengill, George D Sorenson, Arthur H Tatum, Hiltrud Brauch, et al. Involvement of the rafi locus, at band 3p25, in the 3p deletion of small-cell lung cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 3(4):283–293, 1991.

[94] Ryan Griffin and Robert A Ramirez. Molecular targets in non-small cell lung cancer. *The Ochsner journal*, 17:388–392, 2017.

[95] Thomas Gudermann, Thomas Hofmann, Michael Mederos y Schnitzler, and Alexander Dietrich. Activation, subunit composition and physiological relevance of dag-sensitive trpc proteins. *Novartis Foundation symposium*, 258:103–18; discussion 118–22, 155–9, 263–6, 2004.

[96] Abhilasha Gupta, Shruti Srivastava, Rajendra Prasad, Shanker M Natu, Balraj Mittal, Mahendra P S Negi, and Anand N Srivastava. Smoking intensity, oxidative stress and chemotherapy in nonsmall cell lung cancer: a correlated prognostic study. *Bioscience trends*, 3:191–199, October 2009.

[97] Roger C Hardie. Regulation of trp channels via lipid second messengers. *Annual review of physiology*, 65:735–759, 2003.

[98] Noriyuki Hatano, Yuka Itoh, Hiroka Suzuki, Yukiko Muraki, Hidetoshi Hayashi, Kikuo Onozaki, Ian C Wood, David J Beech, and Katsuhiko Muraki. Hypoxia-inducible factor-1α (hif1α) switches on transient receptor potential ankyrin repeat 1 (trpa1) gene expression via a hypoxia response element-like motif to modulate cytokine release. *Journal of Biological Chemistry*, 287(38):31962–31972, 2012.

[99] Eric B Haura, Tawee Tanvetyanon, Alberto Chiappori, Charles Williams, George Simon, Scott Antonia, Jhanelle Gray, Sharon Litschauer, Leticia Tetteh, Anthony Neuger, Lanxi Song, Bhupendra Rawal, Michael J Schell, and Gerold Bepler. Phase i/ii study of the src inhibitor dasatinib in combination with erlotinib in advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28:1387–1394, March 2010.

[100] L E Heasley. Autocrine and paracrine signaling through neuropeptide receptors in human cancer. *Oncogene*, 20:1563–1569, March 2001.

[101] Kara F. Held and Wolfgang R. Dostmann. Sub-nanomolar sensitivity of nitric oxide mediated regulation of cgmp and vasomotor reactivity in vascular smooth muscle. *Front Pharmacol*, 3:130, 2012.

[102] Andrew Hinman, Huai-Hu Chuang, Diana M. Bautista, and David Julius. Trp channel activation by reversible covalent modification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(51):19564–19568, Dec 2006.

[103] J G J. Hoenderop, T. Voets, S. Hoefs, F. Weidema, J. Prenen, B. Nilius, and R J M. Bindels. Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial ca2+ channels trpv5 and trpv6. *EMBO J*, 22(4):776–785, Feb 2003.

[104] T Hofmann, A G Obukhov, M Schaefer, C Harteneck, T Gudermann, and G Schultz. Direct activation of human trpc6 and trpc3 channels by diacylglycerol. *Nature*, 397:259–263, January 1999.

[105] K. Homer and J. Wanstall. In vitro comparison of two nonoates (novel nitric oxide donors) on rat pulmonary arteries. *Eur J Pharmacol*, 356(1):49–57, Aug 1998.

[106] Keisha A Houston, S Jane Henley, Jun Li, Mary C White, and Thomas B Richards. Patterns in lung cancer incidence rates and trends by histologic type in the united states, 2004-2009. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 86:22–28, October 2014.

[107] Alan K Howe. Cross-talk between calcium and protein kinase a in the regulation of cell migration. *Current opinion in cell biology*, 23:554–561, October 2011.

[108] Valérie Hox, Jeroen A Vanoirbeek, Yeranddy A Alpizar, Sabrina Voedisch, Ina Callebaut, Sonja Bobic, Ali Sharify, Vanessa De Vooght, Laura Van Gerven, Fien Devos, Adrian Liston, Thomas Voets, Rudi Vennekens, Dominique M A Bullens, Annick De Vries, Peter Hoet, Armin Braun, Jan L Ceuppens, Karel Talavera, Benoit Nemery, and Peter W Hellings. Crucial role of transient receptor potential ankyrin 1 and mast cells in induction of nonallergic airway hyperreactivity in mice. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 187:486–493, March 2013.

[109] Qiong Hu, Bing Li, David Garfield, Shengxiang Ren, Aiwu Li, Xiaoxia Chen, and CaiCun Zhou. Prognostic factors for survival in a chinese population presenting with advanced non-small cell lung cancer with an emphasis on smoking status: A regional, single-institution, retrospective analysis of 4552 patients. *Thoracic cancer*, 3:162–168, May 2012.

[110] Juliette Humeau, Jose Manuel Bravo-San Pedro, Ilio Vitale, Lucia Nunez, Carlos Villalobos, Guido Kroemer, and Laura Senovilla. Calcium signaling and cell cycle: Progression or death. *Cell calcium*, July 2017.

[111] Fumito Ichinose, Jesse D Roberts, Jr, and Warren M. Zapol. Inhaled nitric oxide: a selective pulmonary vasodilator: current uses and therapeutic potential. *Circulation*, 109(25):3106–3111, Jun 2004.

[112] Toru Itaya, Nobuyuki Yamaoto, Masahiko Ando, Masako Ebisawa, Yukiko Nakamura, Haruyasu Murakami, Gyo Asai, Masahiro Endo, and Toshiaki Takahashi. Influence of histological type, smoking history and chemotherapy on survival after first-line therapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer science*, 98:226–230, February 2007.

[113] D. Jaquemar, T. Schenker, and B. Trüb. An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts. *J Biol Chem*, 274(11):7325–7333, Mar 1999.

[114] Ahmedin Jemal, Freddie Bray, Melissa M Center, Jacques Ferlay, Elizabeth Ward, and David Forman. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61:69–90, 2011.

[115] Ru-Rong Ji, Robert W Gereau, 4th, Marzia Malcangio, and Gary R. Strichartz. Map kinase and pain. *Brain Res Rev*, 60(1):135–148, Apr 2009.

[116] Faye M Johnson, B Nebiyou Bekele, Lei Feng, Ignacio Wistuba, Xi Ming Tang, Hai T Tran, Jeremy J Erasmus, Li-Ling Hwang, Naoko Takebe, George R Blumenschein, Scott M Lippman, and David J Stewart. Phase ii study of dasatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28:4609–4615, October 2010.

[117] Faye M Johnson, Babita Saigal, Moshe Talpaz, and Nicholas J Donato. Dasatinib (bms-354825) tyrosine kinase inhibitor suppresses invasion and induces cell cycle arrest and apoptosis of head and neck squamous cell carcinoma and non-small cell lung cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 11:6924–6932, October 2005.

[118] John R Johnson, Martin Cohen, Rajeshwari Sridhara, Yeh-Fong Chen, Gene M Williams, John Duan, Jogarao Gobburu, Brian Booth, Kimberly Benson, John Leighton, Li Shan Hsieh, Nallalerumal Chidambaram, Paul Zimmerman, and Richard Pazdur. Approval summary for erlotinib for treatment of patients with locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer after failure of at least one prior chemotherapy regimen. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 11:6414–6421, September 2005.

[119] Sven-Eric Jordt, Diana M. Bautista, Huai-Hu Chuang, David D. McKemy, Peter M. Zygmunt, Edward D. Högestätt, Ian D. Meng, and David Julius. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the trp channel anktm1. *Nature*, 427(6971):260–265, Jan 2004.

[120] Anastasios Kallianos, Sotirios Tsimpoukis, Paul Zarogoulidis, Kaid Darwiche, Andriani Charpidou, Ilias Tsioulis, Georgia Trakada, Konstantinos Porpodis, Dionysios Spyratos, Athanasios Panoutsopoulos, Lemonia Veletza, Konstantinos Kostopoulos, Charalampos Kostopoulos, Ilias Karapantzos, Kosmas Tsakiridis, Wolfgang Hohenforst-Schmidt, Konstantinos Zarogoulidis, Aggeliki Rapti, and Konstantinos Syrigos. Measurement of exhaled alveolar nitrogen oxide in patients with lung cancer: a friend from the past still precious today. *OncoTargets and therapy*, 6:609–613, 2013.

[121] Yuji Karashima, Jean Prenen, Karel Talavera, Annelies Janssens, Thomas Voets, and Bernd Nilius. Agonist-induced changes in ca(2+) permeation through the nociceptor cation channel trpa1. *Biophys J*, 98(5):773–783, Mar 2010.

[122] S. Katsuki, W. Arnold, C. Mittal, and F. Murad. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J Cyclic Nucleotide Res*, 3(1):23–35, Feb 1977.

[123] Michael J Kelley, Gautam Jha, Debra Shoemaker, James E Herndon, Lin Gu, William T Barry, Jeffrey Crawford, and Neal Ready. Phase ii study of dasatinib in previously treated patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer investigation*, 35:32–35, January 2017.

[124] Elaine M Khan, Roni Lanir, Aaron R Danielson, and Tzipora Goldkorn. Epidermal growth factor receptor exposed to cigarette smoke is aberrantly activated and undergoes perinuclear trafficking. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22:910–917, March 2008.

