

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

Vorstand: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

**TRPA1-Kationenkanäle:
Expression und Funktion als Sauerstoffsensoren in
Epithelzellen des respiratorischen Systems**

Dissertation

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

vorgelegt von

Martina Margarete Kannler

aus

Augsburg

München, 2019

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

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Alexander Dietrich

Zweitgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Silke Meiners

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

Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.2019

➤ Inhaltsverzeichnis

➤ INHALTSVERZEICHNIS	3
➤ SUMMARY	8
➤ ZUSAMMENFASSUNG	9
➤ ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	11
➤ ABBILDUNGSVERZEICHNIS	13
➤ TABELLENVERZEICHNIS	16
1 EINLEITUNG	18
1.1 DAS RESPIRATORISCHE SYSTEM UND DIE FUNKTION AUSGEWÄHLTER EPITHELZELLEN	18
1.1.1 TRACHEALE EPITHELZELLEN	18
1.1.2 BRONCHIALE EPITHELZELLEN	19
1.1.3 ALVEOLÄRE EPITHELZELLEN (PNEUMOZYTEN) TYPI UND TYPII	19
1.2 SCHÄDIGUNGEN DER LUNGE DURCH EINEN ÜBERSCHUSS AN SAUERSTOFF (HYPEROXIE)	21
1.2.1 PATHOGENESE HYPEROXIE-ASSOZIIERTER LUNGENSCHÄDIGUNG	21
1.3 ISCHÄMIE-REPERFUSION-INDUZIERTER LUNGENSCHADEN	22
1.3.1 ENTSTEHUNG DES KARDIOGENEN UND NICHT-KARDIOGENEN LUNGENÖDEMS.....	23
1.3.2 PATHOGENESE DES ISCHÄMIE-REPERFUSION-INDUZIERTEN LUNGENSCHADENS.....	23
1.4 TRP-KANÄLE	24
1.4.1 EINTEILUNG UND STRUKTUR DER TRP-KANÄLE	24
1.4.2 AKTIVIERUNG DER TRP-KANÄLE.....	25
1.4.3 WICHTIGE VERTRETER DER TRP-FAMILIE: TRPC, TRPV UND TRPM.....	26
1.4.4 SPEICHER-OPERIERTER CALCIUM-EINSTROM DURCH ORAI-KANÄLE	27
1.5 DER TRPA1-KANAL	28
1.5.1 DAS TRPA1-GEN.....	28
1.5.2 DIE PROTEINSTRUKTUR DES TRPA1-KANALS.....	29
1.5.3 GEWEBESPEZIFISCHE EXPRESSION DES TRPA1-KANALS	31
1.5.4 EXPRESSION VON TRPA1-MRNA.....	31
1.6 PHARMAKOLOGIE DES TRPA1-KANALS	31
1.6.1 ENDOGENE UND EXOGENE TRPA1 AGONISTEN UND MÖGLICHE AKTIVIERUNGSMECHANISMEN	31
1.6.2 TRPA1 AKTIVIERUNG DURCH ALLYLISOTHIOCYANAT	32
1.6.3 TRPA1-KANAL INHIBITOREN UND WIRKMECHANISMUS	33
1.7 FUNKTION DES TRPA1-KANALS	34
1.7.1 TRPA1 ALS THERMOSENSOR.....	34
1.7.2 TRPA1 ALS SENSOR FÜR TOXISCHE SUBSTANZEN	35
1.7.3 TRPA1 ALS HYPEROXIE- UND HYPOXIE-SENSOR.....	35
1.7.4 PATHOLOGISCHE VERÄNDERUNG MIT BETEILIGUNG DES TRPA1-KANALS	37

1.7.4.1	Familiäres Episodisches Schmerzsyndrom.....	37
1.7.4.2	TRPA1 als neues Arzneimitteltarget.....	38
1.8	ZIEL DIESER ARBEIT	39

2 MATERIAL UND METHODEN..... 40

2.1	MATERIAL	40
2.1.1	MAUSLINIEN	40
2.1.2	ZELLINIEN	40
2.1.3	ZELLKULTURMEDIEN	40
2.1.4	CHEMIKALIEN	43
2.1.5	VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	45
2.1.6	LABORAUSSTATTUNG	46
2.1.7	MURINES TRPA1 PLASMID.....	48
2.1.8	ANTIKÖRPER.....	48
2.1.9	PUFFER UND LÖSUNGEN.....	49
2.1.10	ENZYME, „KITS“ UND MARKER	52
2.1.11	NANOSTRING® OLIGIONUKLEOTIDE	53
2.1.11.1	Murine Oligionukleotide	53
2.1.11.2	Humane Oligionukleotide	56
2.1.12	MIKROSKOPISCHE VERFAHREN.....	59
2.1.13	AUSWERTUNG UND STATISTIK	59
2.2	METHODEN.....	60
2.2.1	ZELLKULTUR	60
2.2.2	GENERIERUNG EINER TRPA1-DEFIZIENTEN MAUSLINIE	60
2.2.3	TRANSFEKTION DES MURINEN TRPA1 PLASMIDS IN HEK 293T ZELLEN	61
2.2.4	PRÄPARATION UND ISOLIERUNG PRIMÄRER MURINER LUNGENZELLEN	61
2.2.4.1	Alveoläre Epithelzellen TypII (ATII) und TypI (ATI)	61
2.2.4.2	Tracheale (tEpC) und bronchiale Epithelzellen (bEpC).....	64
2.2.4.3	Endothelzellen (EC).....	65
2.2.4.4	Fibroblasten (pmlF).....	67
2.2.4.5	Präkapilläre glatte Muskelzellen (PASMC)	68
2.2.5	„NON-CONTACT LASER CAPTURE MICRODISSECTION“ ZUR ISOLIERUNG VON LUNGENGEWEBEN.....	68
2.2.5.1	Prinzip der Laser-Mikrodissektion.....	68
2.2.5.2	Isolierung von humanen Epithel- und Endothelzellen mittels der Laser-Mikrodissektion.....	68
2.2.5.3	Hämatoxylin Färbung.....	69
2.2.6	NANOSTRING® MRNA-EXPRESSIONSANALYSE	69
2.2.6.1	Prinzip der Nanostring® mRNA-Expressionsanalyse	69
2.2.6.2	Isolation von humaner und muriner mRNA.....	70
2.2.6.3	Hybridisierungsreaktion.....	73
2.2.6.4	Aufreinigung und Immobilisierung der RNA mittels nCounter® Prep Station.....	74
2.2.6.5	Quantifizierung der mRNA-Oligionukleotid Komplexe durch den „Digital Analyser“ und der nSolver® 3.0 Software.....	74
2.2.7	IMMUNOBLOTTING („WESTERN BLOT“).	75
2.2.7.1	Proteinisolierung.....	75
2.2.7.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels „BCA-Assay“.....	76
2.2.7.3	Trenn- und Sammelgel.....	76

2.2.7.4	Auftrennung von Proteinen mittels „Sodiumdodecylsulfate Polyacrylamidelectrophoresis“ (SDS-PAGE) und Proteintransfer	77
2.2.7.5	Immuno- und Signaldetektion	78
2.2.8	IMMUNOFLUORESCENZ-MIKROSKOPIE	79
2.2.9	MESSUNG DER INTRAZELLULÄREN CALCIUMKONZENTRATION MITTELS FURA-2 (ÜBERNAHME AUS DER DOKTORARBEIT VON JANA DEMLEITNER [97])	80
2.2.9.1	TRPA1 Aktivierung durch Allylithiocyanat und Hemmung durch A-967076.....	81
2.2.9.2	TRPA1 Aktivierung durch Kältereiz und Inhibition durch A-967079.....	82
2.2.9.3	Hypoxie (N ₂) und Hyperoxie (O ₂) Experiment	82
2.2.10	ETABLIERUNG DES MURINEN ISOLIERTEN-PERFUNDIERTEN LUNGENMODELLS (IPL) ZUR QUANTIFIZIERUNG VON LUNGENÖDEMEN	83
2.2.10.1	Aufbau des isolierten-perfundierten Lungenmodells (IPL)	84
2.2.10.2	Allgemeine Versuchsvorbereitungen.....	84
2.2.10.3	Präparation der isolierten Lunge	85
2.2.10.4	Protokoll zur Quantifizierung des Ischämie-Reperfusion induzierten Lungenödems im isolierten-perfundierten Lungenmodell (IPL).....	86
2.2.10.5	Protokoll zur Quantifizierung des Halb-Losts (2-Chlorethylethylsulfid/ CEES) -induzierten Lungenödems im isolierten-perfundierten Lungenmodell (IPL)	86
2.2.11	<i>IN-VIVO</i> MODELL DER HYPEROXIE-INDUZIERTEN [O ₂] ALVEOLÄREN-EPITHELIALEN HYPERPLASIE.....	87
2.2.11.1	Allgemeiner Versuchsaufbau	87
2.2.12	QUANTIFIZIERUNG HISTOMORPHOLOGISCHER STRUKTUREN IN MURINEN LUNGENSCHNITTEN MITTELS STEREOLOGISCHER METHODE (CAST).....	87
2.2.12.1	Prinzip der CAST Methode („Computer Assisted Stereological Toolbox“)	88
2.2.12.2	Präparation, Gewebekonservierung und Einbettung.....	88
2.2.12.3	Masson-Trichrom-Färbung	89
2.2.12.4	Repräsentative Auswahl der Messbereiche durch die Visopharm®- „Software“	90
2.2.12.5	Messung ausgewählter Parameter mittels CAST-System	91
2.2.12.6	Quantifizierung ausgewählter stereologischer Parameter	92
3	<u>ERGEBNISSE.....</u>	93
3.1	CHARAKTERISIERUNG DER ISOLIERTEN EPITHELZELLEN DURCH IMMUNOZYTOCHEMIE UND IM „WESTERN BLOT“ ...	93
3.1.1	NACHWEIS VON ZYTOKERATINEN IN PRIMÄREN MURINEN TRACHEALEN (tEPC) UND BRONCHIALEN (bEPC) WILDTYP EPITHELZELLEN	93
3.1.1.1	Nachweis der Pan-Zytokeratinen in trachealen Wild-Typ Epithelzellen (tEpC).....	93
3.1.1.2	Nachweis der Zytokeratinen in bronchialen Wild-Typ Epithelzellen (bEpC)	94
3.1.2	NACHWEIS VON PRO-SURFACTANT PROTEIN C IN PRIMÄREN MURINEN ALVEOLÄREN WILD-TYP EPITHELZELLEN TYPII UND PODOPLANIN IN EPITHELZELLEN TYPI	95
3.1.2.1	Nachweis von Pro-Surfactant Protein C durch Immunocytochemie in alveolären Wild-Typ Epithelzellen TypII am zweiten Tag nach Isolation.....	95
3.1.2.2	Nachweis von Pro-Surfactant Protein C und Podoplanin durch Immunocytochemie in alveolären Epithelzellen am sechsten Tag nach der Isolation.....	96
3.1.3	SELEKTION VON ZELLEN DES BLUTBILDENDEN SYSTEMS UND IMMUNZELLEN MITTELS DER SPEZIFISCHEN OBERFLÄCHENMARKER CD16/CD32 UND CD45	97
3.1.4	NACHWEIS DES MURINEN UND TRPA1-PROTEINS MITTELS „WESTERN BLOT“ ANALYSEN	97
3.2	ISOLATION VON HUMANEM LUNGENSEPITHELGEWEBE MITTELS DER LASER-MIKRODISSEKTION.....	98
3.3	NANOSTRING® MRNA-EXPRESSIONSPROFIL AUSGEWÄHLTER ORAI-, STIM- UND TRP-PROTEINE IN NEURONALEN UND NICHT-NEURONALEN GEWEBEN	98

3.3.1	MRNA-EXPRESSIONSPROFIL FÜR ORAI-, STIM- UND TRP-PROTEINE IN IMMORTALISIERTEN ZELLINIEN	99
3.3.1.1	HEK 293T hTRPA1 versus HEK 293T Wild-Typ Zellen	99
3.3.1.2	A 549 Zellen	100
3.3.2	MRNA-EXPRESSIONSPROFIL FÜR ORAI-, STIM- UND TRP-PROTEINE IN MURINEN GEWEBEN.....	101
3.3.2.1	MRNA-Expression in Lungengewebe	101
3.3.2.2	mRNA-Expression in alveolären Epithelzellen TypII	101
3.3.2.3	MRNA-Expression in alveolären Epithelzellen TypI.....	102
3.3.2.4	Vergleich der mRNA-Expression für ORAI-, STIM- und TRP-Proteine in alveolären Epithelzellen TypII mit TypI	102
3.3.2.5	MRNA-Expressionsprofil in Endothelzellen der Lungengefäße	103
3.3.2.6	MRNA-Expressionsprofile in Fibroblasten.....	104
3.3.2.7	MRNA-Expression in präkapillären arteriellen glatten Muskelzellen	104
3.3.2.8	MRNA-Expressionsprofil trachealer Epithelzellen.....	105
3.3.3	MRNA-EXPRESSIONSPROFIL VON ORAI-, STIM- UND TRP-PROTEINEN IN HUMANEN PRIMÄRGEWEBEN	105
3.3.3.1	MRNA-Expressionsprofil in humanem Lungengewebe	105
3.3.4	MRNA-EXPRESSIONSPROFIL VON ORAI-, STIM- UND TRP-PROTEINEN IN DORSALEN SPINALGANGLIEN (DRG)	106
3.3.5	MRNA-EXPRESSIONSPROFILE VON ORAI-/ STIM- UND TRP-PROTEINEN IN MURINEN LUNGENGEBEN...	107
3.4	NANOSTRING® MRNA-EXPRESSIONSPROFIL VON TRPA1 IN NICHT-NEURONALEN ZELLEN UND IN LUNGENGEBE...	108
3.4.1	MRNA-EXPRESSION DES TRPA1-KANALS IN PRIMÄREN MURINEN GEWEBEN.....	108
3.5	ANALYSEN DER INTRAZELLULÄREN Ca^{2+}-KONZENTRATION ($[Ca^{2+}]_i$) IN ZELLINIEN UND PRIMÄREN ZELLEN NACH STIMULATION MIT TRPA1-KANAL-AKTIVATOREN UND INHIBITOREN SOWIE MIT KALTEN, HYPOXISCHEN BZW. HYPEROXISCHEN LÖSUNGEN	110
3.5.1	MESSUNG DER INTRAZELLULÄREN Ca^{2+} -KONZENTRATION IN EINER STABIL TRPA1 EXPRIERENDEN HUMANEN HEK 293T-ZELLINIE.....	110
3.5.1.1	TRPA1-Kanal Aktivierung durch Allylthiocyanat und Inhibition durch A-967079	110
3.5.1.2	TRPA1-Kanal Aktivierung durch Kälte und Inhibition durch dem Hemmstoff A-967079	111
3.5.1.3	Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in HEK 293T hTRPA1 Zellen nach Applikation hyperoxischer HBSS Lösung und Inhibition durch A-967079	113
3.5.1.4	Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch hypoxische HBSS Lösung und Inhibition durch A-967079	115
3.5.2	ERHÖHUNG DER INTRAZELLULÄREN Ca^{2+} -KONZENTRATION ALVEOLÄRER WILD-TYP EPITHELZELLEN TYPII DURCH ALLYLISOTHIOCYANAT	117
3.5.3	ZÄHLUNG DER INTRAZELLULÄREN Ca^{2+} -KONZENTRATION IN HYPEROXISCHER HBSS LÖSUNG IN MURINEN PRIMÄREN WILD-TYP VS. TRPA1-DEFIZIENTEN ZELLEN MITTELS FURA-2-AM.....	118
3.5.3.1	Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in trachealen Epithelzellen nach Applikation hyperoxischer Lösung	118
3.5.3.2	Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in bronchialen Epithelzellen nach Applikation hyperoxischer Lösung	119
3.5.3.3	Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in alveolären Epithelzellen TypII nach Applikation hyperoxischer Lösung	120
3.5.4	MESSUNG DER INTRAZELLULÄREN Ca^{2+} -KONZENTRATION IN HYPOXISCHER HBSS LÖSUNG IN MURINEN WILD-TYP VERSUS TRPA1-DEFIZIENTEN ZELLEN.....	121
3.5.4.1	Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in trachealen Epithelzellen nach Applikation hypoxischer Lösung	121
3.5.4.2	Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in bronchialen Epithelzellen nach Applikation hypoxischer Lösung	123

3.5.4.3	Messung der intrazellulären Ca ²⁺ -Konzentration in alveolären Epithelzellen TypII nach Applikation hypoxischer Lösung	124
3.6	QUANTIFIZIERUNG DER ÖDEMBILDUNG IN DER ISOLIERTEN-PERFUNDIERTEN LUNGE (IPL)	126
3.6.1	MESSUNG DER TOXIN-INDUZIERTEN ÖDEMBILDUNG IN WILD-TYP UND TRPA1-DEFIZIENTEN LUNGEN NACH TRACHEALER APPLIKATION VON HALB-LOST	126
3.6.2	MESSUNG DER ISCHÄMIE-REPERFUSION-INDUZIERTEN ÖDEMBILDUNG IN WILD-TYP UND TRPA1 –DEFIZIENTEN LUNGEN	128
3.7	VERGLEICH VON WILD-TYP UND TRPA1-DEFIZIENTEN MÄUSEN IN EINEM <i>IN-VIVO</i> MODELL DER HYPEROXIE-ASSOZIIERTEN LUNGENSCHÄDIGUNG.....	129
3.7.1	DARSTELLUNG DER REPRÄSENTATIVEN LUNGENMORPHOLOGIE NACH HYPEROXISCHER BEHANDLUNG MITTELS MIRAX SCAN	129
3.7.1.1	Septales Gewebe	129
3.7.1.2	Lungengefäße und epitheliales Gewebe.....	130
3.7.2	QUANTIFIZIERUNG HYPEROXIE-INDUZIRTER PATHOLOGISCHER VERÄNDERUNGEN DER LUNGENMORPHOLOGIE MIT HILFE VON STEREOLOGISCHEN PARAMETERN	131
4	<u>DISKUSSION.....</u>	134
4.1	ISOLATION UND CHARAKTERISIERUNG TRACHEALER UND BRONCHIALER EPITHELZELLEN	135
4.2	MRNA-EXPRESSIONSPROFILE VON TRPA1-, ANDEREN TRP SOWIE ORAI- UND STIM-PROTEINEN MIT HILFE DER NANOSTRING® TECHNOLOGIE UND NACHWEIS DER TRPA1-EXPRESSION MIT SPEZIFISCHEN ANTISEREN IN ZELLEN DES RESPIRATIONSTRAKTS	136
4.3	QUANTIFIZIERUNG VON LUNGENÖDEMEN IM <i>EX-VIVO</i> MODELL DER ISOLIERTEN PERFUNDIERTEN MAUSLUNGE... ..	138
4.3.1	ROLLE VON TRPA1-KANÄLEN FÜR DAS HALB-LOST-INDUZIERTES LUNGENÖDEM	138
4.3.2	DIE ROLLE VON TRPA1 BEIM ISCHÄMIE-REPERFUSION-INDUZIRTEM LUNGENÖDEM.....	140
4.4	TRPA1 ALS MÖGLICHER HYPOXIE- ODER HYPEROXIE-SENSOR IN DER LUNGE	141
➤	<u>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG</u>	<u>143</u>
➤	<u>DANKSAGUNG.....</u>	<u>144</u>
➤	<u>LITERATURVERZEICHNIS.....</u>	<u>145</u>

➤ Summary

The Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) channel as a member of the TRP-family harbors several so called ankyrin repeats in its amino-terminus. Moreover, the channel is composed of intracellular termini and six transmembrane domains with a pore-forming unit between domain 5 and 6 like all other TRP channels. Four TRPA1 monomers build a functional non-selective cation channel, which was characterized as a cellular sensor protein for chemical warfare agents like the sulfur mustard derivate 2-Chloroethylethylsulfid (CEES). Furthermore, lack of oxygen (hypoxia) and excess of oxygen (hyperoxia) activates TRPA1 channels, as shown *in vitro* and *in vivo* in neuronal tissues. On a molecular basis, chemical modifications of amino acids like cysteines in or outside of the ankyrin repeats of the channel are induced by chemicals or oxygen, respectively. TRPA1 protein was initially also identified in lung epithelium. However, its expression in non-neuronal tissues of the respiratory tract is due to antibodies of unknown specificity a matter of debate and its function in these tissues is elusive.

Therefore, TRPA1-specific mRNAs and proteins were identified in non-neuronal tissues of the respiratory tract after isolation of tracheal and alveolar epithelial cells in this thesis using direct mRNA quantification (Nanostring® technology) and specific TRPA1 antibodies. A small but detectable amount of TRPA1 mRNA was identified in tracheal and alveolar (alveolar type I (ATI) and alveolar type II (ATII)) epithelial cells and TRPA1 protein was verified in ATII cells. Moreover, TRPA1-deficient lung and epithelial cells from the respiratory tract were isolated from TRPA1-/- mice to compare edema formation or increases in intracellular Ca²⁺ content after application of chemical stimuli like oxygen or sulfur mustard derivates with wild-type (WT) lungs or cells. Methods like the isolated perfused lung for quantification of edema formation and Ca²⁺ imaging in alveolar, bronchial and tracheal epithelial cells were established in the laboratory. Intracellular Ca²⁺ content was increased after application of hypoxic and hyperoxic solutions in tracheal bronchial, ATI and ATII cells. TRPA1-deficient hypoxic cells however, showed a significantly lower increase than control cells. To clarify the role of TRPA1 channels in hyperoxia-induced alveolar hyperplasia, WT and TRPA1-deficient mice were housed in climate chambers with excess oxygen. However, no differences in thickening of alveolar septae was detected in the different genotypes. In isolated perfused lungs similar amounts of edema formation were detected after application of ischemia in both genotypes, while TRPA1-deficient lungs exposed significantly larger edemas after application of the sulfur mustard derivate CEES than control lungs. Further experiments to clarify the role of TRAP1 channels as sensors for oxygen and sulfur mustard in non-neuronal tissues must follow, before these channels are considered as pharmacological targets for therapeutic interventions after toxic injury.

➤ Zusammenfassung

Der „Transient Receptor Potential Ankyrin 1“ (TRPA1) Kanal zeichnet sich als Mitglied der TRP-Familie durch eine größere Zahl an sog. „Ankyrin-Repeats“ im Aminoterminus aus. Ansonsten besitzt er wie alle anderen TRP-Kanäle intrazelluläre Termini und sechs Transmembrandomänen mit einem Porenbildenden Bereich zwischen der Domäne fünf und sechs. Vier TRPA1-Monomere bilden einen funktionsfähigen unselektiven Kationenkanal, der als vielseitiges zelluläres Sensorprotein auch für chemische Kampfstoffe wie Lost-Derivate charakterisiert wurde. Außerdem zeichnet sich der TRPA1-Kanal besonders durch seine Aktivierung durch Sauerstoffmangel (Hypoxie) und durch Sauerstoffüberschuss (Hyperoxie) aus, die *in-vitro* und *in-vivo* in neuronalen Geweben beschrieben wurde. Dabei werden auf molekularer Ebene Aminosäuren, z.B. Cysteine in den „Ankyrin-Repeats“, durch toxische Chemikalien oder an den Termini durch veränderte Sauerstoffkonzentrationen kovalent modifiziert. TRPA1-Protein wurde auch initial im Lungenepithel durch fluoreszenzgekoppelte TRPA1-Antikörper nachgewiesen. Seine Expression in nicht-neuronalen Geweben des Respirationstrakts gilt jedoch durch Verwendung von Antikörpern unbekannter Spezifität als nicht gesichert. Auch über seine Funktion in diesen Geweben als Sensor ist wenig bekannt.

In dieser Arbeit wurden TRPA1-spezifische mRNAs- und Proteine in frisch isolierten nicht-neuronalen epithelialen Zellen des Respirationstrakts eindeutig nachgewiesen. Dazu wurde eine Methode zur direkten Quantifizierung von TRPA1-mRNA (Nanostring®-Technologie) und spezifische TRPA1-Antikörper zur Identifizierung TRPA1-exprimierender Gewebe genutzt. Mit Hilfe dieser Techniken konnte eine geringe TRPA1-mRNA-Expression in trachealen Epithelzellen und alveolären (alveoläre Typ I (ATI) und Typ II (ATII)) Zellen nachgewiesen werden. Außerdem wurde TRPA1-Protein mit einem spezifischen Antikörper in ATII-Zellen identifiziert. Darüber hinaus wurden aus einem globalen TRPA1-defizienten (TRPA1^{-/-}) Mausmodell TRPA1-freie Lungen sowie Epithelzellen des Respirationstrakts entnommen, um die Bildung eines Lungenödems oder den zellulären Ca²⁺-Einstrom nach Applikation chemischer Reize, wie Sauerstoff oder Halb-Lost, mit TRPA1-exprimierenden sog. Wild-Typ-(WT)-Lungen oder -Zellen vergleichen zu können. Zu diesem Zweck wurden das Modell der isolierten perfundierten Mauslunge für die Quantifizierung von Lungenödemen sowie die Methode zur zellulären Ca²⁺-Einstrom-Messung in alveoläre, bronchiale und tracheale Epithelzellen etabliert. Nach Applikation hypoxischer und hyperoxischer Lösung konnten in Ca²⁺-Einstrom-Experimenten Veränderungen der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration in primären trachealen, bronchialen Epithelzellen und ATII-Zellen von WT und TRPA1-defizienten Mäusen quantifiziert werden. Mit Hypoxie behandelte TRPA1-defiziente Zellen zeigten aber einen signifikant schwächeren intrazellulären Ca²⁺-Einstrom im Vergleich zu den WT-Zellen. Um die Rolle des TRPA1-Kanals in der Hyperoxie-induzierten alveolären Hyperplasie zu untersuchen, wurden WT und TRPA1^{-/-} Mäuse in Kammern mit Sauerstoffüberschuss gehalten. Es

konnten jedoch keine Unterschiede in den charakteristischen Verdickungen der alveolären Septen zwischen den Genotypen beobachtet werden. Im Modell der isolierten perfundierten Lunge wurden ebenfalls keine Unterschiede in der Ödembildung nach Applikation von Ischämie festgestellt, während TRPA1-defiziente Lungen eine deutlich stärkere Ödembildung nach Applikation von Halb-Lost (2-Chloroethylethylsulfid (CEES)) als Kontrolllungen zeigten. Weitere Experimente zur Rolle von TRPA1 als Sauerstoffsensor und Experimente für die Detektion von chemischen Kampfstoffen in nicht neuronalen Geweben wären notwendig, damit der Kanal eindeutig als pharmakologische Zielsubstanz für die Therapie toxischer Schäden identifiziert werden kann.

➤ Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung

Abca3
AITC
AK
ALI
APS
AQ5, Aap5
AR
AS
Asp
ATII
ATII-ATI
ATP
AUC
BCA
bEpC
BPD
BSA
Ca²⁺
[Ca²⁺]_i
CAST
CC
CC10
CD
cDNA
CEES, Halb-Lost
CGRP
CPAP
CO₂
COPD
CRAC
Cys
DAG
DAPI
dH₂O
DMEM
DRG
EC
EMT
ER
FCS
FEPS
FITC
FURA-2-AM
GAPDH
gp91^{phox}
GFP
Glu
H₂O

Begriff

„ATP-binding cassette protein 3“
Allylthiocyanat
Antikörper
„Acute lung injury“
Ammoniumpersulfat
Aquaporin 5
„Ankyrin repeats“
Aminosäure
Asparaginsäure
Alveoläre Epithelzellen TyplI
Alveoläre Epithelzellen Typl
Adenosintriphosphat
„Area under the curve“
Bicichoninsäure
Bronchiale Epithelzellen
Bronchopulmonale Dysplasie
Bovines Serumalbumin
Calciumionen
Intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration
„Computer-assisted stereological toolbox“
„Coiled-coil domain“
Klubzellen Protein 10
„Common antigen“
Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
2-Chloroethylethylsulfid
„Calcitonin Gene Related Peptide“
„Continuous positive airway pressure“
Kohlenstoffdioxid
Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
„Calcium-release-activated channels“
Cystein
Diacylglycerol
4,6-Diamidin-2-phenylindol
Destilliertes Wasser
„Dulbecco's modified eagle medium“
Dorsale Spinalganglien
Endothelzellen
Epitheliale-mesenchymale Transition
Endoplasmatisches Retikulum
Fetales Kälberserum
Familiäres Episodisches Schmerzsyndrom
Fluoresceinisothiocyanat
Fura-2-Acetoxy-methylester
Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Glycoprotein 91^{phox}
Grün fluoreszierendes Protein
Glutaminsäure
Wasser

H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBSS	„Hank's balanced salt solution“
4-HNE	4-Hexanonenal
IC	Immunzellen
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IPLM	Isoliertes perfundiertes Lungenmodell
kDa	Kilodalton
LIRE	Ischämie-Reperfusion-induzierter Lungenschaden
MAP	„Mitogen-activated protein“
Mg ²⁺	Magnesiumionen
Min.	Minuten
MLCK	Myosin-Leichte-Ketten-Kinase
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
Muc5B	Mucin 5B
NAC	N-Acetylcystein
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotid
NO	Stickstoffmonoxid
NOX	Nicotinamidadenindinucleotid-Oxidase
OH ⁻	Hydroxyl-Radikal
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxid-Radikal
p22 ^{phox}	Adapterprotein 22 ^{phox}
PAP	Periarterieller Druck
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PASMC	Periarterielle glatte Muskelzellen
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PG	Prostaglandin
PH	„Pleckstrin homology domain“
PHD	Prolinhydroxylase
Phe	Phenylalanin
PLC	Phospholipase C
PP, Pdpn	Podoplanin
Pro	Prolin
ProSp-C	Pro-Surfactant Protein C
p63	Transkriptionsfaktor Trp63
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion
RADS	„Reactive airway dysfunction syndrome“
ROCE	Rezeptor-operierter Calcium-Einstrom
ROI	„Regions of interest“
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SCGB	Sekreteoglobin
SdHa	Succinat-Dehydrogenase-Komplex
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamidelektrophorese
Sek.	Sekunden
SEM	„Standard error of the mean“
Ser	Serin
SOCE	Speicher-operierter Calcium Einstrom
SOP	Standardisierte Arbeitsanweisung
TEMED	Tetramethylethylendiamin

tEpC	Tracheale Epithelzellen
Thr	Threonin
TNF α	Tumornekrosefaktor Alpha
TRP	„Transient Receptor Potential“
TRPA	„Transient Receptor Potential Ankyrin“
TRPC	„Transient Receptor Potential Canonical or Classical“
TRPM	„Transient Receptor Potential Melastin“
TRPML	„Transient Receptor Potential Mucolipin“
TRPP	„Transient Receptor Potential Polycystin“
TRPV	„Transient Receptor Potential Vanilloid“
VE H ₂ O	Vollentsalztes Wasser
WB	„Western Blot“

➤ **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Aufbau und Funktion des pulmonalen Systems modifiziert nach Volckaert et al. [4] und Rokicki et al.[5].....	18
Abbildung 2: Differenzierungsschritte pulmonaler Epithelzellen und zellspezifische Marker Proteine modifiziert nach Volckaert et al. [4].....	20
Abbildung 3: Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies nach Mach et al. [21].	22
Abbildung 4: Kardiogenes und nicht-kardiogenes Lungenödem modifiziert nach Ware et al. [29].	23
Abbildung 5: Phylogenetischer Baum der humanen TRP-Familie [36].	25
Abbildung 6: Darstellung des Speicher-operierter Ca ²⁺ Einstroms (SOCE) [59].	28
Abbildung 7: Phylogenetischer Baum des TRPA-Genes unterschiedlicher Organismen modifiziert nach Nilius et al. [62].	29
Abbildung 8: Darstellung der Proteinstruktur eines TRPA1-Kanal Monomers (modifiziert nach [62])..	30
Abbildung 9: Dreidimensionale Struktur des funktionellen humanen TRPA1-Kanals mittels Kryoelektronen-Mikroskopie [60].	30
Abbildung 10: Exogene und endogene Aktivatoren des humanen TRPA1-Kanals modifiziert nach Bautista et al. [64].	32
Abbildung 11: Porenbildende Domäne des TRPA1-Kanals nach AITC Stimulation modifiziert nach Paulsen et al. [60].	33
Abbildung 12: Bindungsmechanismus des TRPA1-spezifischen Hemmstoffs A-967079 nach Paulsen et al. [60].	33
Abbildung 13: Kälte-induzierte vaskuläre Antwort des humanen TRPA1-Kanals [75].	34
Abbildung 14: Sauerstoffsensoren im menschlichen Körper modifiziert nach Mori et al. [82].	36
Abbildung 15: Molekulare Aktivierung des TRPA1-Kanals durch Hyperoxie und Hypoxie im sensorischen Neuron (modifiziert nach Mori et al. [82]).	37
Abbildung 16: Plasmid Vektor des murinen TRPA1-PLasmids.....	48
Abbildung 17: Präparation und Isolation alveolärer-epithelialer Zellen TypII	63
Abbildung 18: Nanostring® Prinzip.....	70
Abbildung 19: Reaktion von Bicichoninsäure- Kupfer- Komplex zur Gesamtproteinbestimmung	76
Abbildung 20: Exzitationsspektrum des Calciumindikators Fura-2.....	80
Abbildung 21: Aufbau isoliertes-perfundiertes Lungenmodell (IPL).....	84
Abbildung 22: Präparation isolierte-perfundierte Lunge.....	86
Abbildung 23: Randomisierung der Messbereiche während der CAST-Messung.	90
Abbildung 24: Repräsentative Darstellung der CAST-Messung.....	92
Abbildung 25: Nachweis von Zytokeratinen mittels Immunocytochemie in trachealen Wild-Typ Epithelzellen am siebten Tag nach Isolation	94

Abbildung 26: Nachweis von Zytokeratinen in primären bronchialen Wild-Typ Epithelzellen am siebten Tag nach Isolation mittels der Immunocytochemie.....	94
Abbildung 27: Phasen-Kontrast (1) und Immunofluoreszenz (2) Aufnahmen von alveolären Wild-Typ Epithelzellen TypII am zweiten Tag nach Isolation.....	95
Abbildung 28: Phasen-Kontrast (1) und Immunofluoreszenz (2) Aufnahmen von alveolären Wild-Typ Epithelzellen am sechsten Tag nach der Isolation	96
Abbildung 29: Nachweis von Podoplanin mittels „Western-Blot“ in Zelllysaten aus alveolären Wild-Typ Epithelzellen am zweiten und sechsten Tag nach der Präparation.....	96
Abbildung 30: Selektion von Zellen des Immun- und blutbildenden Systems durch CD16/CD32 und CD45 Antikörper.....	97
Abbildung 31: Nachweis von TRPA1-Protein (124 kDa) im „Western-Blot“ mittels TRPA1-Antikörpern (AB68847 (Spur 1-4) und Ab68848 (Spur 5-7) in Lungenlysaten (TRPA1-/-, WT), alveolären Wild-Typ Epithelzellen (ATII WT Tag 2), Endothelzellen (EC WT), pulmonalen murinen Lungenfibroblasten (pmLF WT), präkapillären glatten Muskelzellen (PASMOC WT).	98
Abbildung 32: Isolation von humanem Lungenepithelgewebe mittels Laser-Mikrodissektion	98
Abbildung 33: Nanostring® mRNA-Expressionsprofile für ORAI-, STIM- und TRP-Proteine in HEK 293T Zellen (HEK 293T) und stabil hTRPA1-exprimierenden HEK 293T Zellen (HEK 293T hTRPA1)..	100
Abbildung 34: Nanostring® mRNA-Expressionsprofile für ORAI-, STIM- und TRP-Proteine in A 549 Zellen.	100
Abbildung 35: Nanostring® mRNA-Expressionsprofil für ORAI-, STIM- und TRP-Proteine in murinen Lungengewebe.....	101
Abbildung 36: Nanostring® mRNA-Expressionsprofil von ORAI-, STIM- und TRP-Proteine in primären alveolären Epithelzellen TYP II.	101
Abbildung 37: Nanostring® mRNA-Expressionsprofil für ORAI-, STIM- und TRP-Proteine in primären alveolären Epithelzellen Typ I.	102
Abbildung 38: Nanostring® mRNA-Expressionsprofile für ORAI-, STIM- und TRP-Proteinen in alveolären Epithelzellen Typ II und Typ I.	103
Abbildung 39: Nanostring® mRNA-Expressionsprofile für ORAI-, STIM- und TRP-Proteine in primären Endothelzellen.	103
Abbildung 40: Nanostring® mRNA-Expressionsprofile für ORAI-, STIM- und TRP-Proteinen in primären Lungenfibroblasten.....	104
Abbildung 41: Nanostring® mRNA-Expressionsprofil für ORAI-, STIM- und TRP-Proteine in präkapillären arteriellen glatten Muskelzellen	104
Abbildung 42: Nanostring® mRNA-Expressionsprofil von ORAI-, STIM- und TRP-Kanäle in trachealen Epithelzellen.	105
Abbildung 43: Nanostring® mRNA-Expressionsanalyse von humanen Lungengewebe.....	106
Abbildung 44: Nanostring® mRNA-Expressionsprofile für ORAI-, STIM- und TRP-Proteine in murinen dorsalen Spinalganglien.	106
Abbildung 45: Nanostring® mRNA-Expressionsprofil des TRPA1-Kanals in primären Geweben.	108
Abbildung 46: Nanostring® Einzelmessungen der „Counts“ des murinen TRPA1-Kanals in pulmonalen Geweben.....	109
Abbildung 47: Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation des TRPA1-Aktivators Allylisothiocyanat (AITC) auf HEK 293T-Zellen, die den TRPA1-Kanal stabil exprimieren und Inhibition durch den TRPA1-Inhibitor A96709.....	110
Abbildung 48: Zusammenfassung der berechneten Flächen der Allylisothiocyanat (AITC, 10 μ M)-induzierten Ca^{2+} -Einstromkurven unter Abwesenheit (rote Punkte) oder Anwesenheit des TRPA1-Inhibitors A967079 (100 nM, grüne Punkte)..	111

Abbildung 49: Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation von 3,5°C versus 30°C warmen HBSS Puffer auf HEK 293T-Zellen, die den TRPA1-Kanal stabil exprimieren und Aktivierung durch den TRPA1-Aktivator AITC.	112
Abbildung 50: Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation von 3,5°C und A967079 auf HEK 293T-Zellen, die den TRPA1-Kanal stabil exprimieren und Aktivierung durch den TRPA1-Aktivator AITC.	112
Abbildung 51: Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation von 3,5°C auf HEK 293T-Zellen und HEK 293T-Zellen, die den TRPA1-Kanal stabil exprimieren (HEK 293T hTRPA1) und Aktivierung durch den TRPA1-Aktivator AITC.....	113
Abbildung 52: Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation hyperoxischer und normoxischer HBSS Lösung auf HEK 293T-Zellen, die den TRPA1-Kanal stabil exprimieren.	114
Abbildung 53: Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation hyperoxischer und normoxischer HBSS Lösung auf HEK 293T-Zellen, die den TRPA1-Kanal stabil exprimieren und Inhibition durch A-967079.	114
Abbildung 54: Zusammenfassung der berechneten Flächen der Hyperoxisch-induzierten Ca^{2+} -Einstromkurven unter Abwesenheit (rote Punkte) oder Anwesenheit des TRPA1-Inhibitors A967079 (10nM final, grüne Punkte).	115
Abbildung 55: Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation hypoxischer und normoxischer HBSS Lösung auf HEK 293T-Zellen, die den TRPA1-Kanal stabil exprimieren.	115
Abbildung 56: Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation hypoxischer und HBSS Lösung auf HEK 293T-Zellen, die den TRPA1-Kanal stabil exprimieren und Inhibition durch A-967079.	116
Abbildung 57: Zusammenfassung der berechneten Flächen der Hypoxisch-induzierten Ca^{2+} -Einstromkurven unter Abwesenheit (rote Punkte) oder Anwesenheit des TRPA1-Inhibitors A967079 (10nM final, grüne Punkte).	116
Abbildung 58: Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation von HBSS und AITC Lösung auf HEK 293T-Zellen, die den TRPA1-Kanal stabil exprimieren.	117
Abbildung 59: Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation hyperoxischer und normoxischer HBSS Lösung auf tracheale Epithelzellen.....	118
Abbildung 60: Zusammenfassung der berechneten Flächen der Hyperoxie-induzierten Ca^{2+} -Einstromkurven von Wild-Typ (grüne Punkte) und TRPA1-defizienten (rote Punkte) trachealen Epithelzellen unter Abwesenheit (graue Punkte) oder Anwesenheit (grüne und rote Punkte) von Hyperoxie.....	119
Abbildung 61: Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation hyperoxischer und normoxischer HBSS Lösung auf bronchiale Epithelzellen.....	119
Abbildung 62: Zusammenfassung der berechneten Flächen der Hyperoxie-induzierten Ca^{2+} -Einstromkurven von Wild-Typ (grüne Punkte) und TRPA1-defizienten (rote Punkte) bronchialen Epithelzellen unter Abwesenheit (graue Punkte) oder Anwesenheit (grüne und rote Punkte) von Hyperoxie.....	120
Abbildung 63: Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation hyperoxischer und normoxischer HBSS Lösung in alveoläre TYPII Epithelzellen.	120
Abbildung 64: Zusammenfassung der berechneten Flächen der Hyperoxie-induzierten Ca^{2+} -Einstromkurven von Wild-Typ (grüne Punkte) und TRPA1-defizienten (rote Punkte) in alveolären Epithelzellen unter Abwesenheit (graue Punkte) oder Anwesenheit (grüne und rote Punkte) von Hyperoxie.....	121
Abbildung 65: Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation hypoxischer und normoxischer HBSS Lösung auf tracheale Epithelzellen.....	122
Abbildung 66: Zusammenfassung der berechneten Flächen der Hypoxie-induzierten Ca^{2+} -Einstromkurven von Wild-Typ (grüne Punkte) und TRPA1-defizienten (TRPA1-/-, rote Punkte) trachealen Epithelzellen unter Abwesenheit (graue Punkte) oder Anwesenheit (grüne und rote Punkte) von Hypoxie.....	122

Abbildung 67: Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation hypoxischer und normoxischer HBSS Lösung auf bronchiale Epithelzellen.....	123
Abbildung 68: Zusammenfassung der berechneten Flächen der Hypoxie-induzierten Ca^{2+} -Einstromkurven von Wild-Typ (grüne Punkte) und TRPA1-defizienten (TRPA1-/-, rote Punkte) bronchialen Epithelzellen unter Abwesenheit (graue Punkte) oder Anwesenheit (grüne und rote Punkte) von Hypoxie.	124
Abbildung 69: Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation hypoxischer und normoxischer HBSS Lösung auf alveoläre Epithelzellen.....	124
Abbildung 70: Zusammenfassung der berechneten Flächen der Hypoxie-induzierten Ca^{2+} -Einstromkurven von Wild-Typ (grüne Punkte) und TRPA1-defizienten (TRPA1-/-, rote Punkte) alveolären Epithelzellen TypII unter Abwesenheit (graue Punkte) oder Anwesenheit (grüne und rote Punkte) von Hypoxie.....	125
Abbildung 71: Zunahme des Lungengewichts nach Applikation von Halb-Lost (CEES, 10 μ l 4mM Lösung in DMSO) in die Tracheen von Wild-Typ (grüne Linie) und TRPA1-defizient (TRPA1-/-, rote Linie) isolierte perfundierte Lungen.	126
Abbildung 72: Darstellung der einzelnen Messwerte für die Zunahme des Lungengewichts nach Applikation von Halb-Lost (CEES, 10 μ l 4mM Lösung in DMSO) in die Tracheen von Wild-Typ (grüne Punkte) und TRPA1-defiziente (TRPA1-/-, rote Punkte) isolierte perfundierte Lungen.	127
Abbildung 73: Darstellung der einzelnen Messungen für die Zunahme des Lungengewichts während der kontinuierlichen Perfusion isolierter Lungen aus Wild-Typ (WT) und TRPA1-defizienten Mäusen. Kontrollen der Ischämie-Reperfusionsexperimente von TRPA1-defizienten Lungen (hellgraue Punkte) versus Wild-Typ Lungen (dunkelgraue Punkte).	128
Abbildung 74: Zunahme des Lungengewichts nach während Ischämie-Reperfusion isolierter Lungen aus Wild-Typ (grüne Kurve) und TRPA1-defizienten Mäusen (TRPA1-/-, rote Kurve).	129
Abbildung 75: Repräsentative Lungenmorphologie nach hyperoxischer Behandlung mittels MIRAX Scan.	130
Abbildung 76: Lungengefäße und epitheliales Gewebe normoxischer Wild-Typ und TRPA1-defizienten Lungen.	130
Abbildung 77: Lungengefäße und epitheliales Gewebe hyperoxisch gehaltenen Wild-Typ und TRPA1-defizienten Lungen.	131
Abbildung 78: Septaler Anteil muriner Wild-Typ (graue Balken) und TRPA1-defizienter (rote Balken) Lungen nach normoxischer (Normoxie) oder hyperoxischer (Hyperoxie) Haltung für 21 Tage.	131
Abbildung 79: Septaler Gewebeanteil muriner Wild-Typ (graue Balken) und TRPA1-defizienter (rote Balken) Lungen nach normoxischer (Normoxie) oder hyperoxischer (Hyperoxie) Haltung für 21 Tage.	132
Abbildung 80: Oberflächenvolumen muriner Wild-Typ (graue Balken) und TRPA1-defizienter (rote Balken) Lungen nach normoxischer (Normoxie) oder hyperoxischer (Hyperoxie) Haltung für 21 Tage.	133
Abbildung 81: Lineare und hormetische Effekte von toxischen Substanzen auf Gewebe.....	140

➤ Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mauslinien	40
Tabelle 2: Zelllinien	40
Tabelle 3: Primäre murine Lungenzellen.....	40
Tabelle 4: Zellkulturmedien und Zusätze	40
Tabelle 5: Medium für HEK 293T Zellen	41
Tabelle 6: Medium für HEK 293T hTRPA1 Zellen.....	41

Tabelle 7: Medium für MEF Zellen	41
Tabelle 8: Medien für die Isolation und Kultivierung muriner alveolärer Epithelzellen TypI und TypII ..	41
Tabelle 9: Medium für murine Endothelzellen.....	42
Tabelle 10: Medium für murine präkapillare glatte Muskelzellen.....	42
Tabelle 11: Medium für murine bronchiale und tracheale Epithelzellen	42
Tabelle 12: Medium für murine Lungenfibroblasten	43
Tabelle 13: Chemikalien	43
Tabelle 14: Medizinisches Gas für Zelleexperimente	45
Tabelle 15: Verbrauchsmaterialien	45
Tabelle 16: Laborausstattung.....	46
Tabelle 17: Antikörper und Verdünnungen.....	48
Tabelle 18: Puffer und Lösungen (allgemein).....	49
Tabelle 19: Puffer und Lösungen für das isolierte-perfundierte Lungenmodell.....	50
Tabelle 20: Puffer und Lösungen für Nanostring®.....	50
Tabelle 21: Lösungen für die Immunofluoreszenz	51
Tabelle 22: Lösungen und Puffer für die Calcium-Einstrom Experimente.....	51
Tabelle 23: Enzyme, „Kits“ und Marker (allgemein).....	52
Tabelle 24: „Kits“ für die Isolation muriner und humaner RNA.....	52
Tabelle 25: „Kits“ für die Nanostring® mRNA-Expressionsanalyse	52
Tabelle 26: Nanostring® „Primer Pool“ A (murin)	53
Tabelle 27: Nanostring® „Primer Pool“ B (murin)	54
Tabelle 28: Nanostring® „Primer Pool“ A (human).....	56
Tabelle 29: Nanostring® „Primer Pool“ B (human).....	57
Tabelle 30: Material für die Endothel Selektion	66
Tabelle 31: Qualitätsanforderung der RNA für Nanostring® mRNA-Expressionsanalyse	71
Tabelle 32: Nanostring® Hybridisierungsprogramm	73
Tabelle 33: Herstellung von 30x „Working solution“	74
Tabelle 34: Qualitätsparameter (QC) nSolver® Software	75
Tabelle 35: Zusammensetzung des 10 %-Trenngels.....	77
Tabelle 36: Zusammensetzung des Sammelgels	77
Tabelle 37: Nitrocellulose versus PVDF	78
Tabelle 38: „Coating“ und Fixierung für Immunofluoreszenz- Mikroskopie.....	79
Tabelle 39: Inkubationszeiten unterschiedlicher Zellen mit FURA-2-AM.....	81
Tabelle 40: Versuchsaufbau AITC Stimulation (FURA-2-AM).....	81
Tabelle 41: Versuchsaufbau AITC Stimulation und Inhibition mit A-967079 (FURA-2-AM).....	81
Tabelle 42: Versuchsaufbau Kälteexperiment (FURA-2-AM).....	82
Tabelle 43: Temperaturen Kälteexperiment	82
Tabelle 44: Versuchsaufbau Kontrolle IPL.....	86
Tabelle 45: Versuchsaufbau Ischämie-Reperfusion-induziertes Ödem.....	86
Tabelle 46: Versuchsaufbau der trachealen Halb-Lost Applikation im IPL	87
Tabelle 47: Darstellung und Erläuterung der CAST-Parameter	91
Tabelle 48: Quantifizierung der Messparameter	92
Tabelle 49: Nanostring® Zusammenfassung der ermittelten mRNA-Expressionsprofile von ORAI-, STIM- und TRP-Proteinen in primären murinen pulmonalen Wild-Typ Geweben mit Hilfe der Nanostring®-Technologie..	107

1 Einleitung

1.1 Das respiratorische System und die Funktion ausgewählter Epithelzellen

Das respiratorische System dient der Sauerstoffversorgung des Körpers. Man unterscheidet zwischen den Atemwegen, die dem luftleitenden System entsprechen und dem Alveolärraum, der die Gasaustauschfläche für molekularen Sauerstoff [O₂] und Kohlenstoffdioxid [CO₂] bildet [2]. Das respiratorische System ist durchgehend Feinstoffpartikeln, Chemikalien und der Luftverschmutzung ausgesetzt. Diese Noxen können je nach Expositionsdauer und -stärke den oberen respiratorischen Trakt, zu dem Nase, Pharynx, Larynx zählen, sowie den unteren Trakt mit Trachea, Bronchus, Bronchiolen und Alveolen, unterschiedlich stark verletzen und schädigen [3]. Sämtliche Bereiche des respiratorischen Trakts bestehen aus einer Vielzahl von Epithelzellen unterschiedlicher Funktionen (siehe Abbildung 1) [4]. Im Folgenden werden alveoläre (Pneumozyten TypI/TypII), tracheale und bronchiale Epithelzellen, in ihrer Morphologie und ihrer physiologischen Funktion beschrieben.