[125] Tatjana I Kichko, Gerd Kobal, and Peter W Reeh. Cigarette smoke has sensory effects through nicotinic and trpa1 but not trpv1 receptors on the isolated mouse trachea and larynx. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 309(8):L812–L820, 2015.

[126] K Kienast, M Knorst, S Lubjuhn, J Müller-Quernheim, and R Ferlinz. Nitrogen dioxide-induced reactive oxygen intermediates production by human alveolar macrophages and peripheral blood mononuclear cells. *Archives of environmental health*, 49:246–250, 1994.

[127] Lori C. Kim, Lanxi Song, and Eric B. Haura. Src kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 6(10):587–595, Oct 2009.

[128] Min Hwan Kim, Hye Ryun Kim, Byoung Chul Cho, Mi Kyung Bae, Eun Young Kim, Chang Young Lee, Jae Seok Lee, Dae Ryong Kang, and Joo Hang Kim. Impact of cigarette smoking on response to epidermal growth factor receptor (egfr)-tyrosine kinase inhibitors in lung adenocarcinoma with activating egfr mutations. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 84:196–202, May 2014.

[129] H. Kojima, N. Nakatsubo, K. Kikuchi, S. Kawahara, Y. Kirino, H. Nagoshi, Y. Hirata, and T. Nagano. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal Chem*, 70(13):2446–2453, Jul 1998.

[130] J P Kolb. Mechanisms involved in the pro- and anti-apoptotic role of no in human leukemia. *Leukemia*, 14:1685–1694, September 2000.

[131] T. Kondo, K. Obata, K. Miyoshi, J. Sakurai, J. Tanaka, H. Miwa, and K. Noguchi. Transient receptor potential a1 mediates gastric distention-induced visceral pain in rats. *Gut*, 58(10):1342–1352, Oct 2009.

[132] Takashi Kondo, Tadayuki Oshima, Koichi Obata, Jun Sakurai, Charles H. Knowles, Takayuki Matsumoto, Koichi Noguchi, and Hiroto Miwa. Role of transient receptor potential a1 in gastric nociception. *Digestion*, 82(3):150–155, 2010.

[133] Martin Konrad, Karl P. Schlingmann, and Thomas Gudermann. Insights into the molecular nature of magnesium homeostasis. *Am J Physiol Renal Physiol*, 286(4):F599–F605, Apr 2004.

[134] T Kovács, T Vas, L Wagner, M Schmelczer, B Kocsis, and J Nagy. Effect of smoking on urinary nox and cgmp excretion in iga nephropathy and in health. *Contributions to nephrology*, 130:124–129, 2000.

[135] Barbara Kremeyer, Francisco Lopera, James J. Cox, Aliakmal Momin, Francois Rugiero, Steve Marsh, C Geoffrey Woods, Nicholas G. Jones, Kathryn J. Paterson, Florence R. Fricker, Andrés Villegas, Natalia Acosta, Nicolás G. Pineda-Trujillo, Juan Diego Ramírez, Julian Zea, Mari-Wyn Burley, Gabriel Bedoya, David L H. Bennett, John N. Wood, and Andrés Ruiz-Linares. A gain-of-function mutation in trpa1 causes familial episodic pain syndrome. *Neuron*, 66(5):671–680, Jun 2010.

[136] B-H Kuang, M-Q Zhang, L-H Xu, L-J Hu, H-B Wang, W-F Zhao, Y Du, and X Zhang. Proline-rich tyrosine kinase 2 and its phosphorylated form py881 are novel prognostic markers for non-small-cell lung cancer progression and patients' overall survival. *British journal of cancer*, 109:1252–1263, September 2013.

[137] U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, 227(5259):680–685, Aug 1970.

[138] Peter N Lee, Barbara A Forey, and Katharine J Coombs. Systematic review with meta-analysis of the epidemiological evidence in the 1900s relating smoking to lung cancer. *BMC cancer*, 12:385, September 2012.

[139] S. P. Lee, M. T. Buber, Q. Yang, R. Cerne, R. Y. Cortés, D. G. Sprous, and R. W. Bryant. Thymol and related alkyl phenols activate the htrpa1 channel. *Br J Pharmacol*, 153(8):1739–1749, Apr 2008.

[140] Tzeng-Horng Leu and Ming-Chei Maa. Functional implication of the interaction between egf receptor and c-src. *Front Biosci*, 8:s28–s38, Jan 2003.

[141] R. E. Leube, B. Wiedenmann, and W. W. Franke. Differentiation markers as an aid in the histological diagnosis of small-cell carcinoma of the lung: synopsis of intermediate filament protein and synaptophysin expression. *Klin Wochenschr*, 66 Suppl 11:80–86, 1988.

[142] Elaine Lai-Han Leung, Issan Yee-San Tam, Vicky Pui-Chi Tin, Daniel Tsin-Tien Chua, Alan Dart-Loon Sihoe, Lik-Cheung Cheng, James Chung-Man Ho, Lap-Ping Chung, and Maria Pik Wong. Src promotes survival and invasion of lung cancers with epidermal growth factor receptor abnormalities and is a potential candidate for molecular-targeted therapy. *Molecular cancer research : MCR*, 7:923–932, June 2009.

[143] Dandan Li, Lu Zhang, Junhao Zhou, and Hong Chen. Cigarette smoke extract exposure induces egfr-tki resistance in egfr-mutated nsclc via mediating src activation and emt. *Lung Cancer*, 93:35–42, 2016.

[144] Chang-Sheng Lin, Tu-Chen Liu, Ming-Tsung Lee, Shun-Fa Yang, and Thomas Chang-Yao Tsao. Independent prognostic value of hypoxia-inducible factor 1-alpha expression in small cell lung cancer. *International journal of medical sciences*, 14(8):785, 2017.

[145] C Y Liu, C H Wang, T C Chen, H C Lin, C T Yu, and H P Kuo. Increased level of exhaled nitric oxide and up-regulation of inducible nitric oxide synthase in patients with primary lung cancer. *British journal of cancer*, 78:534–541, August 1998.

[146] Chao Liu and Craig Montell. Forcing open trp channels: Mechanical gating as a unifying activation mechanism. *Biochemical and biophysical research communications*, 460:22–25, April 2015.

[147] GX Liu, HF Sheng, and S Wu. A study on the levels of calmodulin and dna in human lung cancer cells. *British journal of cancer*, 73(7):899–901, 1996.

[148] Hui Liu, Stéphanie Chatel, Christophe Simard, Ninda Syam, Laurent Salle, Vincent Probst, Julie Morel, Gilles Millat, Michel Lopez, Hugues Abriel, Jean-Jacques Schott, Romain Guinamard, and Patrice Bouvagnet. Molecular genetics and functional anomalies in a series of 248 brugada cases with 11 mutations in the trpm4 channel. *PloS one*, 8:e54131, 2013.

[149] Peng-Fei Liu, Da-Hui Zhao, Yan Qi, Jian-Guo Wang, Ming Zhao, Kun Xiao, and Li-Xin Xie. The clinical value of exhaled nitric oxide in patients with lung cancer. *The clinical respiratory journal*, March 2016.

[150] G D Lowe, J W Yarnell, A Rumley, D Bainton, and P M Sweetnam. C-reactive protein, fibrin d-dimer, and incident ischemic heart disease in the speedwell study: are inflammation and fibrin turnover linked in pathogenesis? *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 21:603–610, April 2001.

[151] Yajing Luan, Cuicui Gao, Yajing Miao, Yanlei Li, Zhengyan Wang, and Xiaofei Qiu. Clinicopathological and prognostic significance of hif-1α and hif-2α expression in small cell lung cancer. *Pathology-Research and Practice*, 209(3):184–189, 2013.

[152] Sudjit Luanpitpong and Pithi Chanvorachote. Nitric oxide and aggressive behavior of lung cancer cells. *Anticancer research*, 35:4585–4592, September 2015.

[153] Lindsey J. Macpherson, Adrienne E. Dubin, Michael J. Evans, Felix Marr, Peter G. Schultz, Benjamin F. Cravatt, and Ardem Patapoutian. Noxious compounds activate trpa1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature*, 445(7127):541–545, Feb 2007.

[154] Lindsey J. Macpherson, Bailong Xiao, Kelvin Y. Kwan, Matt J. Petrus, Adrienne E. Dubin, SunWook Hwang, Benjamin Cravatt, David P. Corey, and Ardem Patapoutian. An ion channel essential for sensing chemical damage. *J Neurosci*, 27(42):11412–11415, Oct 2007.

[155] T Masaki, K Igarashi, M Tokuda, S Yukimasa, F Han, Y J Jin, J Q Li, H Yoneyama, N Uchida, J Fujita, H Yoshiji, S Watanabe, K Kurokohchi, and S Kuriyama. pp60c-src activation in lung adenocarcinoma. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 39:1447–1455, July 2003.

[156] Fares A Masri, Suzy A A Comhair, Thomas Koeck, Weiling Xu, Allison Janocha, Sudakshina Ghosh, Raed A Dweik, Joseph Golish, Michael Kinter, Dennis J Stuehr, Serpil C Erzurum, and Kulwant S Aulak. Abnormalities in nitric oxide and its derivatives in lung cancer. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 172:597–605, September 2005.

[157] G Maulik, P Madhiwala, S Brooks, P C Ma, T Kijima, E V Tibaldi, E Schaefer, K Parmar, and R Salgia. Activated c-met signals through pi3k with dramatic effects on cytoskeletal functions in small cell lung cancer. *Journal of cellular and molecular medicine*, 6:539–553, 2002.