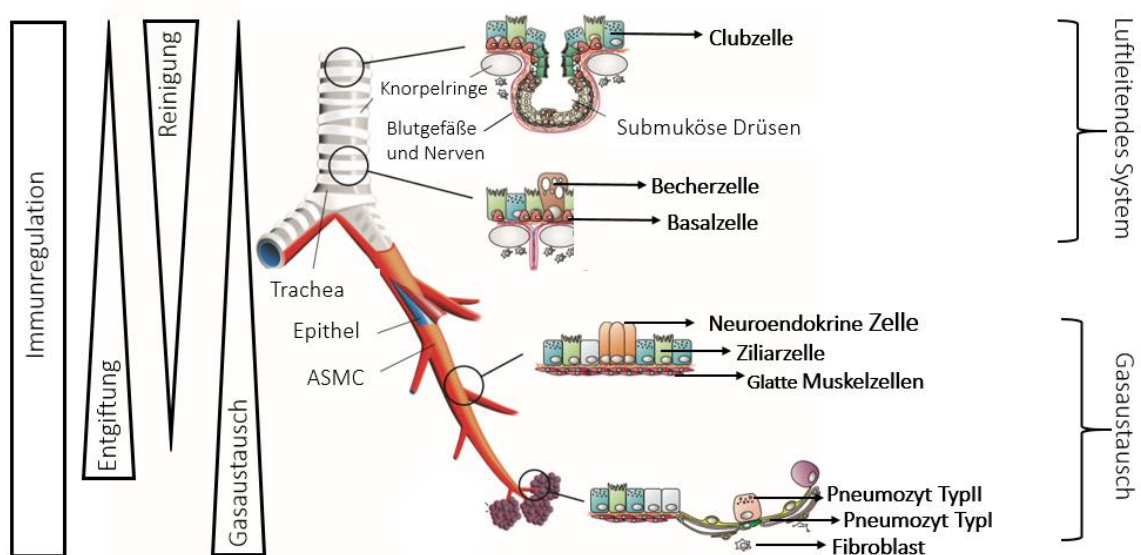


Abbildung 1: Aufbau und Funktion des pulmonalen Systems modifiziert nach Volckaert et al. [4] und Rokicki et al.[5]. Darstellung des luftleitenden Systems mit Trachea und primärem Bronchus. Daneben tiefere Bereiche wie sekundärer Bronchus, Bronchiolen und der Alveolarraum als Gasaustauschfläche mit ausgewählten pulmonalen Zellen wie Club-, Becher-, Basal-, glatte Muskel-, Ziliarzellen, alveoläre Epithelzellen TypI/II (Pneumozyten), Fibroblasten und neuroendokrinen Zellen.

1.1.1 Tracheale Epithelzellen

Epitheliale Zellen der Luftröhre (Trachea) haben im physiologischen System unterschiedliche Funktionen. Zum einen die sogenannte mukoziliäre „Clearance“ und zum anderen eine Beteiligung an Entgiftungs- und Immunregulationsprozessen. Der tracheale Bereich gehört mit Bronchus und Bronchiolen zum luftleitenden System des respiratorischen Trakts [5]. Das tracheale Epithel besteht aus

einer Vielzahl von Zellen. Dazu gehören Ziliar-, Becher-, Drüsen-, Bürsten- und Basalzellen (siehe Abbildung 1). Bei Basalzellen handelt es sich um Stamm- oder Progenitorzellen (Vorläuferzellen), die nach Gewebeerletzung durch potentielle Noxen die Fähigkeit zur Ausdifferenzierung haben (siehe Abbildung 2). Basalzellen machen circa 30 % des pseudostratifizierten mukoziliären Epithels aus und können durch den Nachweis des Transkriptionsfaktors Trp63 (p63) und der beiden Zytokine 5 und 14 identifiziert werden [6]. Nach heutigem Kenntnisstand sind humane Basalzellen in trachealen und auch in Epithelzellen des primären Bronchus nachweisbar [4]. Laut Literatur ist diese Art von Progenitorzellen bei Nagetieren im Gegensatz zum Menschen nur im trachealen Bereich vorzufinden, eingestreut zwischen Ziliar-, sekretorischen und neuroendokrinen Zellen [4-5]. Allgemein zeigen tracheale Zellen eine sehr langsame Zellerneuerung, kommt es jedoch zur Gewebeerletzung, kann dies zur raschen Proliferation der Basalzellen und damit zur schnellen Reparatur des Schadens führen.

1.1.2 Bronchiale Epithelzellen

Der bronchiale Ast des respiratorischen Systems kann in den luftleitenden (primärer und sekundärer Bronchus) und der am Gasaustausch beteiligte untere Bereich (Bronchiolen) differenziert werden. Wie auch schon im trachealen Epithel werden in den Bronchien unterschiedliche epitheliale Zellen exprimiert, die in Abbildung 1 dargestellt sind. Dazu zählen Ziliar-, Bürsten-, Drüsen- und Clubzellen, bei denen es sich ebenfalls um stammzellähnliche Progenitorzellen handelt [4, 6]. Clubzellen besitzen eine kubische Morphologie, sezernieren weder Mukus noch besitzen sie Zilien. Diese Vorgängerzellen sind nur sehr selten im trachealen Bereich vorzufinden. Als spezifisches Marker Protein gilt das Clubzellen („club cell“) Protein 10 (CC10), das auch sekretorisches Protein 16 (CC16) oder Sekretoglobin (SCGB) genannt wird. CC10 soll vor viralen Infektionen und auch vor oxidativem Stress schützen [5]. Bis dato ist die Rolle der Clubzellen noch nicht vollständig geklärt. Allerdings dienen sie als Vorläuferzellen für Ziliar- und Bürstenzellen (siehe Abbildung 2) und produzieren wichtige Komponenten extrazellulärer Substanzen, z.B. Lysozym. Außerdem sollen Clubzellen eine wichtige Rolle in der Biotransformation inhalierter Xenobiotika zusammen mit den Zytochrom P450 (CYP450) Enzymen spielen. Man nimmt an, dass Clubzellen während epithelialer Schäden an Reparaturmechanismen beteiligt sind [4, 7-8], aber auch zu der Entstehung verschiedener pulmonaler Erkrankungen, wie Lungenfibrose, Emphysem oder pulmonaler Hypertonie [9] beitragen können. Eine mögliche Schlüsselrolle bei der Wiederherstellung zellulärer Homöostase wie auch ihre Beteiligung am akuten und chronischen Entzündungsgeschehen wird ebenfalls diskutiert [5].

1.1.3 Alveoläre Epithelzellen (Pneumozyten) TypI und TypII

Der Alveolarraum besteht aus einer Vielzahl von unterschiedlichen Zellen. Neben alveolären Epithelzellen (Pneumozyten) TypI (ATI) und TypII (ATII) findet man auch Zellen des Immunsystems [19]

(Makrophagen). Pneumozyten Typ I (ATI), die 90 % der alveolären Epithelzellen ausmachen [4], dienen dem raschen Sauerstoffaustausch, sowie der Auskleidung und Abdichtung des alveolären Raumes. Sie können durch Marker Proteine wie Podoplanin, Aquaporin 5 und Caveolin [10] identifiziert werden. ATI-Zellen sind sehr lange und große Zellen (50-100 μM lang, 2000-3000 μM^3) im Vergleich zu Pneumozyten Typ II (10 μM lang, 450-900 μM^3), die kubisch sind und nur zu etwa 5 % im alveolären Raum vertreten sind [11]. Alveoläre Epithelzellen Typ II (ATII) produzieren Surfactant Protein C. Als spezifischer ATII Marker [10] setzt Surfactant Protein C die Oberflächenspannung im alveolären Raum stark herab und ermöglicht damit einen erleichterten Gasaustausch von Sauerstoff (O_2) und Kohlendioxid (CO_2) zwischen Epithel und Endothel [2]. Pneumozyten Typ II sind ebenfalls stammzellähnlich, da sich ATII-Zellen bei Verletzung des alveolären Epithels zu ATI-Zellen ausdifferenzieren können und damit zu einer raschen Reparatur des epithelialen Gewebes beitragen [3]. Die genauen Mechanismen dieser Ausdifferenzierung sind bis dato noch unklar [12]. Einige Publikationen zeigen, dass sich Pneumozyten Typ II (ATII) an der „epithelialen-mesenchymalen Transition EMT“ beteiligt sind [13-15]. Dabei handelt es sich um die Einwanderung epithelialer Zellen ins pulmonale Gewebe und die Umwandlung zu mesenchymalen Zellen. Dieser Übergang in mesenchymales Gewebe kann zu pathologischen Veränderungen der Lunge führen, z.B. Lungenfibrose. In Abbildung 2 [4] werden die Epithelzellen des respiratorischen Trakts mit den zugehörigen Marker-Proteinen und Differenzierungsschritten dargestellt.

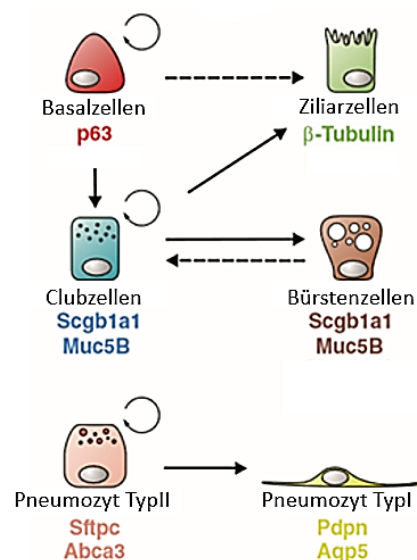


Abbildung 2: Differenzierungsschritte pulmonaler Epithelzellen und zellspezifische Marker Proteine modifiziert nach Volckaert et al. [4]. Darstellung der möglichen Ausdifferenzierungsschritte von Basal-, Ziliar, Club und Bürstenzellen sowie Pneumozyten Typ I/II mit einer Auswahl dazu gehörigen zellspezifischen Marker-Proteinen (Abkürzungen: p63 = Transkriptionsfaktor Trp63, Scgb1a1 = Sekretoglobin 1a1, Muc5B = Mucin 5B, Sftpc = Surfactant Protein C, Abca3 = „ATP-binding cassette protein A3“, Pdpn = Podoplanin, Aqp5 = Aquaporin 5).

1.2 Schädigungen der Lunge durch einen Überschuss an Sauerstoff (Hyperoxie)

Sauerstoff [O₂] ist für den Körper lebensnotwendig. Ein Überschuss an Sauerstoff (Hyperoxie) während der Beatmung eines Patienten kann jedoch bleibende Lungenschäden auslösen. Bei der bronchopulmonalen Dysplasie (BPD) handelt es sich um chronisch pathologische Veränderungen der Lungenstruktur bei Frühgeborenen. Neugeborene mit einem Gestationsalter von weniger als 28 Wochen entwickeln eine BPD als Folge der künstlichen Beatmung mit 80-100 % Sauerstoff und einer unzureichenden Sauerstoffsättigung auf Grund der unvollständigen Lungenentwicklung [16]. Auch bei Erwachsenen kann es in Folge notfallmedizinischen Maßnahmen durch eine intensive Ventilation zu akuten und chronischen Schädigungen der Lungenstruktur bis hin zur Hyperplasie von alveolären Epithelzellen kommen [17].

1.2.1 Pathogenese Hyperoxie-assoziiierter Lungenschädigung

Die Ursachen Hyperoxie-induzierter Lungenerkrankungen ist bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht vollständig geklärt, allerdings soll die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) eine große Bedeutung in der Pathophysiologie dieser Erkrankungen spielen [18]. Die nicht-invasive **CPAP** („Continuous positive airway pressure“) Beatmungsmethode mit kontinuierlichem, positivem Luftwegedruck erzeugt einen hyperoxischen Zustand im Organismus. Der erhöhte Sauerstoffgehalt im physiologischen System kann damit zur vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch NADPH-Oxidasen (NOX) in der Plasmamembran oder intrazellulär in Mitochondrien führen, so dass ein Ungleichgewicht zwischen freien Radikalen und Antioxidantien entsteht [19]. NADPH-Oxidasen (Nicotinamidadeninucleotid-Phosphat-Oxidasen) einschließlich ihrer Isoformen spielen während der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) eine Hauptrolle im physiologischen System. Die Bildung von Superoxiden wird mit Hilfe von NADPH-Oxidasen katalysiert. Innerhalb der Zelle werden über die Membran Elektronen übertragen und an molekularen Sauerstoff gekoppelt, so dass sehr reaktive Superoxidanionen entstehen. Strukturell handelt es sich bei NADPH-Oxidasen um Multienzym-Komplexe, bestehend aus zwei integralen Membranproteinen, dem Glycoprotein gp91^{phox} und dem Adapterprotein p22^{phox}. Diese beiden Membranproteine bilden das heterodimere Flavocytochrom b558, welches dem aktiven Zentrum des Enzyms entspricht. Im inaktiven Zustand befinden sich die regulatorischen Untereinheiten der NADPH-Oxidase im Zytosol und bei Aktivierung erfolgt eine Phosphorylierung dieser zytosolischen Komponenten [19-20].

In Abbildung 3 wird die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies, verursacht durch den erhöhten Sauerstoff Partialdruck im physiologischen System, gezeigt. Kommt es zur Sättigung antioxidativer Mechanismen, können freie Radikale nicht mehr ausreichend eliminiert werden, was zu einer starken Zunahme dieser schädlichen, sehr reaktiven Moleküle und zu einer Störung der intra- und

extrazellulären Homöostase führt. Längerfristig verursacht dieses Ungleichgewicht irreversible pulmonale Zell- und Gewebeschädigungen [21]. In tierexperimentellen Studien zeigte die Applikation von reinem Sauerstoff [O₂] über drei Tage eine Schädigung der Epithelbarriere mit Verletzung alveolärer Epithelzellen TypI (ATI), Hyperproliferation von Pneumozyten TypII (ATII), Ödembildung und pulmonales vaskuläres „remodeling“ [22-24]. Zusätzlich führt oxidativer Stress zu Änderungen der Zellmorphologie durch Veränderungen des zellulären Mikrofilaments und der Aktinpolymerisation. Inwiefern diese Prozesse bei der Hyperoxie-induzierten Lungenschädigung eine Rolle spielen, wurde bis dato noch nicht vollständig aufgeklärt [22]. Neben reaktiver Sauerstoffspezies gibt es aber zahlreiche weitere potentielle pathophysiologische Mechanismen, die zu einer derartigen Gewebeschädigung führen könnten. Hier werden insbesondere pro-inflammatorische Zytokine [25] und MAP-Kinase Signaltransduktionswege genannt [26].

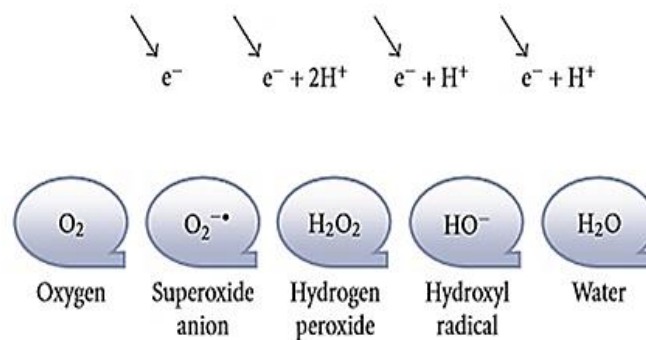


Abbildung 3: Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies nach Mach et al. [21]. Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wie Superoxid-Radikal-Anion(O₂^{-•}), Wasserstoffperoxid (H₂O₂), Hydroxyl-Radikal (OH⁻) aus molekularem Sauerstoff [O₂]. Als Endprodukt entsteht Wasser (H₂O).

1.3 Ischämie-Reperfusion-induzierter Lungenschaden

Ähnlich wie bei einer Überversorgung mit Sauerstoff kann auch eine vorübergehende Unterversorgung durch eine Blockade der Durchblutung mit sauerstoffreichen Erythrozyten (Ischämie und anschließende Reperfusion) Schäden im respiratorischen System hervorrufen. Dieser Ischämie-Reperfusion-induzierter Lungenschaden ist eine häufige Komplikation in der Frühphase der Lungentransplantation, der häufig in ein akutes Lungenversagen („Acute Lung Injury“, (ALI)) mit erhöhter Mortalität und Morbidität übergeht [27]. Der Gewebeschaden wird durch eine vorübergehende ischämische Phase während des Transports vom Donor und einer Wiederherstellung der Durchblutung der Lunge im Empfänger verursacht [28]. Neben einer Lungentransplantation können auch Lungenembolien oder mögliche Herz-Kreislaufversagen zu einer derartigen pulmonalen Schädigung führen.

1.3.1 Entstehung des kardiogenen und nicht-kardiogenen Lungenödems

Bei der Entstehung des Lungenödems unterscheidet man zwischen dem kardialen und dem nicht-kardialen pulmonalen Ödem (siehe Abbildung 4) [29]. Das kardial induzierte Ödem entsteht durch einen zu hohen hydrostatischen Druck verursacht durch arterielle Hypertonie, so dass es zu einer vermehrten Ansammlung von interstitieller Flüssigkeit im Alveolarraum kommen kann. Auf Grund einer intakten Endothel- und Epithelschicht ist die Flüssigkeit innerhalb des alveolaren Raumes sehr arm an Proteinen. Beim nicht-kardialen Ödem hingegen kommt es zu einer Schädigung der Endothel-Epithel Barriere, was dazu führt, dass sich neben Elektrolyten wie Calcium- [Ca^{2+}], Magnesium- [Mg^{2+}] und Natriumionen [Na^+] auch Proteine (Albumin, Immunzellen) aus den versorgenden Blutgefäßen ansammeln können [29]. Dieses Ödem entsteht häufig durch Gewebeschädigung, verursacht durch potentielle Noxen, wie Hypoxie/ Hyperoxie, Chemikalien, Giftstoffe oder auch durch starke Traumata.

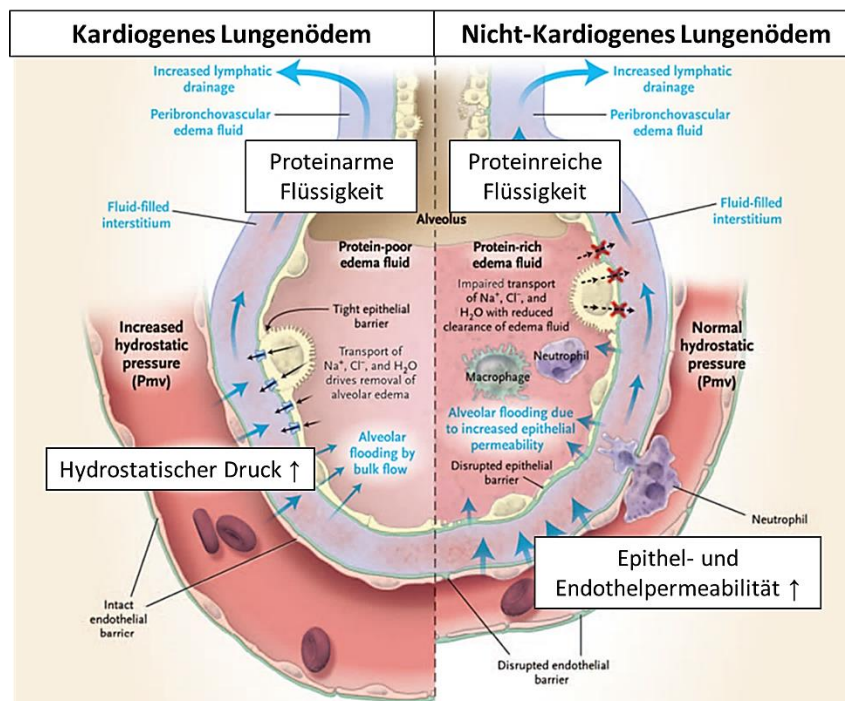


Abbildung 4: Kardiogenes und nicht-kardiogenes Lungenödem modifiziert nach Ware et al. [29]. Darstellung des kardialen pulmonalen Ödems (links) und des nicht-kardialen pulmonalen Lungenödems (rechts). Während der Ausbildung eines kardiogenen Lungenödems wird durch einen stark erhöhten hydrostatischen Druck proteinarme Flüssigkeit in den Alveolarraum gedrückt. Das nicht-kardiogene Ödem ist charakterisiert durch proteinreiche Flüssigkeit, die auf Grund der zerstörten Epithel-Endothelbarriere auftritt.

1.3.2 Pathogenese des Ischämie-Reperfusion-induzierten Lungenschadens

Im Allgemeinen wird die Reperfusion ischämischer Gewebe mit einer mikrovaskulären Dysfunktion assoziiert [30]. Diese Dysfunktion kann sich in einer gestörten Endothel-abhängigen Vasodilatation der arteriellen Gefäße, einer damit verbundenen erhöhten Infiltration von Gefäßflüssigkeit, der

Einwanderung von Immunzellen und in einer vermehrten Protein Extravasation manifestieren [31]. Aktivierte Endothelzellen zeichnen sich durch vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und einer verminderten Bildung des vasodilatatorischen Stickstoffmonoxids (NO) aus. Das Ungleichgewicht zwischen ROS und NO mündet in einer verstärkten Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren wie dem Plättchen aktivierenden Faktor (PAF) und dem Tumornekrosefaktor- α (TNF- α). Außerdem wird die Biosynthese spezifischer Moleküle, die die Leukozyten-Endothelzell Adhäsion vermitteln, verstärkt [30]. Der Ischämie-Reperfusion-induzierte Lungenschaden ist charakterisiert durch eine nicht-spezifische Schädigung des alveolären Raums, die Bildung eines pulmonalen Ödems sowie einer Hypoxämie (Sauerstoffarmut) des physiologischen Systems bis zu 72 Stunden nach erfolgter Lungentransplantation. Er gilt als eine der Hauptursachen für den Misserfolg einer Lungentransplantation und kann im schlimmsten Fall zur Abstoßung der transplantierten Lunge und damit zum Tod des Patienten führen. Die genauen Ursachen und pathologischen Mechanismen sind bis heute noch nicht geklärt. Durch Ereignisse vor der Transplantation, wie die mechanische Ventilation, Traumata sowie die hypothermische Lagerung des Transplantationsorgans unter ischämischen Bedingungen, kann es zu einer vermehrten Freisetzung inflammatorischer Mediatoren und damit zu einer Verstärkung des Ischämie-Reperfusion-induzierten Lungenschadens kommen [27]. Bei dieser Art von Lungenschaden handelt es sich um eine komplexe pathologische Situation, in der mehrere molekulare und zelluläre Mechanismen beteiligt sein können, diesbezüglich wurden eine Vielzahl potentieller Behandlungsmöglichkeiten untersucht. Dazu gehört der Schutz der mitochondrialen Aktivität, der Einsatz von Xanthin- und NADPH-Oxidase-Inhibitoren, Caspase Hemmstoffe sowie eine therapeutische Präkonditionierung des Transplantationsorgans. Einzelbehandlungen erscheinen oft nicht so effektiv wie Kombinationsbehandlungen, die parallel unterschiedliche Ursachen des Reperfusionsschaden einschließen. Zukunftsweisend müssen verschiedene Therapieoptionen diskutiert werden, um einen allgemeinen Konsens für die Behandlung des Ischämie-Reperfusion-induzierten Lungenschadens zu finden. Tierexperimentelle und klinische Studien sind notwendig, um den Nutzen der Therapieoptionen für den Patienten bewerten und Aussagen hinsichtlich Morbidität und Mortalität machen zu können [31].

1.4 TRP-Kanäle

1.4.1 Einteilung und Struktur der TRP-Kanäle

„Transient Receptor Potential“ Kanäle oder TRP-Kanäle wurden bereits 1989 von Montell und Rubin [32] im Facettenauge der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt. In Säugetieren konnte dann 1995 der erste TRP-Kanal, der heute TRPC1 heißt, kloniert werden [33]. Heute sind 28 TRP-Proteine bekannt, die entsprechend ihrer Sequenz-Homologie in sieben Subfamilien unterteilt werden [34]: TRPA, TRPC, TRPM, TRPML, TRPP und TRPV (siehe Abbildung 5) [35]. Eine TRP-Untereinheit besitzt sechs

Transmembrandomänen mit einer porenbildenden Region zwischen der fünften (S5) und sechsten Domäne (S6), Carboxy (C)- sowie Amino (N) -Termini befinden sich im intrazellulären Bereich [36]. Charakteristische Strukturmerkmale von TRP-Kanälen sind sog. „Ankyrin repeats“ im N-Terminus sowie das hochkonservierte TRP-Box Motiv (siehe auch Abbildung 8). Die Bildung von Homo- und Heterotetrameren ist essentiell, um physiologische Funktionalität dieser Ionenkanäle zu erhalten [37-38].

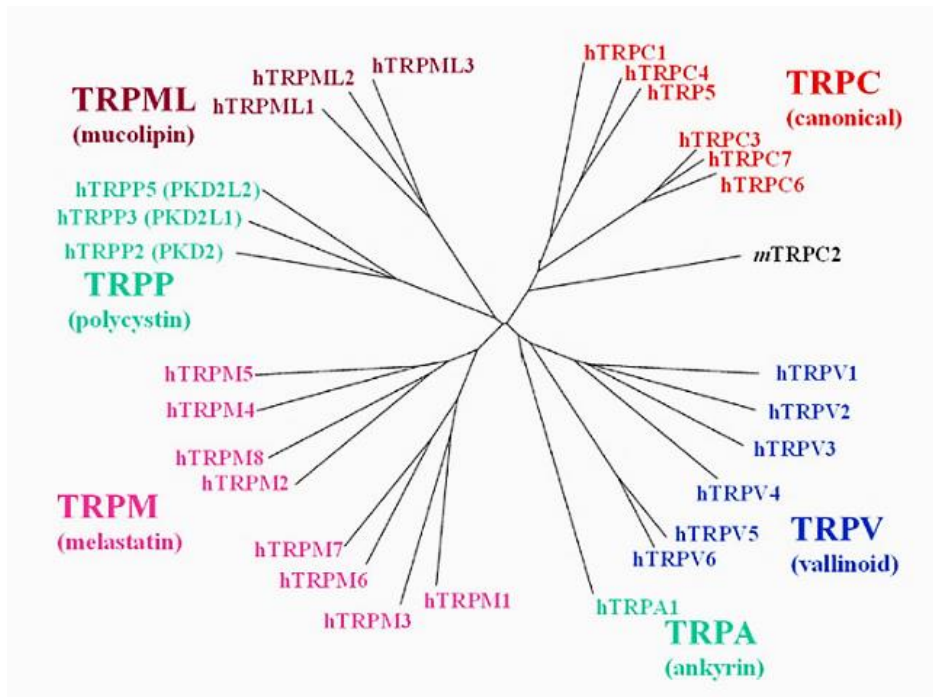


Abbildung 5: Phylogenetischer Baum der humanen TRP-Familie [36]. Darstellung der 6 TRP Proteine TRPML, TRPC, TRPV, TRPA, TRPP und TRPM. Insgesamt verfügt die TRP-Kanal Familie über 28 Mitglieder.

1.4.2 Aktivierung der TRP-Kanäle

„Transient Receptor Potential“-Kanäle (TRP-Kanäle) werden in vielen unterschiedlichen Geweben exprimiert und durch zahlreiche Stimuli aktiviert. Sie gelten als vielseitige zelluläre Effektor Proteine und Chemosensoren, die die Calcium Homöostase im intrazellulären Bereich beeinflussen. Die Aktivierung dieser Kanalproteine kann durch folgende Mechanismen erfolgen [39].

- *Rezeptor Aktivierung* durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren und Rezeptorkinasen, die über aktive PhospholipasenC (PLCs) die Öffnungswahrscheinlichkeit der TRP-Kanäle auf unterschiedliche Weise modulieren und beeinflussen können.
- *Intrazelluläre Aktivierung* durch klassifizierte Liganden wie exogene synthetische oder natürliche Moleküle (Capsaicin, Allylisothiocyanat), endogene Komponenten (z.B. Diacylglycerol, Eicosanoide) und purinerge Nukleotide wie Adenosin.

- *Direkte Aktivierung* durch mechanische Stimuli, Temperaturänderung, Konformationsänderungen und Kanalphosphorylierungen

1.4.3 Wichtige Vertreter der TRP-Familie: TRPC, TRPV und TRPM

TRPC steht für „**T**ransient **R**eceptor **P**otential **C**ationical or **C**lassical“, da sie die ersten klonierten TRP-Kanäle der Säuger waren. Es handelt sich um unselektive Kationenkanäle, die Na^+ und Ca^{2+} Ionen leiten und durch einen Rezeptor-aktivierten Phospholipasen C (PLC)-vermittelten Mechanismus geöffnet werden [40]. Man spricht hier auch vom **Rezeptor-operierten Ca^{2+} Einstrom (ROCE)**. Über die Kopplung von aktivierten Rezeptoren an G-Proteine der G_q Familie kommt es zu einer $\text{PLC}_{\beta 1}$ -vermittelten Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3). Während DAG zu einer direkten Öffnung Ca^{2+} permeabler TRPC Kanäle führt, kann IP_3 über den IP_3 -Rezeptor Ca^{2+} aus den internen Speichern im endoplasmatischen Retikulum (ER) freisetzen, was wiederum zum **Speicher-operierten Ca^{2+} Einstrom (SOCE)** führt. Die Expression von TRPC Kanälen im menschlichen Körper variiert stark. TRPC1 ist ubiquitär vorzufinden, während andere TRPC-Kanäle hauptsächlich in zentral nervösen Geweben exprimiert werden. Als wichtiger Regulator des glatten Muskeltonus [41-43] spielt TRPC6 zum einen eine entscheidende Rolle in der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion (Euler-Liljestrand-Mechanismus) [44]. Zum anderen wirkt TRPC6 in den Endothelzellen bei der Ausbildung eines im Ischämie-Reperfusion-induzierten Ödems mit [45].

TRPV oder „**T**ransient **R**eceptor **P**otential **V**anilloid“ Kanäle gehören zu einer der größten TRP-Familien [40]. TRPV1, als erster klonierter Vertreter dieser Familie, gilt als Schmerzrezeptor, der als Capsaicin und Hitze empfindlicher Rezeptor identifiziert wurde. Capsaicin ist eine natürlich vorkommende, in Chilischoten enthaltene Substanz. Da sie ähnliche Schmerzen wie nach einer Verbrennung auslöst, kann der TRPV1-Kanal auch als polymodaler Schmerzrezeptor bezeichnet werden. Entzündungsreaktionen und neuronale Zellschädigungen können eine Änderung der TRPV1-Kanal Expression zur Folge haben und damit zu einer Verstärkung der Sensitivität gegenüber schädlichen Stimuli führen. In tierexperimentellen TRPV1-defizienten sog., „Loss of Function“ Modellen konnte eine Abschwächung des Hitze-induzierten Schmerzes und eine Reduktion der mechanischen Nozizeption demonstriert werden. Deshalb könnte die Entwicklung TRPV1-Kanal spezifischer Inhibitoren und deren Einsatz in der Schmerztherapie vielversprechend sein [46].

Die Familie der „**T**ransient **R**eceptor **P**otential **M**elastatin“-Kanäle (**TRPM**-Kanäle) besteht aus insgesamt acht Mitgliedern, von denen die Rezeptoren TRPM2, TRPM3 und TRPM8 ebenfalls mit der Entstehung von Schmerzen in Verbindung gebracht werden [34]. Der Aufbau entspricht der allgemeinen TRP-Kanal Struktur. Allerdings fehlt eine „Ankyrin Repeat“ Domäne im N-Terminus des Kanals. TRPM8 wird in

Neuronen des Trigemini-Nervs und in dorsalen Spinalganglien exprimiert und spielt dort wahrscheinlich bei der Entstehung des neuropathischen Schmerzes eine Rolle. Eine Temperatur von 10 bis 23 °C führt zu Aktivierung des TRPM8-Kanals. Ca^{2+} strömt ein und aktiviert damit sensorische Neuronen [47]. Die Funktion des TRPM-Kanals als Kältesensor wurde bereits in zahlreichen *in-vivo* TRPM8-defizienten Mausmodellen (TRPM8^{-/-}) untersucht. TRPM8^{-/-}-Mäuse zeigten nach Kältereiz oder Applikation chemischer Stimuli keine physiologische Reaktion. Deshalb könnte eine effektive TRPM8 Inhibition durch spezifische TRPM8-Kanal Hemmstoffe zu einer Reduktion des neuropathischen Kälteschmerzes führen [47].

Die physiologische Rolle von TRP-Kanälen im respiratorischen System ist noch nicht vollständig aufgeklärt. TRP-Kanäle sind wahrscheinlich an pulmonalen Abwehrmechanismen beteiligt, spielen aber auch eine wichtige Rolle in der Pathologie und Symptomatik respiratorischer Erkrankungen, wie Asthma [48], „chronic obstructive lung diseases COPD“ , idiopathische Lungenfibrose [49], dem Ischämie-Reperfusion induzierten Lungenschaden [45] und der pulmonalen Hypertonie [44]. Als Chemosensoren [50] könnten TRP-Kanäle als „Wächter“ vor schädlichen Stoffen dienen. Womöglich haben sie aber auch eine Schlüsselrolle für Toxin-induzierte Lungenschädigungen [51-54]. Spezifische Modulatoren und Inhibitoren der TRP Ionenkanal Familie könnten damit neue therapeutische Optionen schwerwiegender pulmonaler Erkrankungen sein.

1.4.4 Speicher-operierter Calcium-Einstrom durch ORAI-Kanäle

Zytosolisches Calcium, welches durch den Rezeptor-operierten (ROCE) oder Speicher-operierten Ca^{2+} -Einstrom (SOCE) erhöht wird, spielt eine essentielle Rolle in physiologischen Prozessen von Lungenzellen. Eine gestörte Calcium Homöostase im pulmonalen System kann die Barrierefunktion von Endothelzellen und Epithelzellen schädigen und damit zum Lungenödem führen [55-57].

Neben den bereits erwähnten TRP-Kanälen sind die ORAI 1-3-Kanäle [58] sog. „ Ca^{2+} -release-activated channels (CRAC)“, die durch eine Entleerung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher, z.B. im endoplasmatischen Retikulum (ER), aktiviert werden und an der langsamen Wiederauffüllung der geleerten Ca^{2+} -Speicher beteiligt sind. Eine Aktivierung des SOCEs wird durch im ER lokalisierte Ca^{2+} -Sensoren - die STIM1/STIM2 Proteine - ausgelöst, die nach Speicherentleerung Proteinkomplexe in der ER-Membran ausbilden und direkt mit ORAI-Kanälen in der Plasmamembran interagieren können (siehe Abbildung 6) [59].

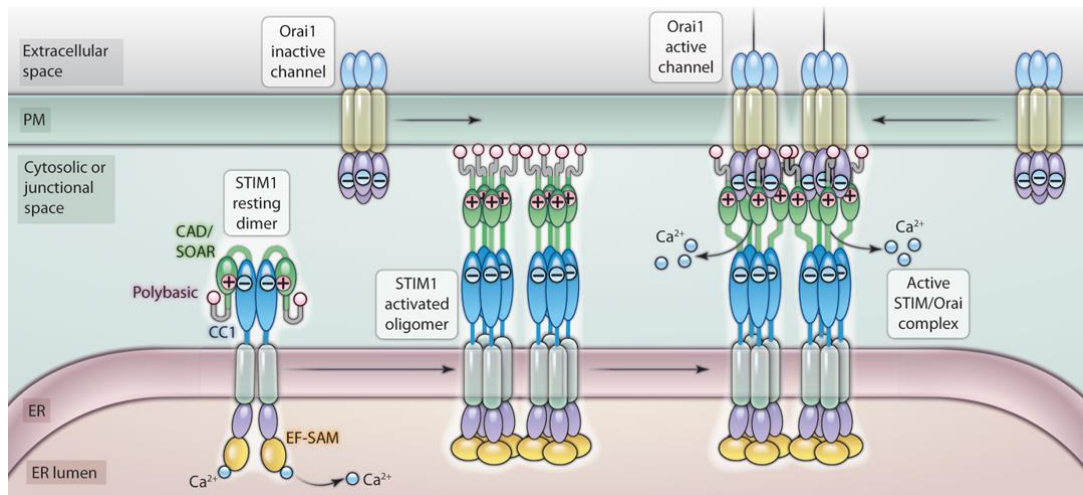


Abbildung 6: Darstellung des Speicher-operierten Ca^{2+} Einstroms (SOCE) [59]. Oligomerisierung von STIM1 Dimeren und Bildung des aktiven STIM1/ORAI-Komplexes. Im ruhenden Zustand wird das STIM1-Dimer durch Wechselwirkungen der „coiled-coil“ Domäne (CC1) aufrechterhalten. Durch Depletion interner Ca^{2+} -Speicher, erfolgt die Oligomerisierung von STIM1-Dimeren zum aktiven STIM1-Oligomer. Mit Bindung an das aktive ORAI1-Protein erfolgt die Bildung des aktivierten STIM1/ORAI1-Protein Komplexes, wodurch ein Speicher-operierte Ca^{2+} Einstrom (SOCE) möglich ist.

1.5 Der TRPA1-Kanal

Der humane TRPA1-Kanal oder „Transient Receptor Potential Ankyrin 1“ ist das einzige Mitglied der TRPA-Ionenkanal Familie und fungiert als nicht-selektiver Kationenkanal. Neben seiner möglichen Beteiligung an sensorischen Regulationsmechanismen [60] wird ein Einfluss dieses Kanals auf die zelluläre Homöostase [34] vermutet.

1.5.1 Das TRPA1-Gen

Bereits 1999 wurde das TRPA1-Gen von Jaquemar et al. [61] in humanen Lungenfibroblasten kloniert. Das TRPA1-Gen, bestehend aus 27 Exons in der chromosomalen Region 8q13 [62], konnte neben Vertebraten auch in vielen Invertebraten (z.B. in der Fruchtfliege) nachgewiesen werden. Der modifizierte phylogenetische Baum der TRPA-Gene unterschiedlicher Organismen in Abbildung 7 [62] zeigt eine deutliche Differenzierung in elektrophil-sensitive und nicht-sensitive (basale) TRPA-Kanäle [63]. Die beiden monophyletischen Gruppen (Nachfahren einer Stammart) trennten sich vor über 500 Millionen Jahren voneinander. Dass die TRPA1-Gensequenz zwischen Primaten und Nagetieren nur zu 79 % konserviert ist [36], sollte beim Screening neuer TRPA1-spezifischer Substanzen, aber auch bei funktionellen Untersuchungen des TRPA1-Kanals zur möglichen Behandlung humaner Krankheiten stets bedacht werden.

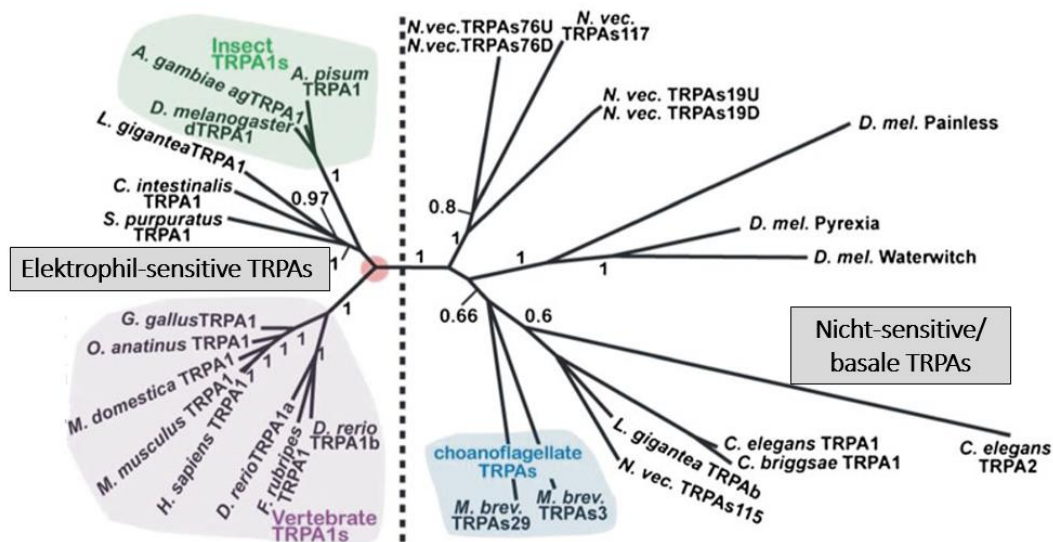


Abbildung 7: Phylogenetischer Baum des TRPA-Genes unterschiedlicher Organismen modifiziert nach Nilius et al. [62]. Darstellung der monophyletischen Gruppe der elektrophil-sensitiven TRPA-Kanäle (*rechte Seite*) sowie der nicht-sensitiven oder basalen TRPA-Kanäle (*linke Seite*). Abkürzungen: A für Anopheles (Mücke), C für Caenorhabditis (Fadenwurm), D für Danio (Zebrafisch), F für Figulus (Käfer), G für Gallus (Haushuhn), H für Homo (Mensch), L für Lottia (Schnecke), M. für Musculus (Maus), O für Ornithorhynchus (Schnabeltier), S für Strongylocentrotus (Seeigel).

1.5.2 Die Proteinstruktur des TRPA1-Kanals

In Abbildung 8 wird der Aufbau einer TRPA1-Untereinheit [62] als lineares Diagramm dargestellt. Der voll funktionsfähige tetramere TRPA1-Kanal wird von vier homologen TRPA1-Kanal Monomeren gebildet, die im Menschen aus 1119 Aminosäuren (AS) und in der Maus aus 1115 AS bestehen. Im N-Terminus befindet sich die für TRPA1 spezifische hohe Zahl an „Ankyrin repeat“ Domänen (grau), eine sich wiederholende Abfolge von 33 Aminosäuren mit einem hohen Anteil an Cysteinen [64]. Anschließend folgen sechs Transmembran-Domänen, die aus α -Helices bestehen. Zwischen den Transmembran-Domänen fünf und sechs befindet sich die Porenregion des Kanals. Der C-Terminus des TRPA1-Kanals zeichnet sich durch ein stark konserviertes „TRP box-like“ Motiv (lila) aus, welches für die meisten Mitglieder der TRP-Familie charakteristisch ist [39]. Die orange markierten „coiled-coil“ Domänen sollen eine wichtige Rolle während der Bildung von Tetrameren spielen. Beim EF-Hand Motiv (weiß) handelt es sich um eine Abfolge geladener Aminosäuren, die nach Bindung von Ca^{2+} zu einer Konformationsänderung innerhalb des TRPA1-Kanals führen. Die „Pleckstrin homology (PH)“ ähnliche Domäne (blau) steht für einen Bereich von 120 Aminosäuren, der an interzellulären Signalwegen beteiligt sowie ein Bestandteil des Zytoskelets ist. Calmodulin (CaM), das ein CaM-Domäne (grün) des TRPA1-Proteins bindet, ist ein Ca^{2+} -bindendes Signalprotein, welches Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Kinasen aktiviert und über intrazelluläre Signalkaskaden zur Änderung von Zellfunktionen führt [65-67]. Das Protein könnte nach Bindung von Ca^{2+} die TRPA1-Aktivität durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus, ähnlich wie für TRPC-Kanäle beschrieben, hemmen [68]. Außerdem gibt

es noch die N-Glykosylierungsstellen in der extrazellulären Schleife zwischen der Transmembran-Domäne [62].