[158] Gautam Maulik, Takashi Kijima, Patrick C Ma, Sudip K Ghosh, Jeffrey Lin, Geoffrey I Shapiro, Erik Schaefer, Elena Tibaldi, Bruce E Johnson, and Ravi Salgia. Modulation of the c-met/hepatocyte growth factor pathway in small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 8:620–627, February 2002.

[159] Denisa May, Jonas Baastrup, Maria Raphaela Nientit, Andreas Binder, Michael Schünke, Ralf Baron, and Ingolf Cascorbi. Differential expression and functionality of trpa1 protein genetic variants in conditions of thermal stimulation. *J Biol Chem*, 287(32):27087–27094, Aug 2012.

[160] N N Mazurenko, E A Kogan, I B Zborovskaya, and F L Kisseljov. Expression of pp60c-src in human small cell and non-small cell lung carcinomas. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 28:372–377, 1992.

[161] Steve McGaraughty, Katharine L. Chu, Richard J. Perner, Stan Didomenico, Michael E. Kort, and Philip R. Kym. Trpa1 modulation of spontaneous and mechanically evoked firing of spinal neurons in uninjured, osteoarthritic, and inflamed rats. *Mol Pain*, 6:14, 2010.

[162] David D McKemy, Werner M Neuhausser, and David Julius. Identification of a cold receptor reveals a general role for trp channels in thermosensation. *Nature*, 416:52–58, March 2002.

[163] Colleen R. McNamara, Josh Mandel-Brehm, Diana M. Bautista, Jan Siemens, Kari L. Deranian, Michael Zhao, Neil J. Hayward, Jayhong A. Chong, David Julius, Magdalene M. Moran, and Christopher M. Fanger. Trpa1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(33):13525–13530, Aug 2007.

[164] K Mellström, C Bjelfman, U Hammerling, and S Påhlman. Expression of c-src in cultured human neuroblastoma and small-cell lung carcinoma cell lines correlates with neurocrine differentiation. *Molecular and cellular biology*, 7:4178–4184, December 1987.

[165] Antonius A Miller, Herbert Pang, Lydia Hodgson, Nithya Ramnath, Gregory A Otterson, Michael J Kelley, Robert A Kratzke, Everett E Vokes, Cancer, and Leukemia Group B (CALGB). A phase ii study of dasatinib in patients with chemosensitive relapsed small cell lung cancer (cancer and leukemia group b 30602). *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 5:380–384, March 2010.

[166] Barbara A. Miller and Wenyi Zhang. Trp channels as mediators of oxidative stress. *Adv Exp Med Biol*, 704:531–544, 2011.

[167] T Mitsudomi, J Viallet, JL Mulshine, RI Linnoila, JD Minna, and AF Gazdar. Mutations of ras genes distinguish a subset of non-small-cell lung cancer cell lines from small-cell lung cancer cell lines. *Oncogene*, 6(8):1353–1362, 1991.

[168] Tsuyoshi Miyakawa, Yoshinori Terashima, Tsuneo Takebayashi, Katsumasa Tanimoto, Takehito Iwase, Izaya Ogon, Takeshi Kobayashi, Noritsugu Tohse, and Toshihiko Yamashita. Transient receptor potential ankyrin 1 in spinal cord dorsal horn is involved in neuropathic pain in nerve root constriction rats. *Mol Pain*, 10:58, 2014.

[169] Takashi Miyamoto, Adrienne E. Dubin, Matt J. Petrus, and Ardem Patapoutian. Trpv1 and trpa1 mediate peripheral nitric oxide-induced nociception in mice. *PLoS One*, 4(10):e7596, 2009.

[170] Julian R Molina, Nathan R Foster, Thanyanan Reungwetwattana, Garth D Nelson, Andrew V Grainger, Preston D Steen, Philip J Stella, Randolph Marks, John Wright, and Alex A Adjei. A phase ii trial of the src-kinase inhibitor saracatinib after four cycles of chemotherapy for patients with extensive stage small cell lung cancer: Ncctg trial n-0621. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 85:245–250, August 2014.

[171] C. Montell and G. M. Rubin. Molecular characterization of the drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*, 2(4):1313–1323, Apr 1989.

[172] Craig Montell, Lutz Birnbaumer, Veit Flockerzi, René J. Bindels, Elspeth A. Bruford, Michael J. Caterina, David E. Clapham, Christian Harteneck, Stefan Heller, David Julius, Itaru Kojima, Yasuo Mori, Reinhold Penner, Dirk Prawitt, Andrew M. Scharenberg, Günter Schultz, Nobuyoshi Shimizu, and Michael X. Zhu. A unified nomenclature for the superfamily of trp cation channels. *Mol Cell*, 9(2):229–231, Feb 2002.

[173] S M Moore, R C Rintoul, T R Walker, E R Chilvers, C Haslett, and T Sethi. The presence of a constitutively active phosphoinositide 3-kinase in small cell lung cancer cells mediates anchorage-independent proliferation via a protein kinase b and p70s6k-dependent pathway. *Cancer research*, 58:5239–5247, November 1998.

[174] Lavanya Moparthi, Sabeen Survery, Mohamed Kreir, Charlotte Simonsen, Per Kjellbom, Edward D. Högestätt, Urban Johanson, and Peter M. Zygmunt. Human trpa1 is intrinsically cold- and chemosensitive with and without its n-terminal ankyrin repeat domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(47):16901–16906, Nov 2014.

[175] Mathieu C Morissette, Pamela Shen, Danya Thayaparan, and Martin R Stämpfli. Disruption of pulmonary lipid homeostasis drives cigarette smoke-induced lung inflammation in mice. *European Respiratory Journal*, 46(5):1451–1460, 2015.

[176] J B Morris, J Stanek, and G Gianutsos. Sensory nerve-mediated immediate nasal responses to inspired acrolein. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 87:1877–1886, November 1999.

[177] Indranil Mukhopadhyay, Pearl Gomes, Sarika Aranake, Mahesh Shetty, Pallavi Karnik, Madhujit Damle, Shaldavya Kuruganti, Sandeep Thorat, and Neelima Khairatkar-Joshi. Expression of functional trpa1 receptor on human lung fibroblast and epithelial cells. *J Recept Signal Transduct Res*, 31(5):350–358, Oct 2011.

[178] K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich. Specific enzymatic amplification of dna in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1:263–273, 1986.

[179] Matilda Munksgaard Persson, Martin E Johansson, Nastaran Monsef, Maria Planck, Siv Beckman, Michael J Seckl, Lars Rönnstrand, Sven Påhlman, and Helen M Pettersson. Hif-2α expression is suppressed in sclc cells, which survive in moderate and severe hypoxia when hif-1α is repressed. *The American journal of pathology*, 180:494–504, February 2012.

[180] F. Murad. The nitric oxide-cyclic gmp signal transduction system for intracellular and intercellular communication. *Recent Prog Horm Res*, 49:239–248, 1994.

[181] Yuichi Murakami, Kahori Sonoda, Hideyuki Abe, Kosuke Watari, Daiki Kusakabe, Koichi Azuma, Akihiko Kawahara, Jun Akiba, Chitose Oneyama, Jonathan A Pachter, Kazuko Sakai, Kazuto Nishio, Michihiko Kuwano, and Mayumi Ono. The activation of src family kinases and focal adhesion kinase with the loss of the amplified, mutated egfr gene contributes to the resistance to afatinib, erlotinib and osimertinib in human lung cancer cells. *Oncotarget*, 8:70736–70751, September 2017.

[182] Masahiro Nagasawa and Itaru Kojima. Translocation of trpv2 channel induced by focal administration of mechanical stress. *Physiol Rep*, 3(2), Feb 2015.

[183] Keiichi Nagata, Anne Duggan, Gagan Kumar, and Jaime Garcia-Anoveros. Nociceptor and hair cell transducer properties of trpa1, a channel for pain and hearing. *J Neurosci*, 25(16):4052–4061, Apr 2005.

[184] Yandong Nan, Jie Du, Lijie Ma, Hua Jiang, Faguang Jin, and Shuanying Yang. Early candidate biomarkers of non-small cell lung cancer are screened and identified in premalignant lung lesions. *Technology in cancer research & treatment*, 16:66–74, February 2017.

[185] Romina Nassini, Serena Materazzi, Silvia Benemei, and Pierangelo Geppetti. The trpa1 channel in inflammatory and neuropathic pain and migraine. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 167:1–43, Mar 2014.

[186] Romina Nassini, Pamela Pedretti, Nadia Moretto, Camilla Fusi, Chiara Carnini, Fabrizio Facchinetti, Arturo Roberto Viscomi, Anna Rita Pisano, Susan Stokesberry, Charlott Brunmark, Naila Svitacheva, Lorcan McGarvey, Riccardo Patacchini, Anders B. Damholt, Pierangelo Geppetti, and Serena Materazzi. Transient receptor potential ankyrin 1 channel localized to non-neuronal airway cells promotes non-neurogenic inflammation. *PLoS One*, 7(8):e42454, 2012.

[187] Piper L. Nelson, Andreas Beck, and Henrique Cheng. Transient receptor proteins illuminated: current views on trps and disease. *Vet J*, 187(2):153–164, Feb 2011.

[188] Shingo Nemoto, Tsuneo Kobayashi, Kumiko Taguchi, Takayuki Matsumoto, and Katsuo Kamata. Losartan improves aortic endothelium-dependent relaxation via proline-rich tyrosine kinase 2/src/akt pathway in type 2 diabetic goto-kakizaki rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 301(6):H2383–H2394, Dec 2011.

[189] R F Newbold and R W Overell. Fibroblast immortality is a prerequisite for transformation by ej c-ha-ras oncogene. *Nature*, 304:648–651, 1983.

[190] Yichu Nie, Chuqin Huang, Shan Zhong, Michael A Wortley, Yulong Luo, Wei Luo, Yanqing Xie, Kefang Lai, and Nanshan Zhong. Cigarette smoke extract (cse) induces transient receptor potential ankyrin 1 (trpa1) expression via activation of hif1αin a549 cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 99:498–507, 2016.

[191] Bernd Nilius and Grzegorz Owsianik. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol*, 12(3):218, 2011.

[192] Bernd Nilius, Jean Prenen, and Grzegorz Owsianik. Irritating channels: the case of trpa1. *J Physiol*, 589(Pt 7):1543–1549, Apr 2011.

[193] M J Nirenberg, R Chaouni, T M Biller, R M Gilbert, and C Paisán-Ruiz. A novel trpa1 variant is associated with carbamazepine-responsive cramp-fasciculation syndrome. *Clinical genetics*, April 2017.

[194] Lisa Susanna Oberli, Fabio Valeri, Dimitri Korol, Sabine Rohrmann, and Silvia Dehler. 31 years of lung cancer in the canton of zurich, switzerland: incidence trends by sex, histology and laterality. *Swiss medical weekly*, 146:w14327, 2016.

[195] K. Ogata, M. Arakawa, T. Kasahara, K. Shioiri-Nakano, and K. Hiraoka. Detection of toxoplasma membrane antigens transferred from sds-polyacrylamide gel to nitrocellulose with monoclonal antibody and avidin-biotin, peroxidase anti-peroxidase and immunoperoxidase methods. *J Immunol Methods*, 65(1-2):75–82, Dec 1983.

[196] Jong-In Park, Christopher J Strock, Douglas W Ball, and Barry D Nelkin. The ras/raf/mek/extracellular signal-regulated kinase pathway induces autocrine-paracrine growth inhibition via the leukemia inhibitory factor/jak/stat pathway. *Molecular and cellular biology*, 23(2):543–554, 2003.

[197] Yu Rang Park, Jung Nyeo Chun, Insuk So, Hwa Jung Kim, Seunghee Baek, Ju-Hong Jeon, and Soo-Yong Shin. Data-driven analysis of trp channels in cancer: Linking variation in gene expression to clinical significance. *Cancer genomics & proteomics*, 13:83–90, 2016.

[198] A Parsons, A Daley, R Begh, and P Aveyard. Influence of smoking cessation after diagnosis of early stage lung cancer on prognosis: systematic review of observational studies with meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed.)*, 340:b5569, January 2010.

[199] J. T. Parsons, K. H. Martin, J. K. Slack, J. M. Taylor, and S. A. Weed. Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene*, 19(49):5606–5613, Nov 2000.

[200] N S Pauwels, K R Bracke, L L Dupont, G R Van Pottelberge, S Provoost, T Vanden Berghe, P Vandenabeele, B N Lambrecht, G F Joos, and G G Brusselle. Role of il-1α and the nlrp3/caspase-1/il-1β axis in cigarette smoke-induced pulmonary inflammation and copd. *The European respiratory journal*, 38:1019–1028, November 2011.

[201] Andrea M Peier, Aziz Moqrich, Anne C Hergarden, Alison J Reeve, David A Andersson, Gina M Story, Taryn J Earley, Ilaria Dragoni, Peter McIntyre, Stuart Bevan, and Ardem Patapoutian. A trp channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell*, 108:705–715, March 2002.

[202] C. Pequeux, B. P. Keegan, M-T. Hagelstein, V. Geenen, J-J. Legros, and W. G. North. Oxytocin- and vasopressin-induced growth of human small-cell lung cancer is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocr Relat Cancer*, 11(4):871–885, Dec 2004.

[203] Antti Pertovaara and Ari Koivisto. Trpa1 ion channel in the spinal dorsal horn as a therapeutic target in central pain hypersensitivity and cutaneous neurogenic inflammation. *Eur J Pharmacol*, 666(1-3):1–4, Sep 2011.

[204] R Peto, S Darby, H Deo, P Silcocks, E Whitley, and R Doll. Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the uk since 1950: combination of national statistics with two case-control studies. *BMJ (Clinical research ed.)*, 321:323–329, August 2000.

[205] Matt Petrus, Andrea M. Peier, Michael Bandell, Sun Wook Hwang, Truc Huynh, Nicholas Olney, Tim Jegla, and Ardem Patapoutian. A role of trpa1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. *Mol Pain*, 3:40, 2007.

[206] Lian-Hua Piao, Tsugumi Fujita, Chang-Yu Jiang, Tao Liu, Hai-Yuan Yue, Terumasa Nakatsuka, and Eiichi Kumamoto. Trpa1 activation by lidocaine in nerve terminals results in glutamate release increase. *Biochem Biophys Res Commun*, 379(4):980–984, Feb 2009.

[207] K. L. Pierce, A. Tohgo, S. Ahn, M. E. Field, L. M. Luttrell, and R. J. Lefkowitz. Epidermal growth factor (egf) receptor-dependent erk activation by g protein-coupled receptors: a co-culture system for identifying intermediates upstream and downstream of heparin-binding egf shedding. *J Biol Chem*, 276(25):23155–23160, Jun 2001.

[208] B Pignatelli, C Q Li, P Boffetta, Q Chen, W Ahrens, F Nyberg, A Mukeria, I Bruske-Hohlfeld, C Fortes, V Constantinescu, H Ischiropoulos, and H Ohshima. Nitrated and oxidized plasma proteins in smokers and lung cancer patients. *Cancer research*, 61:778–784, January 2001.

[209] Paul F Pinsky, Christina R Bellinger, and David P Miller. False-positive screens and lung cancer risk in the national lung screening trial: Implications for shared decision-making. *Journal of medical screening*, page 969141317727771, January 2017.

[210] Phattrakorn Powan and Pithi Chanvorachote. Nitric oxide mediates cell aggregation and mesenchymal to epithelial transition in anoikis-resistant lung cancer cells. *Molecular and cellular biochemistry*, 393:237–245, August 2014.

[211] Yan-Liang Qu, Jun Liu, Li-Xin Zhang, Chun-Min Wu, Ai-Jie Chu, Bao-Lei Wen, Chao Ma, Xu-Yan Yan, Xin Zhang, De-Ming Wang, Xin Lv, and Shu-Jian Hou. Asthma and the risk of lung cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*, 8:11614–11620, February 2017.

[212] Rajani K Ravi, Erich Weber, Martin McMahon, Jerry R Williams, Stephen Baylin, Asoke Mal, Marian L Harter, Larry E Dillehay, Pier Paolo Claudio, Antonio Giordano, et al. Activated raf-1 causes growth arrest in human small cell lung cancer cells. *Journal of Clinical Investigation*, 101(1):153, 1998.

[213] M Reck, J von Pawel, P Zatloukal, R Ramlau, V Gorbounova, V Hirsh, N Leighl, J Mezger, V Archer, N Moore, C Manegold, and BO17704 Study Group. Overall survival with cisplatin-gemcitabine and

bevacizumab or placebo as first-line therapy for nonsquamous non-small-cell lung cancer: results from a randomised phase iii trial (avail). *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 21:1804–1809, September 2010.

[214] Weiwei Ren, Denghai Mi, Kehu Yang, Nong Cao, Jinhui Tian, Zheng Li, and Bin Ma. The expression of hypoxia-inducible factor-1α and its clinical significance in lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Swiss medical weekly*, 143:w13855, September 2013.

[215] S. Roelle, R. Grosse, T. Büch, V. Chubanov, and T. Gudermann. Essential role of pyk2 and src kinase activation in neuropeptide-induced proliferation of small cell lung cancer cells. *Oncogene*, 27(12):1737–1748, Mar 2008.

[216] Stephen D Roper. Trps in taste and chemesthesis. *Handbook of experimental pharmacology*, 223:827–871, 2014.

[217] Rafael Rosell, Enric Carcereny, Radj Gervais, Alain Vergnenegre, Bartomeu Massuti, Enriqueta Felip, Ramon Palmero, Ramon Garcia-Gomez, Cinta Pallares, Jose Miguel Sanchez, Rut Porta, Manuel Cobo, Pilar Garrido, Flavia Longo, Teresa Moran, Amelia Insa, Filippo De Marinis, Romain Corre, Isabel Bover, Alfonso Illiano, Eric Dansin, Javier de Castro, Michele Milella, Noemi Reguart, Giuseppe Altavilla, Ulpiano Jimenez, Mariano Provencio, Miguel Angel Moreno, Josefa Terrasa, Jose Muñoz Langa, Javier Valdivia, Dolores Isla, Manuel Domine, Olivier Molinier, Julien Mazieres, Nathalie Baize, Rosario Garcia-Campelo, Gilles Robinet, Delvys Rodriguez-Abreu, Guillermo Lopez-Vivanco, Vittorio Gebbia, Lioba Ferrera-Delgado, Pierre Bombaron, Reyes Bernabe, Alessandra Bearz, Angel Artal, Enrico Cortesi, Christian Rolfo, Maria Sanchez-Ronco, Ana Drozdowskyj, Cristina Queralt, Itziar de Aguirre, Jose Luis Ramirez, Jose Javier Sanchez, Miguel Angel Molina, Miquel Taron, Luis Paz-Ares, Spanish Lung Cancer Group in collaboration with Groupe Français de Pneumo-Cancérologie, and Associazione Italiana Oncologia Toracica. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for european patients with advanced egfr mutation-positive non-small-cell lung cancer (eurtac): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, 13:239–246, March 2012.