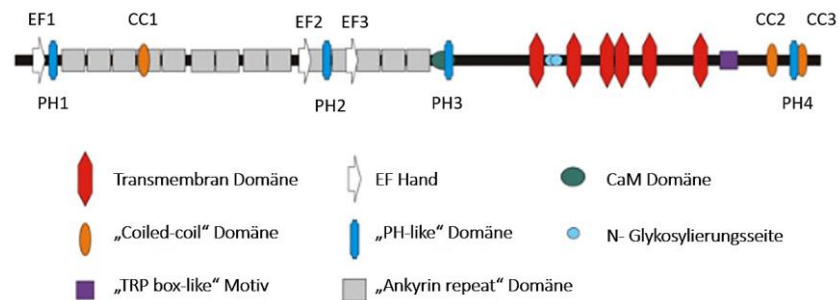


Abbildung 8: Darstellung der Proteinstruktur eines TRPA1-Kanal Monomers (modifiziert nach [62]). Gezeigt wird, die für TRPA1 charakteristischen „Ankyrin Repeats“ (grau), die Transmembran-Domäne (rot), das sog. „TRP box-like“ Motiv (lila), sowie die „Coiled-coil“ Domäne (orange), EF Hand (weiß), „PH-like“ (grün) und die Ca²⁺/Calmodulin bindende Domäne (grün). Die N-Glykosylierungsstellen sind als hellblaue Punkte markiert.

Im Jahr 2015 gelang es der Arbeitsgruppe Julius die Proteinstruktur des TRPA1-Kanals [60] mittels Kryo-Elektronen-Mikroskopie mit einer Auflösung von 4Å aufzuklären. Sowohl die dreidimensionale Rekonstruktion der Proteinstruktur einer humanen TRPA1-Untereinheit als auch die vier monomeren TRPA1-Untereinheiten im funktionellen Ionenkanal konnten dargestellt werden (siehe Abbildung 9).

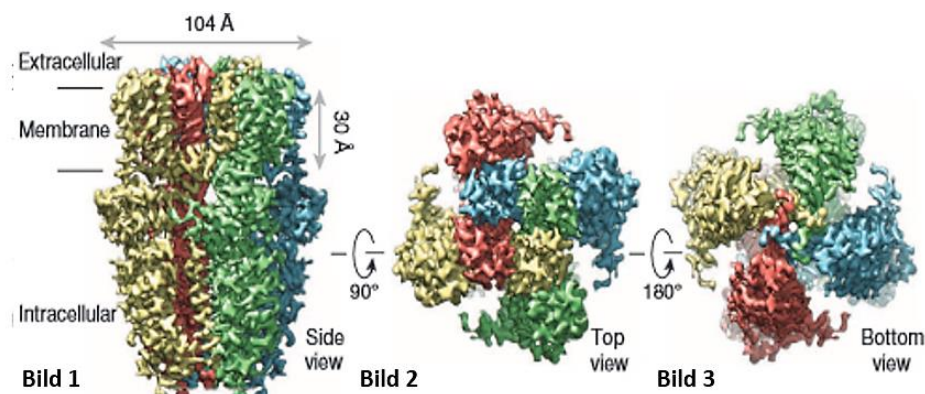


Abbildung 9: Dreidimensionale Struktur des funktionellen humanen TRPA1-Kanals mittels Kryo-Elektronen-Mikroskopie [60]. Extra- und intrazellulärer Bereich des membranständigen TRPA1-Kanals mit Seitenansicht der 3D-Struktur (Bild 1), Aufsicht (Bild 2) und Blick von unten auf den tetrameren Kanal (Bild 3).

Die Wirkmechanismen der TRPA1-spezifischen Antagonisten A-967079 und HC-030031 wurden ebenfalls von Paulsen et al. [60] untersucht. Neben der Aktivierung des TRPA1-Kanals durch Allylisothiocyanat (siehe Abbildung 11) konnte auch der genaue Wirkmechanismus des TRPA1-Kanal spezifischen Hemmstoff A-967079 nach AITC-Stimulation in Abbildung 12 gezeigt werden. Die Spezifität und Wirksamkeit des A-967079 Hemmstoffs auf den stabil exprimierten humanen TRPA1-Kanal in HEK 293T Zellen (HEK 293T hTRPA1) nach AITC Stimulation unter Verwendung von FURA-2-AM (siehe Punkt 3.5.1) wurden ebenfalls untersucht.

1.5.3 Gewebespezifische Expression des TRPA1-Kanals

In zahlreichen Veröffentlichungen konnte der TRPA1-Kanal auf Proteinebene vor allem in neuronalen, aber auch in zahlreichen nicht-neuronalen Geweben nachgewiesen werden. In sensorischen Neuronen [69], dorsalen Spinalganglien [62] und auch in afferenten sensorischen Nervenbahnen [64] wurde die Expression des TRPA1-Kanals gezeigt. Außerdem konnte das TRPA1-Protein in myelinisierten (A β , A δ) und nicht myelinisierten Nervenfasern (C-Fasern) identifiziert werden. Mechanische, toxische und thermische Stimuli können TRPA1-Kanäle aktivieren und einen damit verbundenen Einstrom von Ca²⁺-Ionen zur Folge haben. Durch die Depolarisierung kann es zur Freisetzung sensorischer Neuropeptide wie „Calcitonin Gene-Related“ Peptid (CGRP), Substanz P und Neurokinin P kommen. Dies kann zur Bronchokonstriktion, Vasodilatation und Rekrutierung von Immunzellen des pulmonalen Systems und längerfristig zur neuronalen Entzündung des Lungengewebes führen [64].

Außerhalb des neuronalen Gewebes konnte der TRPA1-Kanal in nicht-neuronalen Geweben, wie Melanozyten [62], Fibroblasten [70], enterochromaffinen Zellen [6] und pulmonalen Epithelzellen [51, 70], nachgewiesen werden. Da insbesondere für den immunhistochemischen Nachweis in Lungene epithelzellen TRPA1-Antikörper mit unklarer Spezifität verwendet wurden, ist in pulmonalen Geweben die Evidenz für eine Expression des TRPA1-Kanals noch unzureichend [51].

1.5.4 Expression von TRPA1-mRNA

Neben der unzureichenden Datenlage auf Protein-Ebene ist auch die Expression des TRPA1-Kanals auf mRNA-Ebene in primären Epithelzellen nicht geklärt. Es gibt nur wenige Veröffentlichungen, die eine Expression von TRPA1-mRNA in primären Zellen zeigen [51, 70-71]. In immortalisierten Zelllinien wie A549 konnte TRPA1 mRNA bereits durch klassische qPCR identifiziert werden [52, 72].

1.6 Pharmakologie des TRPA1-Kanals

1.6.1 Endogene und exogene TRPA1 Agonisten und mögliche Aktivierungsmechanismen

Die für das TRPA1-Protein charakteristische „Ankyrin repeat“ Domäne könnte für die sensorischen Eigenschaften des Kanals in Säugetieren verantwortlich sein [64]. In [64] (siehe Seite 32) werden mögliche Aktivierungsmechanismen des TRPA1-Kanals dargestellt. Endogene und exogene Aktivatoren können zu kovalenten Modifikationen N-terminaler Cysteine führen, was eine damit verbundene Konformationsänderung und Aktivierung des TRPA1-Kanals zur Folge haben kann. Bei exogenen TRPA1-Kanal-Aktivatoren handelt es sich häufig um elektrophile Substanzen, wie Cinnamaldehyd, Allylthiocyanat (AITC) und Acrolein [64]. Zu den endogenen Agonisten des TRPA1-Kanals, die mit den SH-Gruppen der Cysteine reagieren, gehören Prostaglandine (PG) und 4-Hexanonel (4-HNE) aus dem Fettstoffwechsel oder aus dem Entzündungsgeschehen. Über G-Protein gekoppelte Rezeptoragonisten,

z.B. Bradykinin oder Chloroquin, kann es durch eine Aktivierung der $\beta\gamma$ -Untereinheiten oder über eine durch α -Untereinheiten aktivierte Phospholipase C (PLC) zu einer Öffnung des TRPA1-Kanals kommen. Der genaue Mechanismus der beteiligten Moleküle konnte bisher noch nicht aufgeklärt werden [64].

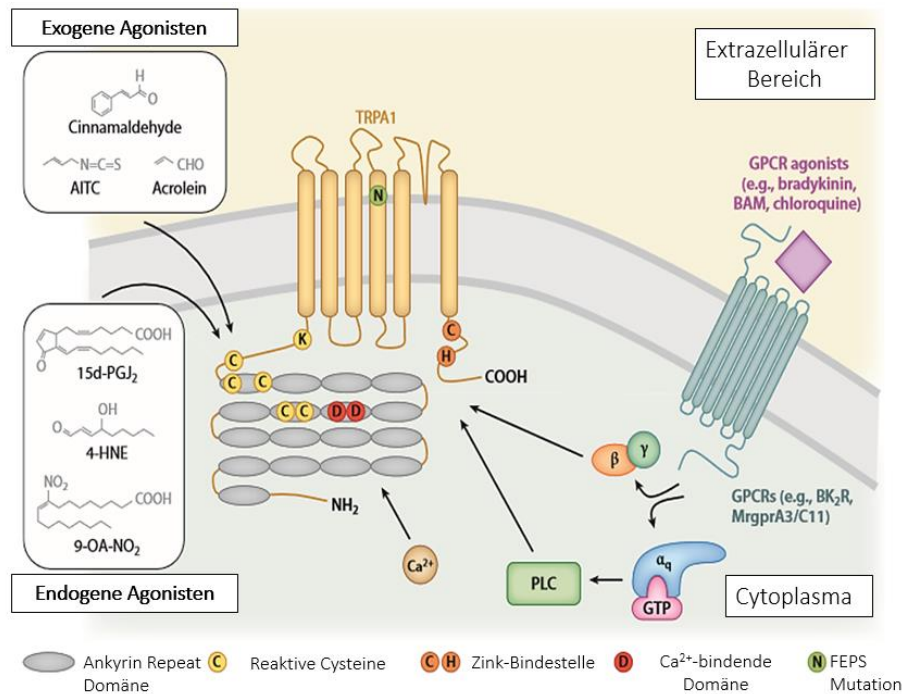


Abbildung 10: Exogene und endogene Aktivatoren des humanen TRPA1-Kanals modifiziert nach Bautista et al. [64]. Darstellung exogener Agonisten (Cinnamaldehyd, Allylisothiocyanat, Acrolein) sowie endogener Agonisten (Prostaglandine, Hydroxynonenal). Durch kovalente Bindung an N-terminaler Cysteine werden TRPA1-Kanäle direkt aktiviert. Weitere Aktivierungsmöglichkeiten bestehen durch GPCR Agonisten (Bradykinin, Chloroquin) über aktivierte $\beta\gamma$ -Untereinheit oder einer Phospholipase C (PLC).

1.6.2 TRPA1 Aktivierung durch Allylisothiocyanat

Isothiocyanate (aus Senf und Meerrettich), Cinnamaldehyd (aus Zimt) und Allicin (aus Knoblauch), die zu den natürlich vorkommenden Inhaltsstoffe zählen, können zu einer direkten Stimulation und Aktivierung des TRPA1-Kanals führen [46, 73]. Allylisothiocyanat (AITC), ein Senfölglykosid und Hauptbestandteil des Schwarzen Senfs (*Brassica Nigra*), gilt als spezifischer TRPA1-Kanal Aktivator. Dabei handelt es sich um einen exogenen elektrophilen Agonisten, welcher mit den Aminosäuren Cystein (Cys619, Cys639 und Cys663) im N-Terminus des TRPA1 Rezeptors kovalente, aber reversible Bindungen eingeht und damit zur direkten Aktivierung des TRPA1-Kanals führen kann [74]. 2015 wurde von Paulsen et al. die porenbildende Domäne nach AITC Stimulation dargestellt (siehe Abbildung 11). Die Pore des TRPA1-Kanals ähnelt sehr stark der porenbildenden Region von TRPV1. Allerdings ist die Pore des TRPA1-Kanals im Gegensatz zum TRPV1-Kanal aus zwei Helices aufgebaut. Die obere Porenregion (siehe Abbildung 11) hat Ähnlichkeiten mit der Pore eines spannungsgesteuerten Natriumkanals (BacNaVs), während die untere Porenregion durch drei Glutaminsäuren GLU920, GLU924 und GLU930 stark negativ geladen ist und Kationen binden kann [60].

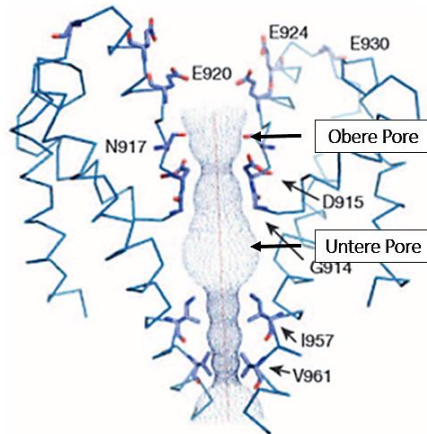


Abbildung 11: Porenbildende Domäne des TRPA1-Kanals nach AITC Stimulation modifiziert nach Paulsen et al. [60]. Darstellung der oberen und unteren Pore des TRPA1-Kanals nach Applikation des TRPA1 spezifischen Aktivators Allylisothiocyanat.

1.6.3 TRPA1-Kanal Inhibitoren und Wirkmechanismus

Die Substanzen HC-030031 und A-967079 repräsentieren zwei potente Inhibitoren der TRPA1-Kanals. Die Arbeitsgruppe von Prof. Julius [60] konnte sechs wichtige Aminosäurereste der TRPA1 Proteinstruktur identifizieren, die direkt an der Inhibition des Kanals durch A-967079 beteiligt sind. Nach Mutation der hochkonservierten Aminosäure Phenylalanin 909 (Phe909) gegen Threonin konnte keine A-967079-induzierte Blockade des AITC-aktivierten TRPA1-Kanals mehr nachgewiesen werden. Wie dargestellt, interagiert A-967079 über Wasserstoffbrücken-Bindungen mit Serin 873 (Ser873) und Threonin 874 (Thr874). Die Aminosäure Phenylalanin 909 stabilisiert die Ligandenbindung durch mögliche π - π Wechselwirkungen. Man spricht von einer „induzierten Passform“ des Protein-Liganden-Komplexes. Auf Grund der Wechselwirkungen lagert sich A-967079 in der unteren Pore des TRPA1-Kanals an und wirkt ähnlich einem Keil, der die Pore verstopft. Dabei handelt es sich um eine reversible Bindung zwischen TRPA1-Kanal und Hemmstoff, denn der Inhibitor konnte jederzeit bei Experimenten wieder ausgewaschen werden.

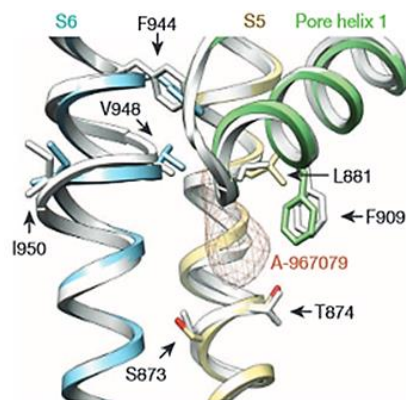


Abbildung 12: Bindungsmechanismus des TRPA1-spezifischen Hemmstoffs A-967079 nach Paulsen et al. [60]. Darstellung des TRPA1-Kanal spezifischen Inhibitor A-967079 (orange) in der unteren Pore des TRPA1-Kanals.

1.7 Funktion des TRPA1-Kanals

1.7.1 TRPA1 als Thermosensor

Für Säugetiere ist eine ständige Kontrolle der Umgebungstemperatur essentiell. Durch körpereigene Regulationsmechanismen erfolgt eine fortwährende Anpassung an wechselnde Bedingungen, so dass das Lebewesen einen zu langen Kontakt mit sehr heißen oder kalten Temperaturen vermeidet. Neben den klassischen Thermorezeptoren der Haut wurden mit der Entdeckung der TRP-Familien weitere potentielle physiologische Temperatursensoren entdeckt. Als potentielle Hitzesensoren gelten TRPV1, TRPV3 und TRPV4, während TRPM8 durch Kälte und kühlend wirkende Substanzen wie Menthol aktiviert wird. TRPA1-Kanäle konnten im heterologen Expressionssystem durch Kälte direkt aktiviert werden [75-76]. Durch die Expression des Kanals in neuronalen und nicht-neuronalen Geweben könnte TRPA1 ein möglicher Sensor für schädigende Kälte („noxious cold“) sein. Hierzu gibt es zahlreiche Veröffentlichungen, die zeigen, dass TRPA1 durch einen Kältereiz sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* aktivierbar ist [77]. 2014 konnte in Mäusen, die einen TRPA1-Kanal mit der S250N Punktmutation exprimierten, eine Verminderung der TRPA1-Kanal abhängigen Kälteempfindlichkeit im Vergleich zu Wildtyp Mäusen nachgewiesen werden [76].

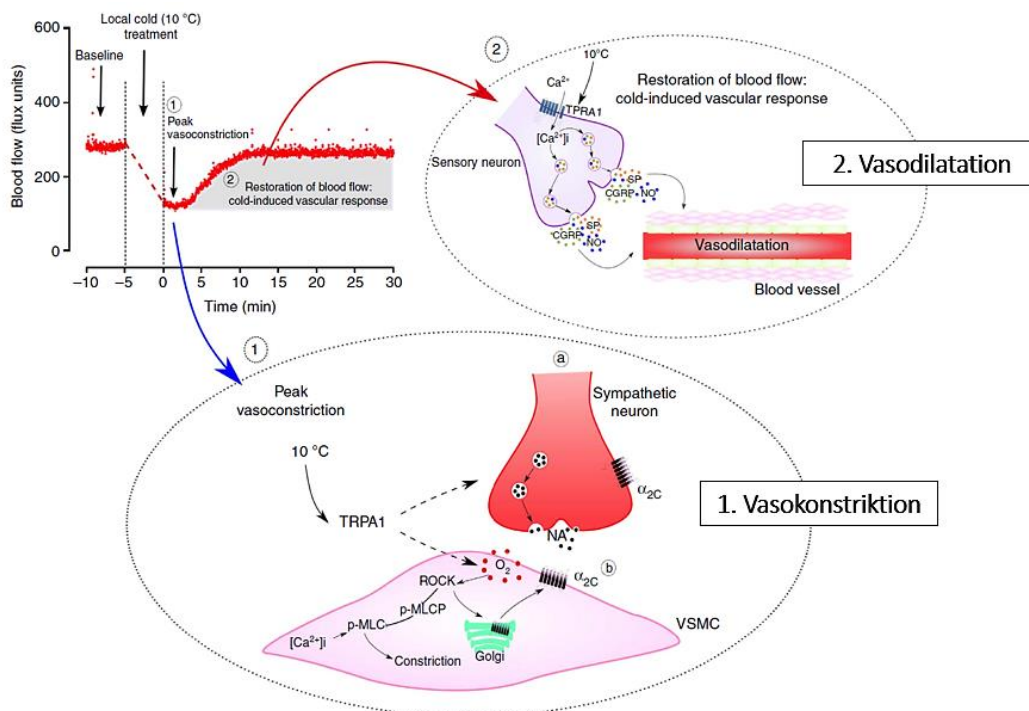


Abbildung 13: Kälte-induzierte vaskuläre Antwort des humanen TRPA1-Kanals [75]. Aktivierung des humanen TRPA1-Kanals durch Kälte im vaskulären System mit akuter (1) und refraktärer Phase (2). Zu Beginn erfolgt eine Kälte-induzierte über TRPA1 vermittelte vaskuläre Vasokonstriktion mit anschließender Vasodilatation.

In Abbildung 13 [75] wird ein Modell zur Kälteempfindlichkeit des TRPA1-Kanals im vaskulären System vorgestellt. In der frühen Phase kommt es nach Kältereiz (< 10 °C) durch Aktivierung sympathischer

Neuronen zu einer Vasokonstriktion. Zeitgleich führen reaktive Sauerstoffspezies über eine aktivierte Rho-Kinase (ROCK) und einer Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (MLCK) zur vaskulären Konstriktion. Die akute Vasokonstriktion geht in eine Vasodilatation über. Während dieser zweiten Phase steigt in sensorischen Neuronen die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration durch Aktivierung des TRPA1-Kanals an, was zu einer vesikulären Freisetzung von „Calcitonin-**Gene-Related Peptide**“ (CGRP), Neurokinin A und Bradykinin in den synaptischen Spalt führt. Allerdings ist die Rolle von TRPA1 als Kältesensor noch umstritten, da in einigen Veröffentlichungen keine Kältesensitivität nachgewiesen werden konnte [78-80].

1.7.2 TRPA1 als Sensor für toxische Substanzen

Der TRPA1-Kanal wurde auch als Sensor für toxische Substanzen beschrieben [51]. Neben die für den Menschen weniger toxische Substanzen (Senföl, Allicin und Cinnamaldehyd) können auch giftige Chemikalien (Acrolein, Crotonaldehyd) den TRPA1-Kanal aktivieren [52].

Senfgas (S-Lost) führt, als chemischer Kampfstoff, auf Grund seiner instabilen chemischen Struktur zur Alkylierung vieler lebenswichtiger Substanzen (DNA, Proteine). Bei Halb-Lost (2-Chloroethylethylsulfide (CEES)) handelt es sich um einen weniger reaktiven Abkömmling des Senfgases. Beide Verbindungen können zu schwerwiegenden Reizungen und Schädigungen von Haut, Lunge und Nervensystem führen. Die Pathomechanismen sind noch nicht genau geklärt und bis dato gibt es keine spezifische pharmakologische Therapie [54]. TRPA1 steht in Verdacht, durch Senfgas und CEES aktiviert zu werden. Die Arbeitsgruppe unseres Kooperationspartners konnte im heterologen Expressionssystem nach CEES-Applikation einen TRPA1-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom nachweisen, der durch den TRPA1 spezifischen Inhibitor AP18 gehemmt werden konnte. Diese CEES-induzierte TRPA1-Aktivität korrelierte auch mit einer höheren Zelltoxizität [52]. Diese Daten konnten auch mit der reaktiven S-Lost Verbindung reproduziert werden. Durch die Applikation von N-Acetylcystein (NAC) konnte interessanterweise ein therapeutischer Effekt erreicht werden [72].

1.7.3 TRPA1 als Hyperoxie- und Hypoxie-Sensor

Molekularer Sauerstoff [O_2] ist essentiell für die Zellatmung aller aerober Organismen. Sauerstoffmangel (Hypoxie) ist aus diesem Grund akut toxisch und stellt ein großes Risiko für den Organismus dar. Durch Sauerstoffmangel kann es im physiologischen System zu massiver Gewebe- und Organschädigung bis hin zum Tod führen. Ein zu hoher Sauerstoffgehalt (Hyperoxie) kann aber auch durch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (siehe Punkt 1.2.1) zu verstärkter Zellalterung und respiratorischen Erkrankungen führen [81]. Deshalb ist es für Lebewesen sehr wichtig, sich ständig an hypoxische und hyperoxische Zustände anzupassen. Dies geschieht im Körper durch Sauerstoffsensoren, die durchgängig den Sauerstoffgehalt im Organismus bestimmen und diese Informationen an

Regulationssysteme weiterleiten. In Säugern übernehmen diese Aufgabe die Carotis-Körperchen (*Glomus caroticum*), die sich am Bifurkationspunkt der *Arteria carotis* befinden, sowie catecholaminerge Neuronen im Gehirnstamm, die eine Änderung des partiellen Sauerstoffgehalts im arteriellen Blut bestimmen. In Abbildung 14 sind die Sauerstoffsensoren im menschlichen Körper dargestellt [82]. Neben den Carotis-Körperchen werden auch zahlreiche lokale Sauerstofffühler in der Peripherie vermutet, die den Sauerstoffgehalt in den peripheren Geweben ermitteln. Die genauen molekularen Vorgänge wurden aber bisher noch nicht aufgeklärt [82].