[218] N Rosen, J B Bolen, A M Schwartz, P Cohen, V DeSeau, and M A Israel. Analysis of pp60c-src protein kinase activity in human tumor cell lines and tissues. *The Journal of biological chemistry*, 261:13754–13759, October 1986.

[219] Enrique Rozengurt. Neuropeptides as growth factors for normal and cancerous cells. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 13:128–134, April 2002.

[220] R. K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732):1350–1354, Dec 1985.

[221] Eva A M. Schäfer, Stefanie Stohr, Michael Meister, Achim Aigner, Thomas Gudermann, and Thomas R H. Büch. Stimulation of the chemosensory trpa1 cation channel by volatile toxic substances promotes cell survival of small cell lung cancer cells. *Biochem Pharmacol*, 85(3):426–438, Feb 2013.

[222] T. Schenker and B. Trueb. Down-regulated proteins of mesenchymal tumor cells. *Exp Cell Res*, 239(1):161–168, Feb 1998.

[223] D. D. Schlaepfer, S. K. Hanks, T. Hunter, and P. van der Geer. Integrin-mediated signal transduction linked to ras pathway by grb2 binding to focal adhesion kinase. *Nature*, 372(6508):786–791, 1994.

[224] D. D. Schlaepfer and T. Hunter. Signal transduction from the extracellular matrix–a role for the focal adhesion protein-tyrosine kinase fak. *Cell Struct Funct*, 21(5):445–450, Oct 1996.

[225] J. Schlessinger. How receptor tyrosine kinases activate ras. *Trends Biochem Sci*, 18(8):273–275, Aug 1993.

[226] R. Seger and E. G. Krebs. The mapk signaling cascade. *FASEB J*, 9(9):726–735, Jun 1995.

[227] Lecia V Sequist, James Chih-Hsin Yang, Nobuyuki Yamamoto, Kenneth O'Byrne, Vera Hirsh, Tony Mok, Sarayut Lucien Geater, Sergey Orlov, Chun-Ming Tsai, Michael Boyer, Wu-Chou Su, Jaafar Bennouna, Terufumi Kato, Vera Gorbunova, Ki Hyeong Lee, Riyaz Shah, Dan Massey, Victoria Zazulina, Mehdi Shahidi, and Martin Schuler. Phase iii study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with egfr mutations. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 31:3327–3334, September 2013.

[228] M Serrano, A W Lin, M E McCurrach, D Beach, and S W Lowe. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16ink4a. *Cell*, 88:593–602, March 1997.

[229] Yuichi Sesumi, Kenichi Suda, Hiroshi Mizuuchi, Yoshihisa Kobayashi, Katsuaki Sato, Masato Chiba, Masaki Shimoji, Kenji Tomizawa, Toshiki Takemoto, and Tetsuya Mitsudomi. Effect of dasatinib on emt-mediated-mechanism of resistance against egfr inhibitors in lung cancer cells. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 104:85–90, February 2017.

[230] T Seufferlein and E Rozengurt. Galanin, neurotensin, and phorbol esters rapidly stimulate activation of mitogen-activated protein kinase in small cell lung cancer cells. *Cancer research*, 56:5758–5764, December 1996.

[231] Gerry Shaw, Silas Morse, Miguel Ararat, and Frank L. Graham. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of hek 293 cells. *FASEB J*, 16(8):869–871, Jun 2002.

[232] Won-Sik Shim, Min-Ho Tak, Mi-Hyun Lee, Minjung Kim, Minkyung Kim, Jae-Yeon Koo, Chang-Hun Lee, Misook Kim, and Uhtaek Oh. Trpv1 mediates histamine-induced itching via the activation of phospholipase a2 and 12-lipoxygenase. *J Neurosci*, 27(9):2331–2337, Feb 2007.

[233] O. Shimomura. The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *J Microsc*, 217(Pt 1):1–15, Jan 2005.

[234] Kyo Shirai, Tatsumi Okada, Kanako Konishi, Hiroshi Murata, Soichiro Akashi, Fumio Sugawara, Nobuo Watanabe, and Takao Arai. Bicarbonate plays a critical role in the generation of cytotoxicity during sin-1 decomposition in culture medium. *Oxid Med Cell Longev*, 2012:326731, 2012.

[235] S Skerratt. Recent progress in the discovery and development of trpa1 modulators. *Progress in medicinal chemistry*, 56:81–115, 2017.

[236] Sarah E Skerratt and Christopher W West. Ion channel therapeutics for pain. *Channels (Austin, Tex.)*, 9:344–351, 2015.

[237] Rosalinda Sorrentino, Michela Terlizzi, Vincenzo G Di Crescenzo, Ada Popolo, Michela Pecoraro, Giuseppe Perillo, Antonio Galderisi, and Aldo Pinto. Human lung cancer–derived immunosuppressive plasmacytoid dendritic cells release il-1α in an aim2 inflammasome-dependent manner. *The American journal of pathology*, 185(11):3115–3124, 2015.

[238] E. M. Southern. Detection of specific sequences among dna fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 98(3):503–517, Nov 1975.

[239] S. Spiegelman, K. F. Watson, and D. L. Kacian. Synthesis of dna complements of natural rnas: a general approach. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68(11):2843–2845, Nov 1971.

[240] Michael St Pierre, Peter W. Reeh, and Katharina Zimmermann. Differential effects of trpv channel block on polymodal activation of rat cutaneous nociceptors in vitro. *Exp Brain Res*, 196(1):31–44, Jun 2009.

[241] J. S. Stamler, S. Lamas, and F. C. Fang. Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell*, 106(6):675–683, Sep 2001.

[242] Bernhard Stenger, Tanja Popp, Harald John, Markus Siegert, Amelie Tsoutsoulopoulos, Annette Schmidt, Harald Mückter, Thomas Gudermann, Horst Thiermann, and Dirk Steinritz. N-acetyl-l-cysteine inhibits sulfur mustard-induced and trpa1-dependent calcium influx. *Archives of toxicology*, 91:2179–2189, May 2017.

[243] Erin L Stewart, Samuel Zhixing Tan, Geoffrey Liu, and Ming-Sound Tsao. Known and putative mechanisms of resistance to egfr targeted therapies in nsclc patients with egfr mutations-a review. *Translational lung cancer research*, 4:67–81, February 2015.

[244] Alexander Stokes, Clay Wakano, Murielle Koblan-Huberson, Chaker N. Adra, Andrea Fleig, and Helen Turner. Trpa1 is a substrate for de-ubiquitination by the tumor suppressor cyld. *Cell Signal*, 18(10):1584–1594, Oct 2006.

[245] Gina M. Story, Andrea M. Peier, Alison J. Reeve, Samer R. Eid, Johannes Mosbacher, Todd R. Hricik, Taryn J. Earley, Anne C. Hergarden, David A. Andersson, Sun Wook Hwang, Peter McIntyre, Tim Jegla, Stuart Bevan, and Ardem Patapoutian. Anktm1, a trp-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell*, 112(6):819–829, Mar 2003.

[246] Tomi Streng, Helena E. Axelsson, Petter Hedlund, David A. Andersson, Sven-Eric Jordt, Stuart Bevan, Karl-Erik Andersson, Edward D. Högestätt, and Peter M. Zygmunt. Distribution and function of the hydrogen sulfide-sensitive trpa1 ion channel in rat urinary bladder. *Eur Urol*, 53(2):391–399, Feb 2008.

[247] J. D. Sweatt. The neuronal map kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J Neurochem*, 76(1):1–10, Jan 2001.

[248] Kenji Takahashi and Toshio Ohta. Membrane translocation of transient receptor potential ankyrin 1 induced by inflammatory cytokines in lung cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017.

[249] Nobuaki Takahashi, Yusuke Mizuno, Daisuke Kozai, Shinichiro Yamamoto, Shigeki Kiyonaka, Takahiro Shibata, Koji Uchida, and Yasuo Mori. Molecular characterization of trpa1 channel activation by cysteine-reactive inflammatory mediators. *Channels (Austin)*, 2(4):287–298, 2008.

[250] Shinichi Takahashi, Hai Lin, Naomi Geshi, Yasuo Mori, Yasuhiro Kawarabayashi, Noboru Takami, Masayuki X. Mori, Akira Honda, and Ryuji Inoue. Nitric oxide-cgmp-protein kinase g pathway negatively regulates vascular transient receptor potential channel trpc6. *J Physiol*, 586(Pt 17):4209–4223, Sep 2008.

[251] Karel Talavera, Maarten Gees, Yuji Karashima, Víctor M Meseguer, Jeroen AJ Vanoirbeek, Nils Damann, Wouter Everaerts, Melissa Benoit, Annelies Janssens, Rudi Vennekens, et al. Nicotine activates the chemosensory cation channel trpa1. *Nature neuroscience*, 12(10):1293–1299, 2009.

[252] Thomas E. Taylor-Clark and Bradley J. Undem. Ozone activates airway nerves via the selective stimulation of trpa1 ion channels. *J Physiol*, 588(Pt 3):423–433, Feb 2010.

[253] Seyithan Taysi, Celil Uslu, Fatih Akcay, and Mehmet Yavuz Sutbeyaz. Malondialdehyde and nitric oxide levels in the plasma of patients with advanced laryngeal cancer. *Surgery today*, 33:651–654, 2003.

[254] H. M. Temin and D. Baltimore. Rna-directed dna synthesis and rna tumor viruses. *Adv Virus Res*, 17:129–186, 1972.

[255] S. Thebault, A. Zholos, A. Enfissi, C. Slomianny, E. Dewailly, M. Roudbaraki, J. Parys, and Natalia Prevarskaya. Receptor-operated ca2+ entry mediated by trpc3/trpc6 proteins in rat prostate smooth muscle (ps1) cell line. *J Cell Physiol*, 204(1):320–328, Jul 2005.

[256] Philip Thomas and Trevor G. Smart. Hek293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 51(3):187–200, 2005.

[257] Yosuke Togashi, Hidetoshi Hayashi, Kunio Okamoto, Soichi Fumita, Masato Terashima, Marco A de Velasco, Kazuko Sakai, Yoshihiko Fujita, Shuta Tomida, Kazuhiko Nakagawa, and Kazuto Nishio. Chronic nicotine exposure mediates resistance to egfr-tki in egfr-mutated lung cancer via an egfr signal. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 88:16–23, April 2015.

[258] H Towbin, T Staehelin, and J Gordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76:4350–4354, September 1979.

[259] Yasuto Ueda, Tadashi Igishi, Kiyoshi Hashimoto, Hisashi Suyama, Kunio Araki, Takashi Sumikawa, Kenichi Takeda, Hirofumi Nakazaki, Keiji Matsunami, Masahiro Kodani, Yasushi Shigeoka, Shingo Matsumoto, and Eiji Shimizu. Synergistic cell growth inhibition by the combination of amrubicin and akt-suppressing tyrosine kinase inhibitors in small cell lung cancer cells: implication of c-src and its inhibitor. *International journal of oncology*, 34:689–696, March 2009.

[260] Shigeki Umemura, Sachiyo Mimaki, Hideki Makinoshima, Satoshi Tada, Genichiro Ishii, Hironobu Ohmatsu, Seiji Niho, Kiyotaka Yoh, Shingo Matsumoto, Akiko Takahashi, Masahiro Morise, Yuka Nakamura, Atsushi Ochiai, Kanji Nagai, Reika Iwakawa, Takashi Kohno, Jun Yokota, Yuichiro Ohe, Hiroyasu Esumi, Katsuya Tsuchihara, and Koichi Goto. Therapeutic priority of the pi3k/akt/mtor pathway in small cell lung cancers as revealed by a comprehensive genomic analysis. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 9:1324–1331, September 2014.

[261] Jose P Vaque, Belen Fernandez-Garcia, Pablo Garcia-Sanz, Nuria Ferrandiz, Gabriel Bretones, Fernando Calvo, Piero Crespo, Maria C Marin, and Javier Leon. c-myc inhibits ras-mediated differentiation of pheochromocytoma cells by blocking c-jun up-regulation. *Molecular cancer research : MCR*, 6:325–339, February 2008.

[262] Kartik Venkatachalam, Fei Zheng, and Donald L Gill. Regulation of canonical transient receptor potential (trpc) channel function by diacylglycerol and protein kinase c. *The Journal of biological chemistry*, 278:29031–29040, August 2003.

[263] Felix Viana and Antonio Ferrer-Montiel. Trpa1 modulators in preclinical development. *Expert Opin Ther Pat*, 19(12):1787–1799, Dec 2009.

[264] Richard Wagland, Lucy Brindle, Sean Ewings, Elizabeth James, Mike Moore, Carol Rivas, Ana Ibanez Esqueda, and Jessica Corner. Promoting help-seeking in response to symptoms amongst primary care patients at high risk of lung cancer: A mixed method study. *PloS one*, 11:e0165677, 2016.

[265] Stephan N Wagner, Rupert Müller, Joachim Boehm, Barbara Pütz, Peter H Wünsch, and Heinz Höfler. Neuroendocrine neoplasms of the lung are not associated with point mutations at codon 12 of the ki-ras gene. *Virchows Archiv B*, 63(1):325, 1993.

[266] Xia Wan, Yungang Lu, Xueqin Chen, Jian Xiong, Yuanda Zhou, Ping Li, Bingqing Xia, Min Li, Michael X. Zhu, and Zhaobing Gao. Bimodal voltage dependence of trpa1: mutations of a key pore helix residue reveal strong intrinsic voltage-dependent inactivation. *Pflugers Arch*, 466:1273–1287, Oct 2013.

[267] Hong Wang and Jan Siemens. Trp ion channels in thermosensation, thermoregulation and metabolism. *Temperature (Austin, Tex.)*, 2:178–187, 2015.

[268] Mi Wang, Yong-Bo Tang, Ming-Ming Ma, Jing-Hui Chen, Chang-Ping Hu, Shui-Ping Zhao, Dao-Quan Peng, Jia-Guo Zhou, Yong-Yuan Guan, and Zheng Zhang. Trpc3 channel confers cerebrovascular remodelling during hypertension via transactivation of egf receptor signalling. *Cardiovascular research*, 109(1):34–43, 2015.

[269] Nan Wang, Hongwei Liang, Yong Zhou, Chen Wang, Suyang Zhang, Yi Pan, Yanbo Wang, Xin Yan, Junfeng Zhang, Chen-Yu Zhang, Ke Zen, Donghai Li, and Xi Chen. mir-203 suppresses the proliferation and migration and promotes the apoptosis of lung cancer cells by targeting src. *PLoS One*, 9(8):e105570, 2014.

[270] Shenglan Wang, Yi Dai, Tetsuo Fukuoka, Hiroki Yamanaka, Kimiko Kobayashi, Koichi Obata, Xiuyu Cui, Makoto Tominaga, and Koichi Noguchi. Phospholipase c and protein kinase a mediate bradykinin sensitization of trpa1: a molecular mechanism of inflammatory pain. *Brain*, 131(Pt 5):1241–1251, May 2008.

[271] S Goya Wannamethee, Gordon D O Lowe, A Gerald Shaper, Ann Rumley, Lucy Lennon, and Peter H Whincup. Associations between cigarette smoking, pipe/cigar smoking, and smoking cessation, and haemostatic and inflammatory markers for cardiovascular disease. *European heart journal*, 26:1765–1773, September 2005.

[272] Satomi Watanabe, Takeshi Yoshida, Hisato Kawakami, Naoki Takegawa, Junko Tanizaki, Hidetoshi Hayashi, Masayuki Takeda, Kimio Yonesaka, Junji Tsurutani, and Kazuhiko Nakagawa. T790m-selective egfr-tki combined with dasatinib as an optimal strategy for overcoming egfr-tki resistance in t790m-positive non-small cell lung cancer. *Molecular cancer therapeutics*, 16:2563–2571, November 2017.

[273] Robert A Weinberg. The cat and mouse games that genes, viruses, and cells play. *Cell*, 88(5):573–575, 1997.

[274] C. Widmann, S. Gibson, M. B. Jarpe, and G. L. Johnson. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev*, 79(1):143–180, Jan 1999.

[275] Michelle P. Winn, Peter J. Conlon, Kelvin L. Lynn, Merry Kay Farrington, Tony Creazzo, April F. Hawkins, Nikki Daskalakis, Shu Ying Kwan, Seth Ebersviller, James L. Burchette, Margaret A. Pericak-Vance, David N. Howell, Jeffery M. Vance, and Paul B. Rosenberg. A mutation in the trpc6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science*, 308(5729):1801–1804, Jun 2005.

[276] H Wiseman and B Halliwell. Damage to dna by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *The Biochemical journal*, 313 (Pt 1):17–29, January 1996.

[277] Ignacio I Wistuba, Adi F Gazdar, and John D Minna. Molecular genetics of small cell lung carcinoma. In *Seminars in oncology*, volume 28, pages 3–13. Elsevier, 2001.

[278] Piyaparisorn Wongvaranon, Varisa Pongrakhananon, Preedakorn Chunhacha, and Pithi Chanvorachote. Acquired resistance to chemotherapy in lung cancer cells mediated by prolonged nitric oxide exposure. *Anticancer research*, 33:5433–5444, December 2013.

[279] Inbal Wortzel and Rony Seger. The erk cascade: Distinct functions within various subcellular organelles. *Genes Cancer*, 2(3):195–209, Mar 2011.

[280] J L Wright, J E Hobson, B Wiggs, P D Pare, and J C Hogg. Airway inflammation and peribronchiolar attachments in the lungs of nonsmokers, current and ex-smokers. *Lung*, 166:277–286, 1988.

[281] G. Wu and S. Somlo. Molecular genetics and mechanism of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Mol Genet Metab*, 69(1):1–15, Jan 2000.

[282] Long-Jun Wu, Tara-Beth Sweet, and David E. Clapham. International union of basic and clinical pharmacology. lxxvi. current progress in the mammalian trp ion channel family. *Pharmacol Rev*, 62(3):381–404, Sep 2010.