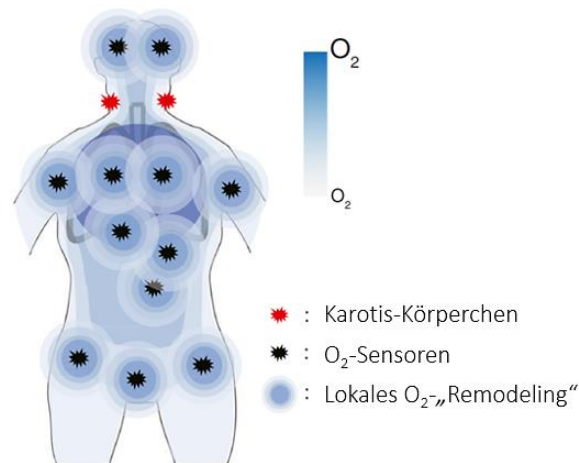


Abbildung 14: Sauerstoffsensoren im menschlichen Körper modifiziert nach Mori et al. [82]. Darstellung der Karotis Körperchen (rot), der peripheren Sauerstoffsensoren (schwarz), sowie Bereiche des lokalen Sauerstoffs „remodelings“ (blau) im physiologischen System.

Der TRPA1-Kanal ist ein vielversprechendes Protein für die Detektion molekularen Sauerstoffs. Die Arbeitsgruppe um Prof. Mori [83] konnte mögliche Aktivierungsmechanismen des TRPA1-Kanals durch Hypoxie und Hyperoxie in sensorischen Neuronen (neuronales Gewebe) identifizieren [81-82] (siehe Abbildung 15). Im normoxischen Zustand liegt die Aminosäure Prolin 394 (Pro394) des TRPA1-Kanals hydroxyliert (Pro-OH) vor und TRPA1 zeigt eine niedrige basale Aktivität. Durch Hypoxie nimmt die Aktivität von Prolinhydroxylasen (PHD) ab, so dass die Aminosäure Prolin 394 (Pro394) des TRPA1 Proteins dehydroxyliert wird. Dies führt zu einem massiven Na^+ und Ca^{2+} Einstrom durch aktivierte TRPA1-Kanäle, was wiederum zur Depolarisierung des sensorischen Neurons und zur Ausbildung eines Aktionspotentials führt. Mittels eines bisher noch nicht aufgeklärten Mechanismus können weitere TRPA1-Kanäle aus Vesikeln an die Plasmamembran gelangen [83-84]. Durch Hyperoxie kann der TRPA1-Kanal im sensorischen Neuron in einen reversiblen Zustand 1 und einen irreversiblen Zustand 2 versetzt werden (siehe Abbildung 15). Zunächst erfolgt die reversible Hydroxylierung der Sulfhydrylgruppen der Cysteine 633 und 856 (CYS-SH zu CYS-S-OH) im TRPA1-Kanal, die zur Aktivierung des Kanals durch eine moderate Erhöhung der Sauerstoffkonzentration führt. Steigt die Sauerstoffkonzentration weiter an, kommt es zur Bildung irreversibler Disulfidbrücken (CYS-S-S-R) dieser Cysteine und damit zu einer

Daueraktivierung des TRPA1-Kanals. Ein Clathrin-abhängiger Signalweg sorgt dafür, dass TRPA1-Kanäle über Endozytose wieder von der Plasmamembran entfernt werden können [50].

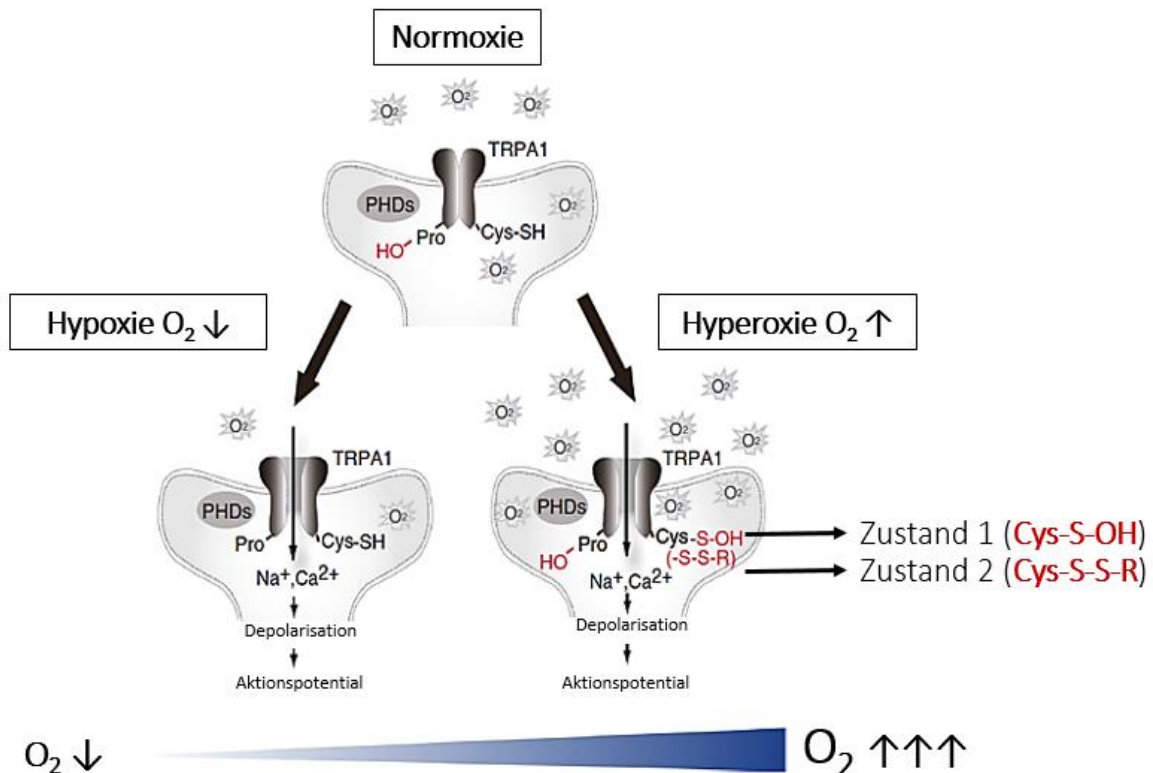


Abbildung 15: Molekulare Aktivierung des TRPA1-Kanals durch Hyperoxie und Hypoxie im sensorischen Neuron (modifiziert nach Mori et al. [82]). Basale Aktivität des TRPA1-Kanals in Normoxie. Unter Hypoxie (links) wird das Prolin 394 des TRPA1-Kanals dehydroxyliert und damit TRPA1 aktiviert. Nach Zunahme des Sauerstoff Gehalts erfolgt zunächst eine reversible Hydroxylierung (Zustand 1) von Cystein 633 und 856 (CYS-S-H zu CYS-S-OH). Höhere Sauerstoffkonzentrationen induzieren die Bildung irreversibler Disulfidbrücken (CYS-S-S-R) dieser Cysteine (Zustand 2) zur dauerhaften Aktivierung des TRPA1-Kanals.

Auf Grund dieser molekularen Veränderungen bietet sich TRPA1 als potentieller Sauerstoffsensoren des physiologischen Systems an. Im neuronalen Gewebe wurde diese Hypothese bereits diskutiert [81-82, 85]. Inwiefern TRPA1 in nicht-neuronalen Geweben eine ähnliche Rolle übernimmt und welche molekularen Mechanismen sich dahinter verbergen, ist noch nicht bekannt. Durch eine eventuelle Expression des TRPA1-Proteins im respiratorischen System [51, 70] könnte der TRPA1-Kanal auch hier als physiologischer Sauerstoffsensoren durch den oben genannten Mechanismus protektiv wirken und als „Wächter“ die Lunge vor größeren Gewebeschäden schützen.

1.7.4 Pathologische Veränderung mit Beteiligung des TRPA1-Kanals

1.7.4.1 Familiäres Episodisches Schmerzsyndrom

Das Familiäre Episodische Schmerzsyndrom (FEPS) ist eine autosomal dominante vererbte Erkrankung, die durch wiederkehrende Schmerzepisoden im Oberkörper gekennzeichnet ist und durch physischen und psychischen Stress ausgelöst werden kann [86]. Die Ursache dieser Erkrankung liegt in einer

Punktmutation im Codon des TRPA1-Gens für die Asparaginsäure 855 in der vierten Transmembrandomäne (S4), die gegen Serin (Asp855Ser) ausgetauscht wird (siehe Abbildung 10). Bei sonst identischen pharmakologischen Eigenschaften zeigt der mutierte Kanal nach Aktivierung fünffach stärkere Einwärtsströme im Vergleich zum nicht mutierten sog. Wildtyp-Kanal. Patienten mit episodischer Schmerzsymptomatik leiden als Folge dieser Ionenkanal-Erkrankung (sog. „Channelopathy“) an einer überschießenden Hautreaktion und Hyperalgesie bei Kontakt mit punktuellen Reizen. Spezifische TRPA1-Kanal Blocker (A-967079 oder HC-030031) zeigten in *in-vitro* Versuchen eine starke Inhibition der abnormalen TRPA1-Kanal Aktivität [60, 87]. Die Anwendung derartiger TRPA1-Kanalblocker könnte deswegen für das Familiäre Episodische Schmerzsyndrom (FEPS) eine vielversprechende Therapie sein [62].

1.7.4.2 TRPA1 als neues Arzneimitteltarget

Der respiratorische Trakt kann ständig verschmutzter Luft mit Schadstoffen und Feinpartikeln ausgesetzt sein. Primäre afferente sensorische Neuronen innervieren die Luftwege und dienen als „Wächter“ für potentiell gewebeschädigende Substanzen. Der obere Bereich der Luftwege wird sehr stark von primären afferenten C-Fasern und A δ -Fasern der dorsalen Spinalganglien und trigeminalen Ganglien innerviert. Eine Stimulation dieser Fasern induziert die Freisetzung inflammatorischer Neuropeptide wie Substanz P, „Calcitonin Gene-Related-Peptide“ (CGRP) und Neurokinin A, was zu Bronchokonstriktion, Vasodilatation und Rekrutierung von Zellen des Immunsystems führt [64]. Häufig münden diese Vorgänge in Hustenanfällen, einer verstärkten Mukus-Sekretion und Kurzatmigkeit. Das Resultat langanhaltender entzündlicher Prozesse können chronische respiratorische Erkrankungen wie Reizhusten, Asthma, COPD oder das „Reactive airway dysfunction syndrome“ (RADS) sein. Beim RADS handelt es sich um Asthma-ähnliche Anfälle in Kombination mit Husten nach Exposition von Gasen oder chemisch reizenden Stoffen [88]. Der TRPA1-Kanal scheint Mediator dieser inflammatorischen Antwort in den Atemwegen zu sein, da TRPA1 in vagalen Neuronen exprimiert wird und zahlreiche TRPA1-Agonisten Aktionspotentiale in sensorischen Fasern produzieren, die zur Entzündung der Luftwege führen [62, 64]. Die *in-vivo* Rolle von TRPA1 in nicht-neuronalen pulmonalen Zellen, wie Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Endothel- und Epithelzellen, ist bisher noch unklar.

Der TRPA1-Kanal als zellulärer Sensor für endokrine Botenstoffe [64], elektrophile Chemikalien [60], toxische Substanzen [52] und Sauerstoff (Hyperoxie, Hypoxie) [81-82, 85] könnte eine wichtige Zielstruktur für die Entwicklung neuer Arzneimittel sein. Auf Grund seiner möglichen Expression und Funktion in neuronalen [62, 81]) und nicht-neuronalen Geweben [51, 70] könnte TRPA1 sowohl an neuronalen als auch an nicht-neuronalen Entzündungsprozessen beteiligt sein. Damit hätte der Einsatz von TRPA1-Kanal spezifischen Inhibitoren, wie A-967079 oder HC-030031, möglicherweise einen großen Nutzen bei der Behandlung respiratorischer entzündlicher Erkrankungen.

1.8 Ziel dieser Arbeit

Wie in der Einleitung dargelegt, ist die Expression und Funktion des TRPA1-Kanals in neuronalen Geweben bereits relativ gut verstanden. Seine Expression in nicht-neuronalen Geweben des Respirationstrakts gilt jedoch durch Verwendung von Antikörpern unbekannter Spezifität in der Immunocytochemie als nicht gesichert [89-91] und über seine Funktion in diesen Geweben als Sensor für toxische Chemikalien ist darüber hinaus wenig bekannt [54].

Das Ziel dieser Arbeit ist daher, eine TRPA1-spezifische mRNA- und Protein-Expression in nicht-neuronalen epithelialen Zellen des Respirationstrakts eindeutig nachzuweisen. Dazu sollte eine Methode zur direkten Quantifizierung von TRPA1-mRNA (Nanostring®-Technologie) und spezifische TRPA1-Antikörper zur Identifizierung TRPA1-exprimierender Gewebe genutzt werden. Darüber hinaus sollen mit Hilfe eines globalen TRPA1-defizienten Mausmodells TRPA1-freie Lungen sowie Epithelzellen des Respirationstrakts produziert werden, deren Antwort (Bildung eines Lungenödems oder zellulärer Ca^{2+} -Einstrom) nach Applikation chemischer (Sauerstoff, Halb-Lost) und physikalischer Reize (z.B. Kälte) mit TRPA1-exprimierenden sog. Wild-Typ-Zellen verglichen werden. Zu diesem Zweck sollen das Modell der isolierten perfundierten Mauslunge (IPL) für die Quantifizierung von Lungenödemen sowie die Isolation alveolärer (Typ I und Typ II), bronchialer und trachealer Epithelzellen und Methoden zur zellulären Ca^{2+} -Einstrom-Messung etabliert werden. Mit Hilfe dieser Techniken soll es gelingen erstmals die Expression von TRPA1-Kanälen im nicht-neuronalen Epithel des Respirationstrakts nachzuweisen und darüber hinaus auch erste Erkenntnisse über die Funktion des TRPA1-Kanals in diesen epithelialen Zellen zu gewinnen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Mauslinien

Tabelle 1: Mauslinien

Mauslinie	Genetischer Hintergrund
TRPA1-defiziente Mäuse	C57BL / 6 (siehe Punkt 2.2.2)
Wild-Typ-Mäuse (aus der gleichen Kolonie)	C57BL / 6

2.1.2 Zelllinien

Tabelle 2: Zelllinien

Zelllinie	
A549	Humane Adenokarzinom-Zelllinie mit Alveolar-Typ-II Differenzierung; Herkunft: American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA
HEK 293T	Humane embryonale Nierenzellen, Herkunft: American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA
HEK 293T hTRPA1	Zelllinie mit stabiler Überexpression des humanen TRPA1; Herkunft etabliert in der Doktorarbeit von Dr. Eva Schäfer [92]
MEF	Murine embryonale Fibroblasten

Tabelle 3: Primäre murine Lungenzellen

Primäre murine Lungenzellen	Abkürzung
Alveoläre Epithelzellen TypII	ATII
Alveoläre Epithelzellen TypI	ATI
Bronchiale Epithelzellen	bEpC
Endothelzellen	EC
Immunzellen	IC
Präkapilläre arterielle glatte Muskelzellen	PASMC
Primäre murine Lungenfibroblasten	pmLF
Tracheale Epithelzellen	tEpC

2.1.3 Zellkulturmedien

Zellkulturmedien und Zusätze

Tabelle 4: Zellkulturmedien und Zusätze

Medium	Firma	Artikelnummer
DMEM	Lonza, Basel, Schweiz	BE-1260 4F
DMEM F12	Lonza, Basel, Schweiz	BE12-719F
FBS	Invitrogen, Carlsbad; USA	10270-106
HBSS mit Ca ²⁺	Lonza, Basel, Schweiz	BE10-527F

HBSS ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Lonza, Basel, Schweiz	BE10-547F
MEM	Sigma Aldrich, Deisenhofen	M4655
Normocin (50 mg/ml)	Invivogen, Sorrento, USA	#ant-nr-1
PBS	Lonza, Basel, Schweiz	BE-17-512F
Penicillin/Streptomycin	Lonza, Basel, Schweiz	DE-17-602E
Plasmocin	InvivoGen, San Diego, USA	Ant-mpp / ant-pc
Smooth muscle cell Growth Medium 2	Promocell, Heidelberg	C-22062
Supplement Mix	Promocell, Heidelberg	C-39267
Trypsin	Lonza, Basel, Schweiz	BE17-161E

Medium für HEK 293T Zellen

Tabelle 5: Medium für HEK 293T Zellen

Inhaltsstoffe	Menge pro Ansatz
DMEM	500 ml
FBS	10 %
Penicillin/ Streptomycin	1 %

Medium für HEK 293T hTRPA1 Zellen

Tabelle 6: Medium für HEK 293T hTRPA1 Zellen

Inhaltsstoffe	Menge pro Ansatz
MEM	500 ml
FBS	10 %
Penicillin/ Streptomycin	1 %

Medium für MEF Zellen

Tabelle 7: Medium für MEF Zellen

Inhaltsstoffe	Menge pro Ansatz
DMEM	500 ml
FBS	10 %
Penicillin/ Streptomycin	1 %

Medium für murine alveoläre-Epithelzellen TypI und TypII (ATI und ATII)

Tabelle 8: Medien für die Isolation und Kultivierung muriner alveolärer Epithelzellen TypI und TypII

Inhaltsstoffe	Menge pro Ansatz
1 % Agaroselösung	
DMEM	5 ml
Agarose (ATII)	50 mg
Minus-Medium (Isolation)	
DMEM	250 ml
Penicillin/Streptomycin	1 %
HEPES	2,5 ml
Plus-Medium (Isolation)	

DMEM	250 ml
Penicillin/ Streptomycin	1 %
DNaseI	10 mg
HEPES	2,5 ml
Medium (Kultivierung)	
DMEM	50 ml
FBS	10 %
Penicillin/ Streptomycin	1 %
Medium zum Abstoppen des Trypsin-Verdau	
DMEM	500 ml
FBS	10 %
Penicillin/ Streptomycin	1 %

Medium für die Kultivierung von primären murinen Endothelzellen (EC)

Tabelle 9: Medium für murine Endothelzellen

Inhaltsstoffe	Menge pro Ansatz
HBSS Lösung mit 0,5 % BSA	
HBSS mit Calcium, Magnesium	40 ml
BSA	200 mg
Dispaselösung 1,83 U/mg (Verdau)	
HBSS ohne Calcium, Magnesium	20 ml
Dispase	54,64 mg
2 %-Gelatinelösung („Coating“)	
Gelatine	2 g
Destilliertes Wasser	98 g
Medium (Kultivierung)	
DMEM/F12	500 ml
FBS	20 %
Penicillin/ Streptomycin	1 %
ECGS-H Promocell Nr. C-30120	2 ml

Medium für die Kultivierung von murinen primären präkapillaren arteriellen glatten Muskelzellen (PASMIC)

Tabelle 10: Medium für murine präkapillare glatte Muskelzellen

Inhaltsstoffe	Menge pro Ansatz
Smooth Muscle Cell Growth Medium 2	500 ml
Supplement Mix	1 Aliquot
Normocin	1 ml
Penicillin/ Streptomycin	1 %

Medium für die Kultivierung von murinen primären bronchialen (bEpC) und trachealen Epithelzellen (tEpC)

Tabelle 11: Medium für murine bronchiale und tracheale Epithelzellen

Inhaltsstoffe	Menge pro Ansatz
Collagenlösung („Coating“)	

Collagen	0,5 mg
Eisessig	0,2 %
Millipore Wasser	1 ml
Medium (Kultivierung)	
Smooth muscle cell medium	500 ml
Supplement SMC Medium	1 Aliquot
Normocin	1 ml
Verdaumedium (Präparation)	
HBSS ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	20 ml
Penicillin/ Streptomycin	1 %
Pronase	28 mg [1,4mg/ml]
DNase	2 mg [0,1mg/ml]
Stop-Medium	
DMEM	50 ml
FCS	10 %
Penicillin/ Streptomycin	1 %

Die Collagenase Lösung wurde nach Herstellung in 1ml Aliquots bei -20°C eingefroren. Das Medium für den Verdau der Gewebe wurde am Tag der Präparation frisch hergestellt.

Medium für die Kultivierung primärer muriner Lungenfibroblasten (pmLF)

Tabelle 12: Medium für murine Lungenfibroblasten

Inhaltsstoffe	Menge pro Ansatz
DMEM/F12	500 ml
FCS	20 %
Penicillin/ Streptomycin	1 %

2.1.4 Chemikalien

Tabelle 13: Chemikalien

Chemikalie	Artikelnummer	Firma
A-967079	Sigma Aldrich, Deisenhofen	SML 0085-5 mg
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe	7328.2
Acetonitril	Merck Millipore	100030
Agarose (pmLF)	Carl Roth, Karlsruhe	100030
Agarose (ATII)	Sigma Aldrich, Deisenhofen	A9414-250 g
Allylthiocyanat (AITC)	Sigma Aldrich, Deisenhofen	377430-5 g
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe	K029.1
Amphotericin B	Sigma Aldrich, Deisenhofen	A9525
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma Aldrich, Deisenhofen	215589
BAPTA/1,2-Bis(2-aminophenoxy)-ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure	Sigma Aldrich, Deisenhofen	A4926
Bromphenolblau	Sima Aldrich, Deisenhofen	B0126
BSA (Kälber Serum Albumin)	Sima Aldrich, Deisenhofen	9418
Calciumchlorid/ CaCl ₂ x H ₂ O	Sima Aldrich, Deisenhofen	C3306

2-Chloroethylethylsulfide (CEES/ Halb-Lost)	Sigma Aldrich, Deisenhofen	242640-5 g
Chloroform	Carl Roth; Karlsruhe	3313.4
Collagenase Typ1	Merck Millipore, Darmstadt	C1-28
Collagen human (tEpC)	Sima Aldrich, Deisenhofen	C7521-5 mg
Complete Ultra Mini Tablette	Roche, Basel	05892970001
CsCl	Sigma Aldrich, Deisenhofen	289329
DAPI	Sigma Aldrich, Deisenhofen	32670
Dispase (ATII)	Corning, New York	354235
DMSO steril	Sima Aldrich, Deisenhofen	D2650-5X5MI
DNaseI	PanReac®AppliChem	A3778, 0500
Entwickler DOKUMOL	TETENAL AG, Norderstedt	DOKUMOL
Essigsäure	VWR, Darmstadt	UN2789
Ethanol reinst (>99,5 %)	Carl Roth, Karlsruhe	5054.3
Ethidiumbromid	Sima Aldrich, Deisenhofen	E4391
Formaldehyd 37 %	Sima Aldrich, Deisenhofen	252549
FURA-2AM	Sima Aldrich, Deisenhofen	47989
Glycerin 87 %	Merck Millipore, Darmstadt	1.04091
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe	9105.3
Goatserum	Bio-West	S2000-100
Hematoxylin Lösung	Sima Aldrich, Deisenhofen	HHS16-500ML
Heparin-Natrium	Braun, Melsungen	126/317126
HEPES 4-(2Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure	Carl Roth, Karlsruhe	9105.3
HEPES Puffer pH 7,5 (1M)	Pan Reac® AppliChem	A6916, 0125
Höchst 33342 [10 mg/ml]	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	62249
Igepal CA 630	Sigma Aldrich, Deisenhofen	I8896
Isopropanol	Sigma Aldrich, Deisenhofen	6752.3
Kaliumchlorid/ KCl	Carl Roth; Karlsruhe	6781.1
Ketamin 10 %	Medistar, Ascheberg	04-03-92-64/23
Kaliumdihydrogenphosphat/ KH ₂ PO ₄	Carl Roth, Karlsruhe	6875.2
Kaliumhydroxid/ KOH	Carl Roth, Karlsruhe	2526.1
Kochsalzlösung 0,9 %	Braun,	08609255
Kupfer-II-Sulfat/ Cu(II)SO ₄	Sigma Aldrich, Deisenhofen	C8027
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe	T145.2
Magnesiumchlorid/ MgCl	Carl Roth, Karlsruhe	KK36.2
Magnesiumchlorid Hexahydrat/ MgCl ₂ x 6H ₂ O	Carl Roth, Karlsruhe	M2393
Mercaptoethanol	Merck Millipore, Darmstadt	805740
Mercaptoethanol (RNA)	Sigma Aldrich, Deisenhofen	M6250-10 ml
Methanol/ MeOH	Carl Roth, Karlsruhe	P717.1
Nagellack, klar	Wild Shine, Basingstoke, GB	E4063
Natriumacetat	Merck Millipore, Darmstadt	106268
Natrium Azid	Sigma Aldrich, Deisenhofen	822335
Natriumhydroxid/ NaOH	Carl Roth, Karlsruhe	HN01.1
Natriumchlorid/ NaCl	Carl Roth, Karlsruhe	9265.1
Natriumdeoxycholat	Sigma Aldrich, Deisenhofen	16026
Natriumhydrogenphosphat/	Carl Roth, Karlsruhe	T876.1