[283] You-Ting Wu, Shao-Lun Yen, Chien-Feng Li, Ti-Chun Chan, Tzu-Ju Chen, Sung-Wei Lee, Hong-Lin He, I-Wei Chang, Chung-Hsi Hsing, and Yow-Ling Shiue. Overexpression of transient receptor protein cation channel subfamily a member 1, confers an independent prognostic indicator in nasopharyngeal carcinoma. *Journal of Cancer*, 7:1181–1188, 2016.

[284] Bailong Xiao, Adrienne E. Dubin, Badry Bursulaya, Veena Viswanath, Timothy J. Jegla, and Ardem Patapoutian. Identification of transmembrane domain 5 as a critical molecular determinant of menthol sensitivity in mammalian trpa1 channels. *J Neurosci*, 28(39):9640–9651, Sep 2008.

[285] Chuen-Mao Yang, Chih-Chung Lin, I-Ta Lee, Chih-Kai Hsu, Yu-Chen Tai, Hsi-Lung Hsieh, Pei-Ling Chi, and Li-Der Hsiao. c-src-dependent transactivation of egfr mediates corm-2-induced ho-1 expression in human tracheal smooth muscle cells. *Journal of cellular physiology*, 230:2351–2361, October 2015.

[286] Hiroyuki Yasuda, Susumu Kobayashi, and Daniel B Costa. Egfr exon 20 insertion mutations in non-small-cell lung cancer: preclinical data and clinical implications. *The lancet oncology*, 13(1):e23–e31, 2012.

[287] Hirofumi Yasue, Nobutaka Hirai, Yuji Mizuno, Eisaku Harada, Teruhiko Itoh, Michihiro Yoshimura, Kiyotaka Kugiyama, and Hisao Ogawa. Low-grade inflammation, thrombogenicity, and atherogenic lipid profile in cigarette smokers. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*, 70:8–13, January 2006.

[288] Ryohei Yoshida, Takaaki Sasaki, Yoshinori Minami, Yukiko Hibino, Shunsuke Okumura, Masatoshi Sado, Naoyuki Miyokawa, Satoshi Hayashi, Masahiro Kitada, and Yoshinobu Ohsaki. Activation of src signaling mediates acquired resistance to alk inhibition in lung cancer. *International journal of oncology*, 51:1533–1540, November 2017.

[289] Bin You, Yi-Lin Yang, Zhidong Xu, Yuyuan Dai, Shu Liu, Jian-Hua Mao, Osamu Tetsu, Hui Li, David M Jablons, and Liang You. Inhibition of erk1/2 down-regulates the hippo/yap signaling pathway in human nsclc cells. *Oncotarget*, 6:4357–4368, February 2015.

[290] Fan Zhang, Hua Yang, Zheng Wang, Stefan Mergler, Hongshan Liu, Tetsuya Kawakita, Souvenir D. Tachado, Zan Pan, José E. Capo-Aponte, Uwe Pleyer, Henry Koziel, Winston W Y. Kao, and Peter S. Reinach. Transient receptor potential vanilloid 1 activation induces inflammatory cytokine release in corneal epithelium through mapk signaling. *J Cell Physiol*, 213(3):730–739, Dec 2007.

[291] H. Zhang, S-h Zhang, H-w He, C-x Zhang, D-k Yu, and R-g Shao. Downregulation of g3bps inhibits the growth, migration and invasion of human lung carcinoma h1299 cells by suppressing the src/fak-associated signaling pathway. *Cancer Gene Ther*, 20(11):622–629, Nov 2013.

[292] Hongqiao Zhang, Honglei Liu, Zea Borok, Kelvin J A Davies, Fulvio Ursini, and Henry Jay Forman. Cigarette smoke extract stimulates epithelial-mesenchymal transition through src activation. *Free radical biology & medicine*, 52:1437–1442, April 2012.

[293] Lu Zhang, Jun Li, Jing Hu, Dandan Li, Xiaohui Wang, Rui Zhang, Hui Zhang, Meng Shi, and Hong Chen. Cigarette smoke extract induces egfr-tki resistance via promoting egfr signaling pathway and ros generation in nsclc cell lines. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 109:109–116, July 2017.

[294] Peng Zhang, Yan Ma, Yan Wang, Xin Ma, Yu Huang, Ronald A. Li, Song Wan, and Xiaoqiang Yao. Nitric oxide and protein kinase g act on trpc1 to inhibit 11,12-eet-induced vascular relaxation. *Cardiovasc Res*, 104(1):138–146, Oct 2014.

[295] Qunzhou Zhang, Xudong Tang, Zuo-Feng Zhang, Rita Velikina, Shihong Shi, and Anh D Le. Nicotine induces hypoxia-inducible factor-1α expression in human lung cancer cells via nicotinic acetylcholine receptor–mediated signaling pathways. *Clinical Cancer Research*, 13(16):4686–4694, 2007.

[296] Siyang Zhang, Xueshan Qiu, Yumei Gu, and Enhua Wang. Up-regulation of proline-rich tyrosine kinase 2 in non-small cell lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 62:295–301, December 2008.

[297] Yi Zhao, Yi Yang, Yunhua Xu, Shun Lu, and Hong Jian. Azd0530 sensitizes drug-resistant alk-positive lung cancer cells by inhibiting src signaling. *FEBS open bio*, 7:472–476, April 2017.

[298] Jie Zheng. Molecular mechanism of trp channels. *Comprehensive Physiology*, 3(1):221–242, January 2013.

[299] Shan Zhong, Yi-chu Nie, Zhen-yong Gan, Xiao-dong Liu, Zhang-fu Fang, Bo-nian Zhong, Jin Tian, Chu-qin Huang, Ke-fang Lai, and Nan-shan Zhong. Effects of schisandra chinensis extracts on cough and pulmonary inflammation in a cough hypersensitivity guinea pig model induced by cigarette smoke exposure. *Journal of ethnopharmacology*, 165:73–82, 2015.

[300] S. Zimmermann and K. Moelling. Phosphorylation and regulation of raf by akt (protein kinase b). *Science*, 286(5445):1741–1744, Nov 1999.

Anhang

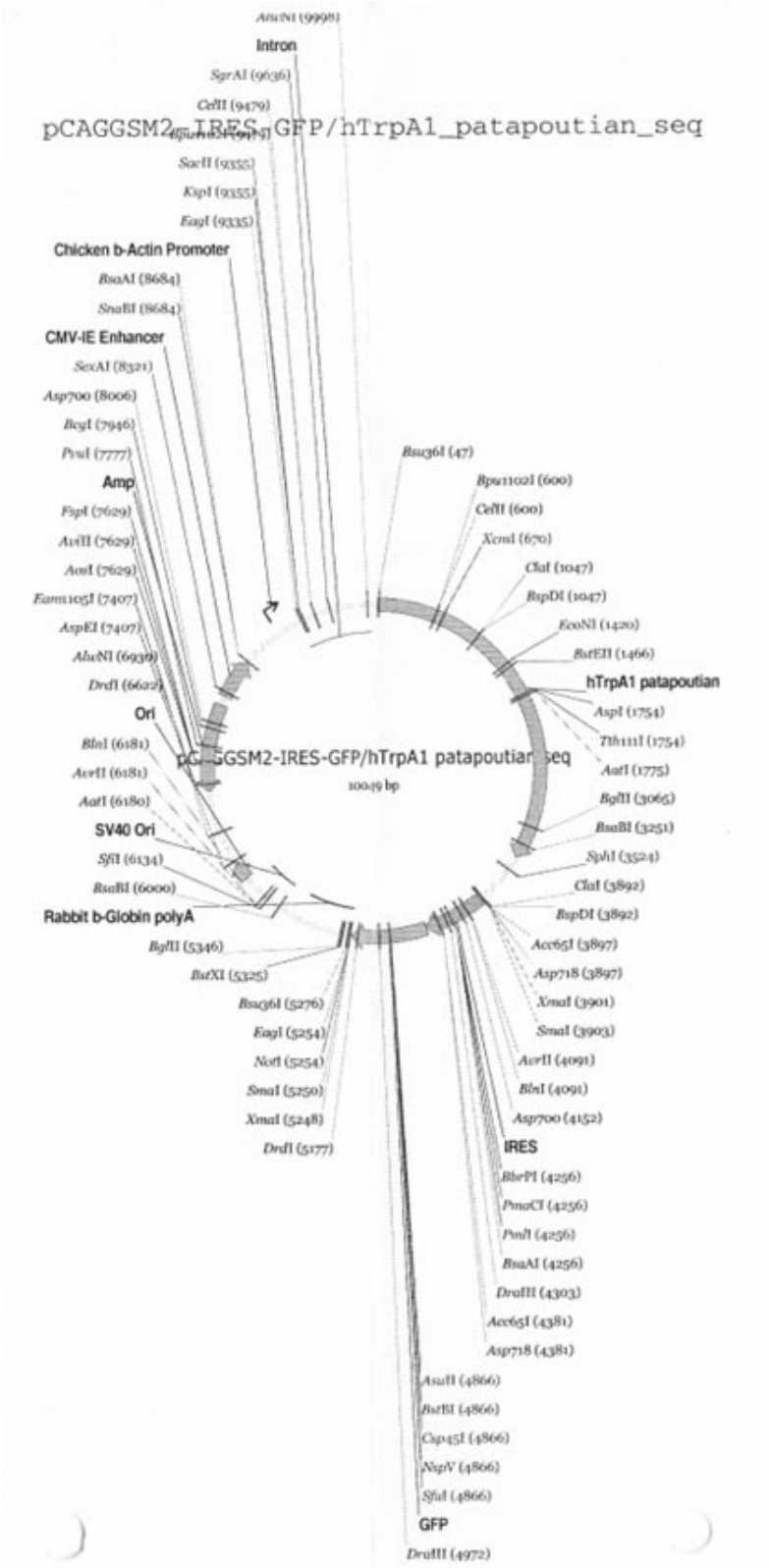


Abbildung 6.1: Verwendetes hTRPA1-kodierendes Plasmid: pCAGGSM2-IRES-GFP/hTRPA1_patapoutian_seq-Plasmid