Na ₂ HPO ₄		
Natriumhydrogencarbonat/ NaHCO ₃	Carl Roth, Karlsruhe	HN01.1
Natriumthiosulfat/Na ₂ S ₂ O ₃	Sigma Aldrich, Deisenhofen	S6672-500 g
Natriumhypochlorit 12 %	Sigma Aldrich, Deisenhofen	9062.1
Natriumlaurylsulfat/ SDS	Sigma Aldrich, Deisenhofen	L-3771-500 g
Ponceau S	Applichem, Darmstadt	A2935
Pronase (bEpC, tEpC)	Roche, Basel, Schweiz	10165921001
Rompun	Bela pharm, Vechta	L4390
Rotiphorese Gel	Carl Roth, Karlsruhe	3029.1
Salzsäure konz. (37 % =12M) / HCl	Merck Millipore, Darmstadt	100317
Stickstoff (N ₂) flüssig	Linde, München	N2 flüssig
Tetramethylethylendiamin/ TEMED	Carl Roth, Karlsruhe	2367.1
Tris Base	Carl Roth, Karlsruhe	AE15.2
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe	3051.2
Tween 20	Sigma Aldrich, Deisenhofen	P2287
Ultra-Pure DEPC Treated Water	Invitrogen, Carlsbad, USA	1769380
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe	9713.1

Tabelle 14: Medizinisches Gas für Zellexperimente

Gas	Firma	Artikelnummer
Carbogen Gas (ILM)	Linde, München	UN3156
Sauerstoff O ₂ (Hyperoxie)	Praxair, Dresden	UN1072
Stickstoff N ₂ (Hypoxie)	Praxair, Dresden	F50/P200

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 15: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Firma	Artikelnummer
Röntgenfilm	Thermo Fisher Scientific, Schwerte	34090
Butterfly	TERUMO Surflo®, Leuven, Belgien	SV-2132
Deckgläser / Glasplättchen	Neolab, Heidelberg	1-6230
Cutifix® Einmal Skalpelle	Braun, Melsungen	130285_v
Einmal-Sterilfilter 40 µm/ 100 µm	BD Falcon™, Amsterdam	352340/352360
Einmal-Sterilfilter 70 µm	Corning®, New York, USA	431751
Einmal-Sterilfilter 0,2 µm	GE Healthcare®, Little Chalfont; UK	M10462200
Immersol™ 518F	Carl Zeiss, Jena	130612
Inject®-F 1 ml	Braun, Melsungen	91660178
Inject® 10 ml	Braun, Melsungen	4606108V
Falcon® Petri Dish	Corning®, New York, USA	351029
Röhrchen („Falcons“) 50 ml/ 15 ml	Sarstedt, Nümbrecht	62.548.009 62.554.502
Kimtech Science	Kimberly-Clark, Irving, USA	7558
Kryogefäße 1,8 ml	Sarstedt, Nümbrecht	72.379
Kulturflaschen T25 / T75	Sarstedt, Nümbrecht	83.3910/ 83.3911

Nitrozellulosemembran PROTRAN	Sigma Aldrich, Deisenhofen	10401196
Objektträger	Carl Roth, Karlsruhe	H868
Parafilm	PARAFILM MIS, Neenah, USA	PM-992
Nylon Filter 10 µM (ATII)	Sefar, Heiden	3A03-0010-102-00
Nylon Filter 20 µM (ATII)	Sefar, Heiden	3A03-0020-102-10
Nylon Filter 100 µM (ATII)	Sefar, Heiden	3A03-0100-115-01
RBS®35	Sigma aldrich, Deisenhofen	8346-12
Roti® PVDF Membran	Carl Roth, Karlsruhe	T8301
Sterican® 30 G	Braun, Melsungen	4656300
Sterican® 21 G	Braun, Melsungen	2050806
Thermo Clean DC	Bioanalytic, Freiburg	002512-0500

2.1.6 Laborausstattung

Tabelle 16: Laborausstattung

Geräte	Firma
Abzug Systeme	Waldner, Wangen
A-Chamber	Biospherix, Lacona, USA
A-chamber Manual vo.5 d113 (version 3.3 July 2014)	Biospherix, Lacona; USA
A-chamber Adapter Plate	Biospherix, Lacona, USA
Autoklaviersystem	Hp Medizintechnik, Oberschleißheim
Bent cannula type 73-0723	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Binokular SD30	Olympus, Hamburg
Ca ²⁺ -Imaging System	TILL-Photonics, Gräfelfing
Ca ²⁺ -Imaging Filtersets	AHF Analysetechnik, Tübingen
CO ₂ -Inkubator Heracell150i	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Dissolved Oxygen Meter	Lutron Digital instruments, Taipei
Dokumentationssystem für DNA-Gelelektrophorese	Peqlab, Erlangen
DYNAL MPC®-1	DYNAL BIOTECH, Oslo, Norwegen
Elektrophoresekammer Proteine	Peqlab, Erlangen
E-702	Biospherix, Lacona, USA
Fluoreszenzmikroskop	Olympus, Hamburg
Gas Maske X-plore	Dräger, Lübeck
Heizplatte	VWR, Darmstadt
Hitzesterilisator FunctionLine Instruments	Heraeus, Thermo Fisher Sci., Schwerte
Isoliertes perfundiertes Lungenmodell/IPL-2	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
ISAMATC Tubing Pump	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Kippschüttler	Peqlab, Erlangen
Kryokonservierungsbox	Nalgene, Sigma Aldrich, Deisenhofen
Kryomikrotom	Leica, Wetzlar
LAUDA E100 Ecoline Staredition	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Lightcycler® 480 II	Roche, Basel, Schweiz
MEGA STAR 1.6 R Zentrifuge	VWR, Darmstadt
Microliter Sryinges 25 µl	Hamilton, Bondanuz, Schweiz
Mikrozentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Mini Centrifuge	Nippon Genetics, Dueren

MINIVENT type 845	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Mirax Desk Scanner (Objekträger Scanner)	Carl Zeiss, Jena
Nanophotometer (Nanodrop)	Implen, München
Nanostring® Prep Station	Nanostring, Seattle, USA
Nanostring® Digital Analyzer	Nanostring, Seattle, USA
Nanostring® nSolver Software 3.0	Nanostring, Seattle, USA
Odyssey®Fc Western Blot Imaging	LI-COR, Lincoln, USA
Oedema Balance Module/ EBM type 713	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
OP-Besteck	FST, Berlin
Osmometer Vapro 5520	Wescor Inc., Logan, USA
PALM MicroBeam	Carl Zeiss, Jena
PALm RoboSoftware	Carl Zeiss, Jena
PCR Thermocycler	Peqlab, Erlangen
PLUGSYS® Module Servo Controller/SCP type 704	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Perfusion Kanüle type 73-0723	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
pH Elektrode SenTix 81	WTW, Weilheim
pH-Meter Inolab pH7110	WTW, Weilheim
Photometer	Tecan, Crailsheim
Pinzette 15012-12 (ILM)	S&T Dumont, Neuhausen, Schweiz
Pipetten	Eppendorf, Hamburg/Gilson, Middelton
Pipetus® Junior	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
PLUGSYS® TAM-A/DLP type 13388	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
PLUGSYS® TAM-A/P75 type 17111	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Proox Model P110 (2052)-E702	Biospherix, Lacona, USA
Proox Model P110 Manual v3.3 d0714	Biospherix, Lacona, USA
Prycellys® Homogeniser	Peqlab, Erlangen
Pumpe Zellkultur BUC21	Vacubrand, Wertheim
Schüttelinkubator	Thermo Fisher, Schwerte
Spannungsquelle Peqpower	Peqlab, Erlangen
Sterilwerkbank/ Laminarflow	Heraeus, Hanau
Thermomix Probentemperierer	Eppendorff, Hamburg
Tischzentrifuge Mikro 20 Labfuge	Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge Mikro 22R Labfuge	Hettich, Tuttlingen
Tracheale Kanüle	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Transferkammer Westernblot	Biorad, München
VCM type 681	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Vortexgerät Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad Tauchsieder	MGW, Lauda, Lauda-Königshofen
Zellkulturmikroskop Wilover AFL 40 Phako	Hund, Wetzlar
Zen Software	Carl Zeiss, Jena
Zentrifuge Rotana/R E1210	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Sorval RC5C Plus	Sorval, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Zentrifuge Labfuge 400	Thermo Fisher Scientific., Schwerte
-80°C Gefrierschrank U410	Eppendorf, Hamburg

2.1.7 Murines TRPA1 Plasmid

Das Plasmid mit der codierenden Sequenz (cDNA) des murinen TRPA1-Kanals (siehe Abbildung 16) wurde von Thomas Büch bereitgestellt und eignet sich sehr gut zur heterologen Expression des Kanals in Zelllinien (z.B. HEK 293T) [93]. Es handelt sich um einen bicistronischen Vektor mit einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES), einem aus dem Haushuhn stammenden beta-Aktin Promoter (CAG-Promoter) und einer cDNA für die Ausprägung einer Ampicillin Resistenz. Nach Transfektion des mTRPA1 Plasmids in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK 293T WT) erfolgte neben der Expression des murinen TRPA1-Kanals die Synthese des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) von der gleichen mRNA Sequenz, so dass die Transfektionseffizienz unter dem Fluoreszenz-Mikroskop quantifiziert werden konnte. Das Protein des TRPA1-Kanals und das GFP wurden, wie in Punkt 2.2.7 beschrieben, durch „Western Blot“ Analysen nachgewiesen.

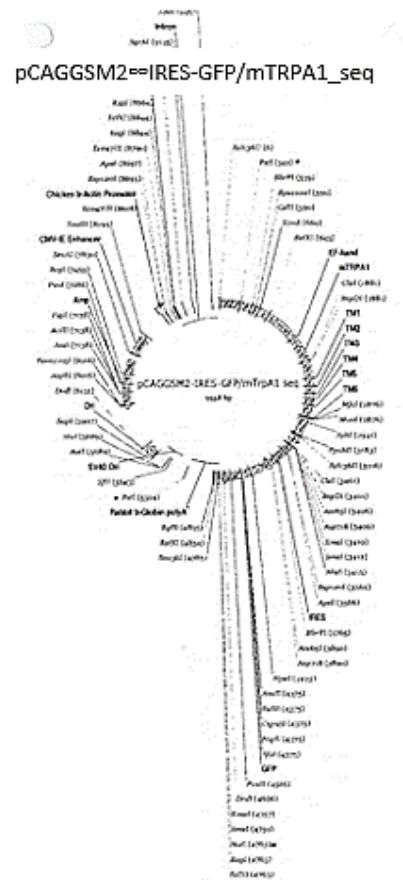


Abbildung 16: Plasmid Vektor des murinen TRPA1-Plasmids

2.1.8 Antikörper

Die Inkubation der Erstantikörper für „Western Blot“ und Immunofluoreszenz-Analysen erfolgte bei 4 °C über Nacht. Zweitantikörper wurden für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Folgende Antikörper wurden während der Experimente verwendet.

Tabelle 17: Antikörper und Verdünnungen

Antikörper	Artikelnummer	Hersteller	Verdünnung (5 % PBST-Milchpulver Lösung)
Anti-mouse CD16/ CD32	553142	BD Biosciences	15 µl auf 10 ml

Anti-mouse CD45	553076	BD Biosciences	15 µl auf 10 ml
Anti-Prosurfactant Protein C (proSP-C)	AB3786	Chemicon International	1:20000
Anti-Podoplanin (PP)	AF3244	R&D systems	1:500
Anti-mTRPA1	Ab68847	Abcam	1:1000
Anti-mTRPA1	Ab68848	Abcam	1:1000
Anti-rabbit POX	A-6154	Sigma Aldrich	1:10000
Anti-Cytokeratin (pan) mixture	C2562	Sigma Aldrich	1:100
Anti-beta Actin	A3554-POX	Sigma Aldrich	1:10000
Anti-goat HRP	A5420	Sigma Aldrich	1:10000
Anti-FITC	F9806	Sigma Aldrich	1:80

2.1.9 Puffer und Lösungen

Allgemeine Puffer und Lösungen:

Tabelle 18: Puffer und Lösungen (allgemein)

Puffer/ Lösung	Konzentration/Menge	Substanz
Acetonitril, 26 %	26 % v/v	Acetonitril (in Millipore-H ₂ O)
Höchst 33342	10 mg/ml	in 1x PBS
Lämmli-Puffer, 6x	375 mM 48 % 6 % 0,03 % 9 %	4x Tris/ SDS Puffer (pH 6,8) Glycerin SDS (Natriumlaurylsulfat) Bromphenolblau β-Mercaptoethanol
Laufpuffer für SDS-Gelelektrophorese	250 mM 1,920 M 35 mM/1%	Tris Base Glycin SDS (Natriumlaurylsulfat)
Paraformaldehyd Lösung, 3,7 %	10 % v/v	Paraformaldehyd in 1x PBS
PBS 1x	10 % v/v	10x PBS
PBS 10x	1,37 M 27 mM 101 mM 18 mM	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄
PBST	0,5 %	Tween 20 in PBS 1x
RIPA-Protein-Lysepuffer	1 % 0,5 % 0,1 % Ad 500 ml	Igepal CA 630 Na ⁺ -deoxycholat SDS (Natriumlaurylsulfat) in PBS 1x
Protease Inhibitor Lösung	10 ml 1 Tablette	RIPA-Protein-Lysepuffer Complete Ultra Mini
Transferpuffer für „Western Blot“	250 mM 1,920 M 7 mM	Tris Base Glycin SDS (Natriumlaurylsulfat)
Tris/ SDS Puffer 4x, pH 6,8 (pH bei 4-8 °C einstellen)	500 mM 1 mM	Tris Base SDS (Natriumlaurylsulfat)
Tris/ SDS Puffer 4x, pH 8,8 (pH bei 4-8 °C einstellen)	1,5 mM 14 mM	Tris Base SDS (Natriumlaurylsulfat)

Puffer und Lösungen für das isolierte-perfundierte Lungenmodell (IPLM):

Tabelle 19: Puffer und Lösungen für das isolierte-perfundierte Lungenmodell

Puffer/ Lösungen	Konzentration/Menge	Substanz
Natriumhydrogencarbonatpuffer	2,2 ml 100 ml	Natriumhydrogencarbonatlösung Stock Elektrolytlösung II N
Natriumhydrogencarbonatlösung Stock	4 g 100 ml	Natriumhydrogencarbonat Millipore H ₂ O
Elektrolytlösung II N 200 ml <i>ILM-Perfusionslösung</i> <i>Hergestellt von der Apotheke</i> <i>Klinikum der LMU München,</i> <i>Lagerung bei RT</i>	7,19 g 0,33 g 0,27 g 0,36 g 0,15 g 2,67 g 51,28 g 1000 ml	Natriumchlorid Kaliumchlorid Magnesium Hexahydrat Calciumchlorid Dihydrat Kaliumdihydrogenphosphat Glucose-Monohydrat Hydroxyethylstärke ^{200000/5} Aqua ad injectabilia
Halb-Lost Stocklösung (4M)	10 µl 12 µl	2-Chloroethyl ethyl sulfide (CEES) in Dimethylsulfoxid (DMSO) steril
Halb-Lost Applikationslösung tracheal (4 mM)	1 µl 1000 µl	CEES Stocklösung IPLM-Perfusionslösung

Nach Herstellung des Natriumhydrogencarbonatpuffers unter ständigem Rühren (Raumtemperatur) wurde die Lösung steril filtriert (0,2 µm) und bei Raumtemperatur gelagert. Vor Beginn der ILPM-Experimente wurde der Natriumhydrogencarbonatpuffer mittels einer Fritte für ca. 30 Minuten mit Carbogen begast. Die Verdünnung der Halb-Lost (CEES) Lösungen wurde auf Grund akuter und chronischer Toxizität des Senfgas Abkömmlings unter dem Abzug mit entsprechender Schutzausrüstung sehr vorsichtig durchgeführt [52, 94]. Unverbrauchte Halb-Lost Lösungen und kontaminierte Verbrauchsmaterialien wurden mit einer gebrauchsfertigen 12 % Natriumhypochlorit Lösung für 24 Stunden entgiftet und gesondert entsorgt.

Puffer und Lösungen für die Nanostring® mRNA-Expressionsanalyse:

Tabelle 20: Puffer und Lösungen für Nanostring®

Puffer/ Lösungen	Konzentration/Menge	Substanz
Mix1 Lysepuffer (4 Wochen haltbar/ Lagerung bei Raumtemperatur)	10 ml 100 µl	RLT Puffer β-Mercaptoethanol
DNaseI Lösung (RNA Isolation)	70 µl 10 µl	RDD Puffer DNaseI
TE Puffer (Hybridisierung)	10 mM 1 mM	Tris pH 8 EDTA
TE-Tween Puffer (Hybridisierung)	5 µl 955 µl	TE Puffer Tween
30x Working Primer Pool A (Hybridisierung)	29 µl 4 µl	TE-Tween Puffer Master Probe Stock A

30x Working Primer Pool B (Hybridisierung)	29 µl 4 µl	TE-Tween Puffer Master Probe Stock B
--	---------------	---

Der TE-Tween Puffer [95] wurde nach Herstellung in 200 µl Aliquots bei minus 20 °C eingefroren. Die Lösung für den DNaseI Verdau sowie die 30x „Working Primer Pool“ Lösungen **A** und **B** wurden für jeden Versuch frisch hergestellt.

Lösungen für die Immunofluoreszenz:

Tabelle 21: Lösungen für die Immunofluoreszenz

Puffer/Lösungen	Konzentration/ Menge	Substanz
Triton X-100/ PBS	100 µl 20 ml	Triton X-100 PBS
„Blocking“ Lösung	800 µl 800 mg 20 ml	Ziegen Serum Bovines Serum Albumin PBS
Waschlösung	500 mg 500 ml	Bovines Serum Albumin PBS
Erstantikörper/Zweitantikörper Inkubationslösung	200 mg 10 ml	Bovines Serum Albumin PBS

Alle Lösungen für die Immunofluoreszenz-Mikroskopie wurden an jedem Versuchstag frisch angesetzt.

Lösungen und Puffer für die Calcium-Einstrom Experimente:

Tabelle 22: Lösungen und Puffer für die Calcium-Einstrom Experimente

Puffer/ Lösungen	Menge	Substanz
FURA-2-AM Stocklösung [5 mM], Lagerung bei -20 °C	1 mg 665,3 µl	FURA-2-AM DMSO
FURA-2-AM Messlösung [1,5 nM]	5 µl 150 µl 15 ml	FURA-2-AM Stocklösung 1 % BSA-Lösung HBSS-Puffer
AITC Stocklösung [1 M]	52,5 µl 447,5 µl	AITC Reinsubstanz DMSO
AITC Lösung [1 mM]	1 µl 999 µl	AITC-Stocklösung [1M] HBSS-Puffer
AITC Messlösung [600 µM]	600 µl 400 µl	AITC-Lösung [1mM] HBSS-Puffer
A-967079 Stocklösung [100 mM], Lagerung 4 °C	5 mg 250 µl	A-967079 Ethanol reinst (> 99,5 %)
A-967079 Messlösung [100 nM]	1 µl 1000 µl	A-967079 Stocklösung HBSS-Puffer

Sämtliche Lösungen, ausgenommen FURA-2-AM und A-967079 Stocklösung, wurden am Versuchstag frisch hergestellt. Außerdem war darauf zu achten, die AITC Lösung in den exakt genannten Schritten zu verdünnen, da es sonst zum Ausfällen der Messlösung kommen konnte.

2.1.10 Enzyme, „Kits“ und Marker

Enzyme, „Kits“ und Marker (allgemein):

Tabelle 23: Enzyme, „Kits“ und Marker (allgemein)

Enzyme, Kits und Marker	Artikelnummer	Hersteller
BCA Assay	23225	Thermo Fisher, Schwerte
DNA GeneRuler 100 bp /1 kb	SM0241 / SM0312	Fermentas, Waltham; USA
Luminata Forte W. HRP Substrat	WBLUF0100	Merck Millipore, Schwalbach
Restriktionsenzyme FD	divers	Fermentas, Waltham; USA
SDS-Gel-Marker	26616, 26625, 26634	Fermentas, Waltham, USA
SuperSignal West Dura	34075	Thermo Fisher, Schwerte
SuperSignal West Pico	34077	Thermo Fisher, Schwerte

„Kits“ für die Isolation muriner und humaner RNA:

Tabelle 24: „Kits“ für die Isolation muriner und humaner RNA

Kits	Artikelnummer	Hersteller
RNA protect® Cell Reagent	1038680	Qiagen, Venlo; Niederlande
RNeasy Mini Kit (50)	74104	Qiagen, Venlo, Niederlande
RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (50)	74804	Qiagen, Venlo, Niederlande
RNase-Free DNase Set (50)	79254	Qiagen, Venlo, Niederlande
RNeasy Lipid Tissue Kit (50)	74804	Qiagen, Venlo, Niederlande
QiaShreddar (Lungengewebe)	79654	Qiagen, Venlo, Niederlande
Precellys Lysing Kit (Lungengewebe)	KT03961-1-015.2	Berlin Instruments, Bretonneux, Frankreich
Precellys Keramik Kit 14/2.8 mm (Spinalganglien)	91-PCS-CKM-99	Berlin Instruments, Bretonneux, Frankreich

„Kits“ für die Nanostring® mRNA-Expressionsanalyse:

Tabelle 25: „Kits“ für die Nanostring® mRNA-Expressionsanalyse

Name des „Kits“	Artikelnummer	Hersteller
nCounter Elements™ XT Reagenz (-80 °C)	-	Nanostring®, Seattle
PrepPack (Raumtemperatur)	LBL-10288-01	Nanostring®, Seattle
Catridge (-20 °C)	LBL-10260-01	Nanostring®, Seattle
Wasch Puffer (4 °C)	LBL-10201-01	Nanostring®, Seattle

2.1.11 Nanostring®Oligionukleotide

Die Sequenz der Gen-spezifischen murinen und humanen Oligionukleotide wurde von der Firma Nanostring® erstellt [96]. „Masterstock Pool“ A [1 µM] und B [5 µM] wurden gebrauchsfertig von der Firma Eurofines geliefert.