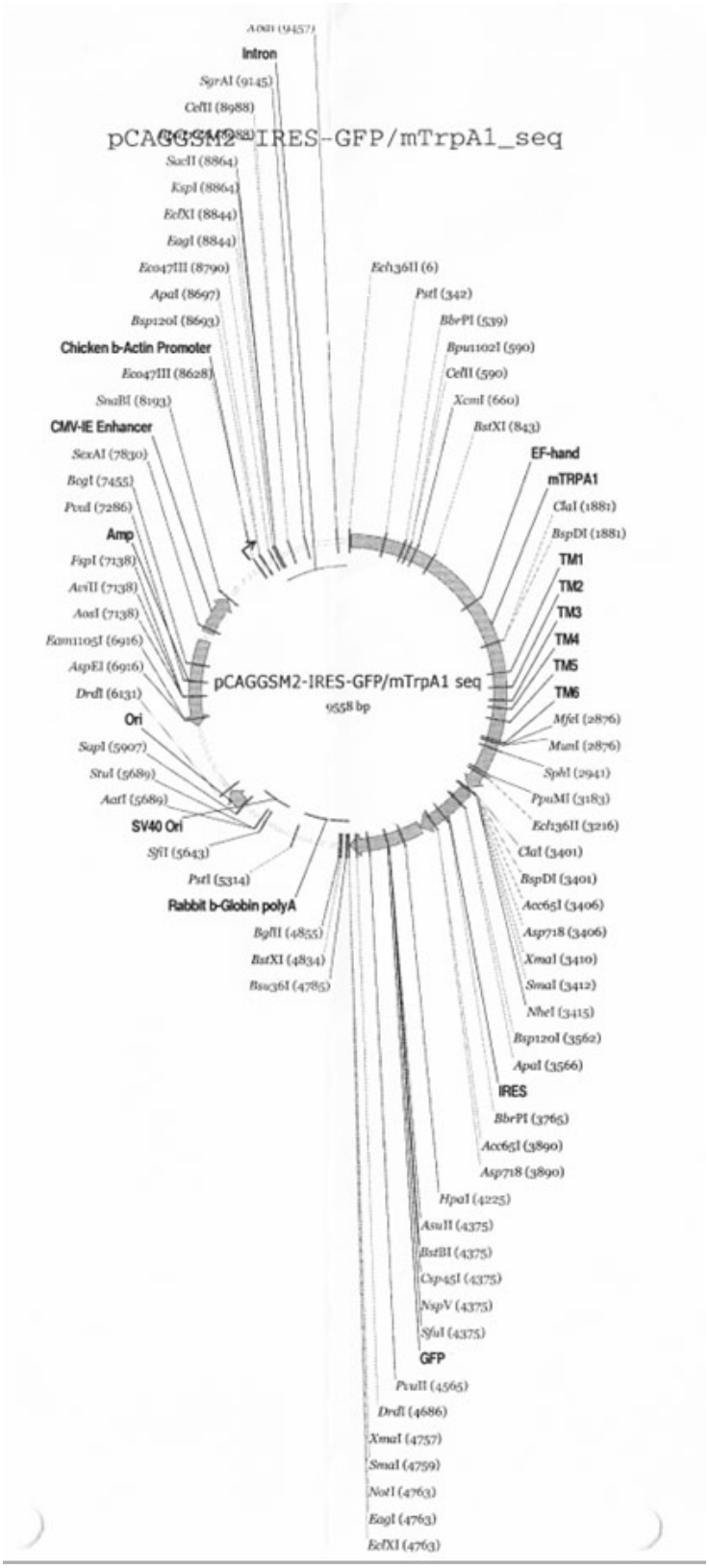


Figure 6.2: Verwendetes mTRPA1-kodierendes Plasmid: pCAGGSM2-IRES-GFP/mTRPA1_seq-Plasmid

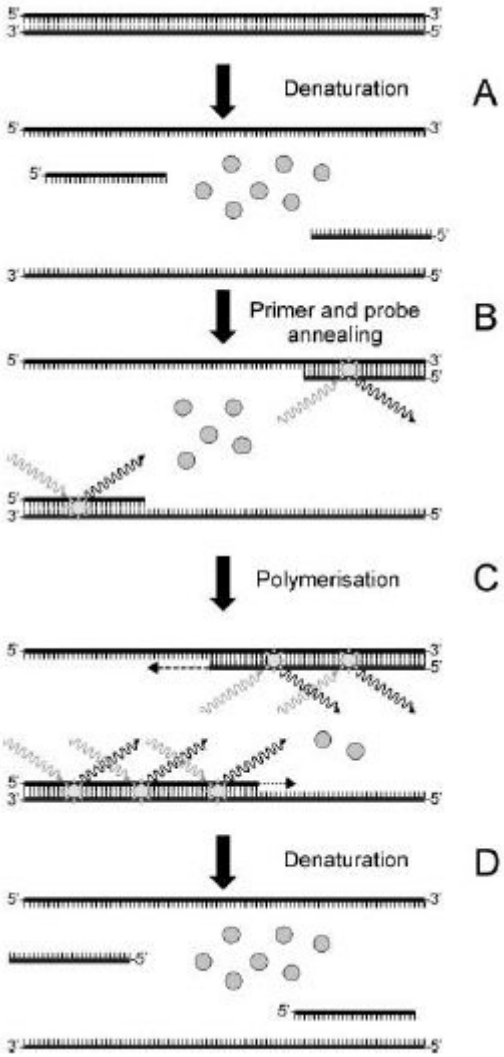


Abbildung 6.3: Vervielfältigung und Quantifizierung einer spezifischen DNA-Sequenz mittels PCR und SYBR Green; aus [38]
(A) Denaturierung: bei 95 °C liegen nur einsträngige DNA und deshalb ungebundenes SYBR Green vor, welches deshalb nur gering fluoresziert (B) Primerhybridisierung (Annealing): bei niedrigeren Temperaturen binden Primer an die Einzelstränge. Einige SYBR Green-Moleküle lagern sich dazwischen und führen zur mäßiger Fluoreszenz nach Exzitation (C) Elongation: immer mehr Doppelstänge werden mithilfe der Taq-Polymerase synthetisiert, in die sich SYBR Green-Moleküle einlagern. Die Fluoreszenz nimmt proportional zu. Die Fluoreszenzmessung erfolgt am Ende der Elongation (D) Erneute Denaturierung: bei 95 °C wird die DNA erneut in Einzelstränge aufgetrennt. Die Fluoreszenz sinkt wieder ab. Es folgt im Anschluss wieder (B).

Eidesstattliche Versicherung

Berr-Kirmair, Christina Maria, geb. Berr

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

"Untersuchung der toxisch-kanzerogenen Rolle von NO-induzierten und TRPA1-vermittelten Signalwegen in der Lunge in einem In-vitro-Zellsystem"

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, 14.03.2019	Christina M. Berr-Kirmair
Ort, Datum	Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Gudermann danke ich herzlich für die Möglichkeit unter seiner Leitung am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie zu promovieren.

Sehr herzlich möchte ich mich bei meinen Betreuer Dr. Thomas Büch für die sehr gute persönliche und fachliche Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken. Vielen Dank für ein immer offenes Ohr für Fragen und Probleme, für bereichernde Diskussionen und für das Heranführen an das wissenschaftliche Arbeiten.

Mein besonderer Dank gilt auch PD Dr. Dirk Steinritz für die äußerst konstruktive und bereichernde Unterstützung bei der schriftlichen Ausarbeitung und Korrektur dieser Arbeit. Seine engagierte Unterstützung und seine wertvollen Anregungen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Frau Dr. Eva Schäfer möchte ich mich für die fachliche Betreuung im Labor und die vielen praktischen Ratschläge bedanken.

Mein Dank gilt auch den weiteren Mitarbeitern des Walther-Straub-Instituts. Besonders möchte ich mich bedanken bei Dr. Andreas Breit für wertvolle Diskussionen und praktische Ratschläge, bei den TA's Maria Radtke und Ute Künzel-Mulas und bei Frau Dr. Stefanie Stohr für so manch schnelle und unkomplizierte Hilfe im Laboralltag. Des Weiteren möchte ich mich bedanken bei Frau Prof. Dr. Ingrid Boekhoff, Herrn PD Dr. Dr. Harald Mückter, Frau PD Dr. Susanne Mühlich, der Institutssekretärin Frau Jutta Schreier, und meinen Kolleginnen Maria-Theresia Demmel, Veronika Deák und Sahraa Khalid.

Für das kritische Lektorat möchte ich mich bedanken bei Raphael Kunisch, Ohnmar Hsam und Maria Glaser sowie für das Korrektorat bei meiner Mutter.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Mann bedanken, die mich kontinuierlich unterstützt, bestärkt und motiviert haben.