2.1.11.1 Murine Oligionukleotide

„Primer Pool“ A murin:

Tabelle 26: Nanostring® „Primer Pool“ A (murin)

Zielstruktur	Sequenz „Primer Pool“ A (murin)	Identifikationsnummer
Beta-Aktin	AAAAGAGCCTCAGGGCATCGGAACCGCTC GTTGCCAATAGTGATGACCTGCCTCAAGA CCTAAGCGACAGCGTGACCTTGTTTCA	NM_007393.1:815_T001
Beta2-Microglobulin	ATTTGGATTTCAATGTGAGGCGGGTGGAA CTGTGTTACGTAGCAGTTCAGCATCCTCTT CTTTTCTTGGTGTGAGAAGATGCTC	NM_009735.3:177_T002
SdHa	GGCATGCAGTATTAACCTGCCTCAGAA AGGCCAAATGCAGCTCGCAAGCACAATTC TGCGGGTTAGCAGGAAGGTTAGGGAAC	NM_023281.1:250_T003
GAPDH	ATCGAAGGTGGAAGAGTGGGAGTTGCTG TTGAAGTCGCAGGAGACAACCTCTGTTGA GATTATTGAGCTTCATCATGACCAGAAG	NM_001001303.1:890_T004
TRPC1	TAACAAAGCTGAGCTGGTTACGCGATTCT TCTAGGAAGTCTTCCAACCTCAAAGACG CCTATCTCCAGTTTGATCGGGAACT	NM_011643.2:1853_T005
TRPC2	TGACCATGACGATGGTAAAGATGCCGTAC ATGGCCCTGCCACGAACTCACGAACCTA ACTCCTCGCTACATTCTATTGTTTTTC	NM_001109897.1:1888_T006
TRPC3	GGAGAAGCTGAGCACCACAGCTATGGCAT AGAGCCCTTCAAGATATGATCTCCAATTTGG TTTTACTCCCCTCGATTATGCGGAGT	NM_019510.2:1977_T007
TRPC4	CTTTGCAGCTTAGCCCCCTTGTTCCTTCATA GTAAAAGTACAGCTGATTTCTTTTCGGGTTA TATCTATCATTTACTTGACACCCT	NM_009428.2:1768_T009
TRPC5	CACATTTCCCATTCTTCCCTTGGACGAGAA CCATTATACTTGACATAGGCCAACAGCCAC TTTTTTTCAAATTTTGCAAGAGCC	NM_009428.2:1768_T009
TRPC6	CTCCACGTCCGCATCATCCTCAATTTCTG GAATGAACCTATTGATCATCGCACCGTGTG GACGGCAACTCAGAGATAACGCATAT	NM_013838.2:2460_T010
TRPC7	GAACCTGTGGTCGTATTTTCAGCACCACCG AGATGACCTCAGACAAGCCAACCTGGAGT TTATGTATTGCCAACGAGTTTGTCTTT	NM_012035.3:2177_T011
TRPA1	AATCCATAGGCACACCATTTTCATGAGTAA GTACTCCCTACACACAGGGTGCAGATAAG GTTGTTATTGTGGAGGATGTTACTACA	NM_177781.4:2130_T012

TRPV1	ACGAGGTAGACGAACATAAACCGACACA GGTCTCTGAGGATCATCTTCTCCTTCCTTC CTGTGTTCCAGCTACAAACTTAGAAAC	NM_001001445.1:1710_T013
TRPV4	GGCCTCGGTAGTAGATGTCTCTGAAGGGC GAGTTGATGAATTCACGCATGCATAAAAT TGGTTTTGCCTTTCAGCAATTCAACTT	NM_022017.3:776_T014
TRPM2	AACGTGGCCTGTTGATCGCTTATAGAGGG ACCGGAGGCTGGTCAAGACTTGCATGAG GACCCGCAAATTCCT	NM_138301.2:2106_T015
TRPM3	AACCAGAACTTCACGATGGGTGCGTTGTA GAACTCATAGATTTTTCGGCCCTTTCGTTG GGACGCTTGAAGCGCAAGTAGAAAAC	NM_001035240.2:2618_T016
TRPM5	CACCATGTCACACTTGTCCAGTTGTCTTC CACATACAGAGTGAATTTCTCCAGCAGAC CTGCAATATCAAAGTTATAAGCGCGT	NM_020277.2:2473_T017
TRPM6	AGCTTTGGCAGTTCATATCCACTCTTTC AGCATTAAAGTCAACAGATGCCTGCCAAT GCACTCGATCTTGTCATTTTTTTGCG	NM_153417.1:384_T018
TRPM7	GGATATGGGACATTTACAGCCTTGGTTTTAT ACTCTAGCATTAAATATGGCACAAACTGGA GAGAGAAGTGAAGACGATTTAACCCA	NM_021450.2:2591_T019
STIM1	GGGAAGAGCAACTAAGACATGCACTGAA GTGGAGAAGATGTGACAGCAGCCGATTG CTGCATTCCGCTCAACGCTTGAGGAAGTA	NM_009287.4:2875_T020
STIM2	TTAGATATAAGCAGACAGTAGACAGCTGC CCTTACGGACATTTCCACTATCTGAGGCTG TTAAAGCTGTAGCAACTCTTCCACGA	NM_001081103.2:2725_T021
ORAI1	CAAAGGGCCAGTGGGAAGGTGAGGACTT AGGCATAGTGGGCTAGGACGCAAATCACT TGAAGAAGTGAAAGCGAG	NM_175423.3:1075_T022
ORAI2	ATGGAAGTGGTACTCGCAGGAGCCCAGC GACCATTTATACAGAGTAAGCCACGCG ATGACGTTCTGCAAGAGTCGCATAATCT	NM_178751.3:2205_T023
ORAI3	ATACAGATAAGCAAGGGCTGATTGCCTTG AGGACAGTTGTGCAGACATGTCATTTGGA ATGATGTGTACTGGGAATAAGACGACG	NM_198424.3:1352_T024

„Primer Pool“ B murin:

Tabelle 27: Nanostring® „Primer Pool“ B (murin)

Zielstruktur	Sequenz „Primer Pool“ B (murin)	Identifikationsnummer
Beta-Aktin	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCATGT AGTTTCATGGATGCCACAGGATTCCATAC CCAAGAAGGAAGGCTGG	NM_007393.1:815_ProbeB
Beta2-Mikroglobulin	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCAGGA CATATCTGACATCTCTACTTTAGGAATTTTT TTCCCGTTCTTCAGC	NM_009735.3:177_ProbeB
SdHA	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCCTCCC TGTGCTGCAACAGTATGTGATCGGGTAGG AAAGAGCTTTGTAA	NM_023281.1:250_ProbeB

GAPDH	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCCAGG AAATGAGCTTGACAAAGTTGTCATTGAGA GCAATGCCAGCCCCGGC	NM_001001303.1:890_ProbeB
TRPC1	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCGTTG TGAGCCACCACTTTGAGGGCAAAGGTTGC CAAGTAAAGGGAATTCA	NM_011643.2:1853_ProbeB
TRPC2	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCCTTCT GGAAGGAGTTGGTGATCATGGCAATAAG CATGTTAAGTAGCACAA	NM_001109897.1:1888_Probe B
TRPC3	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCATCT GCAAGGGCCCAAAGCTCTCGTTTGCAGGG AGGATGTACGCAATCCG	NM_019510.2:1977_ProbeB
TRPC4	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCTGTCT CGAATAACGTGGAAAACGCGTTGTTCTGT TTCTCGACCCGGATGC	NM_016984.3:1834_ProbeB
TRPC5	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCTTAAA ATGTTGGATATTGCGAAGAGTGCTTCTGC AATCAGAGTCGGGTGC	NM_009428.2:1768_ProbeB
TRPC6	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCCTCCC CTCCTCAAAGTAGGAAAACCAATTTGG CCCTTGCAAACCTCCA	NM_013838.2:2460_ProbeB
TRPC7	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCACCA TGGTGACATTATAAACCCCATACAGCACG TAGCCAATATTCTCGAT	NM_012035.3:2177_ProbeB
TRPA1	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCTGGG TATGAGACCAAGACAATAAGATCCTAGGT TCATCATATGGGCTCTG	NM_177781.4:2130_ProbeB
TRPV1	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCTCCCA TCCTCGATCAGTGTCACTACGGCTGTGGA AAATCCAAACAAGAAC	NM_001001445.1:1710_Probe B
TRPV4	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCCACG TAGTGCTTGACGCGCCGTTTCGATGGCAAT GTGCAGGGATGTCT	NM_022017.3:776_ProbeB
TRPM2	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCTGGA TAACGGCCCAAATGAGAAGGTCACGGACT GGGTCAATGGTGAAGGT	NM_138301.2:2106_ProbeB
TRPM3	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCACAC GATGTAGTTGAAGAGCATCAGGTATCCAA TATACGCCAGAGTGTAG	NM_001035240.2:2618_Probe B
TRPM5	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCACCG AGGGCACCACTTCTACAGGTGACTCCCACA ATGAACAGGAAGATGGC	NM_020277.2:2473_ProbeB
TRPM6	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCGCTT GGAGGATATCTTGAAGTTCTGAAGACCCC CATGGACGGAGATCACA	NM_153417.1:384_ProbeB
TRPM7	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCATTGT TTCACTATCCTCCATCGTCATTTGATGAG CATCTTGAGATTGTG	NM_021450.2:2591_ProbeB
STIM1	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCCTGG GACAGCAGAGACAGAAGCTGGACCCCAA AAGTGGAGTGGGAAGTGA	NM_009287.4:2875_ProbeB

STIM2	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCGCTC CGGTGGTGGTATCTGACTTGATGAATTGA TTGCGTAGTCAG	NM_001081103.2:2725_Probe B
ORAI1	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCCCAG GACAAGGTCATGGAGAAGGGCATAAGGC CAAGGCT	NM_175423.3:1075_ProbeB
ORAI2	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCGGAT CCCACGGGCACCAAATCCAGACTCCAAAG AAAAGCTGTTGTAAGAG	NM_178751.3:2205_ProbeB
ORAI3	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCCTGA GGAGCCCTGTAAATCTCTCCAGGATGC CAACTGCAAAGCAGATT	NM_198424.3:1352_ProbeB

2.1.11.2 Humane Oligionukleotide

„Primer Pool“ A human:

Tabelle 28: Nanostring® „Primer Pool“ A (human)

Zielstruktur	Sequenz „Primer Pool“ A (human)	Identifikationsnummer
TRPC1	ACCAAACAGTGTTTCAGGAAGTCTGGCAG TTAGACTGGGAGACAACTCTCCTCAAGA CCTAAGCGACAGCGTGACCTTGTTTCA	NM_003304.4:990_T001
TRPC3	GTGATGCCTTCGAACCTGTCTGAGGCATT GAACACAAGCAGACCCAGGAACATCCTCT TCTTTTCTTGTTGTTGAGAAGATGCTC	NM_001130698.1:1478_T002
TRPC4	TGTCCCATGATTCTCGTGGATTAAGGGCA CTGTACTTTACAAATGCAACACACAATTCT GCGGGTTAGCAGGAAGGTTAGGGAAAC	NM_016179.2:1593_T003
TRPC5	AGTTTAGAATTTGAGGAGCAGATGCTGGA TGCACAGTGAAGAGAGCTGGACTGTTGA GATTATTGAGCTTCATCATGACCAGAAG	NM_012471.2:3685_T004
TRPC6	AGGCATAAAAATCATCTTGCTGGAGTTCA GACTGGCTAGGGCTGGTTGCAAAGACGC CTATCTCCAGTTTGATCGGGAAACT	NM_004621.5:1000_T005
TRPC7	TCACTCTGAAGATTTGTTTTGGGTAGTCTG TGAAGGTTTCGTTTGGCAGGCGAACCTAA CTCCTCGCTACATTCTATTGTTTTT	NM_001167576.1:1118_T006
TRPA1	TGGGTGGCAGCAAATGAATGGCTGTGC ACCTTCCCTTCCCAATTTGGTTTTACTCCCC TCGATTATGCGGAGT	NM_007332.2:970_T007
TRPV1	GCCTCTGCAGGAAATACTGAATCCCTCGG AAAAAGAAGTAGACTCCTCCTTTTCGGG TTATATCTATCATTTACTTGACACCCT	NM_080706.3:1975_T008
TRPV4	GTGAAGAAGAACAGGACCCAGTGAAGA GCGTAATGACCTCGCCAGCCAGCAACAGC CACTTTTTTCCAAATTTGCAAGAGCC	NM_021625.4:1619_T009
TRPM2	ATTCACGTGGTAGCTGTGCCCCGGCTCCT CCGTCTTCTCACCGTGTGGACGGCAACTC AGAGATAACGCATAT	NM_003307.3:3773_T010

TRPM3	CAATCCCCAGGGGCAATACCTATGGTG CATATCTTCTCGAGACTTACCTGGAGTT TATGTATTGCCAACGAGTTTGTCTTT	NM_001007470.1:615_T011
TRPM5	GCGATGAGCAGGTTTCATGAGCAGCACATT GGTGACCAACAGGAAGGCAGATAAGGTT GTTATTGTGGAGGATGTTACTACA	NM_014555.3:2886_T012
TRPM6	AAAGGAGGGTCACCCCATCGAAGGACGA AGCCAGCTGAAAACAGGCCAATCTTCCTT CCTGTGTTCCAGCTACAACTTAGAAAC	NM_017662.4:2989_T013
TRPM7	GGAGGTATTTTCGCCCAGACCTCCGATTAT TTCCACCAAGACTATTATATACATAAAATT GGTTTTGCCTTTCAGCAATTCAACTT	NM_017672.4:1888_T014
Stim1	AACAACTTCAAAGATTAGGCCCTAGCCC CAGTCTGGAGCAAACAGAACCCTGGTCAA GACTTGCATGAGGACCCGCAAATTCCT	NM_003156.3:3100_T015
Stim2	AACAACTTCAAAGATTAGGCCCTAGCCC CAGTCTGGAGCAAACAGAACCCTGGTCAA GACTTGCATGAGGACCCGCAAATTCCT	NM_020860.2:2245_T016
Orai1	TGGACGGCGAAGACGATAAAGATCAGGC CGAAGGGCACCATGATGGTGGTCCAGCA GACCTGCAATATCAAAGTTATAAGCGCGT	NM_032790.3:910_T017
Orai2	AACCGTAAGAGGCGTTTCTACAGGCTGCA GGAAAGTACATACATGCTGGACCTGCCAA TGCACTCGATCTTGTCATTTTTTGCG	NM_001271819.1:2924_T018
Orai3	GCGGTAGAAATGCAGGGCAAAGGCCACA AACACGAGCCCCACGGGCAAAGTGGAGA GAGAAGTGAAGACGATTTAACCCA	NM_152288.2:960_T019
Beta-Aktin	GATCTTGATCTTCATTGTGCTGGGTGCCA GGGCAGTGATCTCCTTCTGCACGATTGCT GCATTCCGCTCAACGCTTGAGGAAGTA	NM_001101.2:1010_T020
Beta2 Mikroglobulin	CACGGAGCGAGACATCTCGCCCCGAATGC TGTCAGCTTCTGAGGCTGTTAAAGCTGTA GCAACTCTCCACGA	NM_004048.2:25_T021
Sdha	TAAACCCTGCCTCAGAAAGGCCAAATGCA GCTCGCAAGCCTGCCTAGGACGCAAATCA CTTGAAGAAGTGAAGCGAG	NM_004168.1:230_T022
GAPDH	AAGTGGTCGTTGAGGGCAATGCCAGCCCC AGCGTCAAAGCCACGCGATGACGTTGTC AAGAGTCGCATAATCT	NM_002046.3:972_T023

„Primer Pool “B human:

Tabelle 29: Nanostring® „Primer Pool“ B (human)

Zielstruktur	Sequenz „Primer Pool“ B (human)	Identifikationsnummer
TRPC1	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCGGTG GGCTTGCCTCGGTAACCCGACATCTGTCC AA	NM_003304.4:990_ProbeB
TRPC3	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCCCTT GAAGATCTGTTGGGATAGTCAGTAACTG TGATATTGGGCAGCGTG	NM_001130698.1:1478_Probe B

TRPC4	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCGATG TTTGCAATAGCAAATAAAGCCTCTGCCACC AGAGTGGGATGCCACA	NM_016179.2:1593_ProbeB
TRPC5	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCAGTC ACAAGCCTCTCCCAAGTTTCAAATACATC CTCTGAGGAGTCTAAA	NM_012471.2:3685_ProbeB
TRPC6	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCCAGA ATGATTGGAGTCACATCATGGGAGAACCG TGCCCATCTTCATCAT	NM_004621.5:1000_ProbeB
TRPC7	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCTAAG ACCCACTTCATAATGAGCATTCTGTCCAG GAGAACTGTGTGGTTT	NM_001167576.1:1118_Probe B
TRPA1	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCCGCT ACCAGAATAGGACGATATCATCAGTTTAA CAATCTCAGTGGCTCCC	NM_007332.2:970_ProbeB
TRPV1	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCGAAA AGCATCTCACTGTAGCTGTCCACAAACAG GGTCTTCATCGACGGCC	NM_080706.3:1975_ProbeB
TRPV4	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCAGAG AGAATTCCTCCAGGGCATTCTTCATGAA CAAGTCTTTGATGTTG	NM_021625.4:1619_ProbeB
TRPM2	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCGGAA GCGCGTGACAGGGCAGTTGGGGTAGAGG AGGTGCCGGGC	NM_003307.3:3773_ProbeB
TRPM3	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCTATG GCCGGACAACATCTCTTCCAATGAGGTCC TCCTGGTTTTCCA	NM_001007470.1:615_ProbeB
TRPM5	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCCGTT GCCCTGCACCACCTGGAACGTGTAGCTGA ACATG	NM_014555.3:2886_ProbeB
TRPM6	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCAGAA CCAGAATATGATGTCTATGCAGTAGATCA GTCTTCCCGCTGTGTGA	NM_017662.4:2989_ProbeB
TRPM7	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCGCCC TATTGCCAAAAGATTCATGACTCTTTCGCA ACTGAGGAGTGCTGCT	NM_017672.4:1888_ProbeB
Stim1	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCCCTG AGTGAGATTAGGATGAGGCTCCTTCTGAC CCACATCAATACCAAAG	NM_003156.3:3100_ProbeB
Stim2	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCCGCG GAGATAATGTTTGGTATATCTCGAGGCTT AAAGGAGGAGACTGTTT	NM_020860.2:2245_ProbeB
Orai1	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCCTGG AACTGTCGGTCAGTCTTATGGCTAACCAG TGAGCGGTAGAAG	NM_032790.3:910_ProbeB
Orai2	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCCACCT CGCCTGGCCGATGTTGATATTCTTTAGCAA AGCGAACACATATTA	NM_001271819.1:2924_Probe B
Orai3	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCTGCTT GTAGCGGTCTGTCTTGTGTGCCACCAAGG A	NM_152288.2:960_ProbeB

Beta-Aktin	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCAGGA TGGAGCCGCCGATCCACACGGAGTACTTG CGCTCAGGAGGAGCAAT	NM_001101.2:1010_ProbeB
Beta2 Mikroglobulin	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCCAGG CCAGAAAGAGAGAGTAGCGCGAGCACAG CTAAGGC	NM_004048.2:25_ProbeB
Sdha	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCTGCA ACAGTGTGTGACCTGGTAGGAAACAGCTT GGTAACACATGCTGTAT	NM_004168.1:230_ProbeB
GAPDH	CGAAAGCCATGACCTCCGATCACTCCCTT GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGTCATACCA GGAAATGAGCTTGACA	NM_002046.3:972_ProbeB

„Primer Pool“ **A** und **B** wurden nach Erhalt der Lieferung in 15 µl Aliquots bei minus 20 °C eingefroren, so dass wiederholtes Auftauen der Oligionukleotide verhindert wurde und eine gleichbleibende Qualität und Effizienz der „Pools“ gewährleistet war.

2.1.12 Mikroskopische Verfahren

Zur Analyse von Zellen, Lungengewebe und auch zur Isolation spezieller Gewebearten wurden diverse Mikroskopie-Verfahren verwendet. Die Messungen wurden analog der Herstelleranweisung der Geräte und der Software durchgeführt. Neben der bekannten Durchlicht-, Fluoreszenz- und Phasenkontrast-Mikroskopie [97] wurden auch neuere mikroskopische Verfahren angewandt. Dazu gehörte zum einen die Laser-Mikrodissektions-Methode für die punktuelle Isolation unterschiedlicher Gewebearten und zum anderen eine stereologische Auswertmethode lichtmikroskopischer Aufnahmen (CAST Technologie) [98].

2.1.13 Auswertung und Statistik

Für die allgemeine Auswertung und Darstellung der experimentellen Daten wurden die klassischen Programme EXCEL, Power Point und Word von Microsoft Office® verwendet. Die Evaluation der Nanostring® mRNA-Expressionsanalyse Daten erfolgte unter Anwendung der nSolver® Software 3.0 [99]. Mit diesem Programm war eine automatische Qualitätskontrolle der generierten Messwerte möglich. Fehlerhafte Messungen, die nicht den Qualitätsansprüchen der Software entsprachen, wurden mit einem Fähnchen („QC-flag“) markiert. Mittels der nSolver® Software 3.0 erfolgte die Subtraktion der Negativkontrollen, die Normalisierung auf ausgewählte Haushaltsgene sowie eine tabellarische Darstellung. Messwerte im isolierten perfundierten Lungenmodell (IPLM) wurden mit der speziellen Software PULMODYN® [100] von Hugo Sachs Elektronik erstellt und zur weiteren Auswertung in Excel importiert. Für die stereologische Auswertung der Lungenschnitte mittels der CAST Methode wurde die „Software“ Visopharm der Firma Olympus benötigt. Die wissenschaftliche Darstellung und statistische

Analyse aller Daten erfolgte mittels GraphPad Prism der Firma GraphPad Software. Mit „D’Agostino, Shapiro- Wilk und Kolmogorow-Smirnow“ wurde auf Normalverteilung der Messwerte getestet. Handelte es sich um eine Normalverteilung, wurde parametrisch getestet. Bei nicht normalverteilten Daten erfolgte die Verwendung von nicht-parametrischen Tests, wie dem „Mann-Whitney-Test oder die Bonferroni Verteilung“. Je nach experimentellem Aufbau und Anzahl der Messgruppen wurde der einfache T-Test oder die Varianzanalyse „Two Way Anova“ angewandt. Fehlerbalken wurden als Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Signifikante Unterschiede (*, **, ***) entsprachen einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.05$, 0,01 und 0,001.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Konfluente Zellen (ca. 80 % dichter Zellrasen) wurden im Verhältnis von 1:10 bis 1:20 auf weitere Zellkulturschalen verteilt. HEK 293T, HEK 293T hTRPA1, MEF und A549 Zellen wurden zweimal in der Woche entsprechend der Konfluenz (ca. 80 % dichter Zellrasen) passagiert. Die Kultivierung und Passagierung von Primärzellen wird in Punkt 2.2.4 erläutert. Für die Kryokonservierung von immortalisierten Zelllinien wurde zunächst Einfriermedium (2x) bestehend aus 20 % DMSO, 40 % FBS im jeweiligen Kulturmedium ad 100 % hergestellt. Die Zellen wurden nach Abzentrifugation in 500 µl frischem Kulturmedium pro Einfrierröhrchen resuspendiert. Nach Bestimmung des Totalvolumens der Zellsuspension wurde das hergestellte Einfriermedium im Verhältnis 1:1 zugegeben. Unter Auf- und Abpipettieren wurde zügig gemischt, im Einfrierröhrchen bei minus 80 °C langsam eingefroren und abschließend in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tank gelagert. Zur weiteren Verwendung wurden die gefrorenen Zellen in den Einfrierröhrchen zügig bei 37 °C aufgetaut, in 10 ml DMEM Medium überführt, für fünf Minuten abzentrifugiert und in Zellkulturschalen mit zugehörigem Medium kultiviert [97].

2.2.2 Generierung einer TRPA1-defizienten Mauslinie

Zur Generierung einer TRPA1-defizienten Mauslinie wurden männliche sog. „geflochte“ Mäuse (B6.129s-Trpa1tm^{2kykw}/J) mit Weibchen (B6.Cg-Tg(Sox2-cre)1Amc/j) gekreuzt [101]. Die Deletion des TRPA1-Exons in allen Geweben wurde von Bettina Braun (Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der LMU, München) durch genomische Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachgewiesen. Anschließend wurde das Resultat auf Protein-Ebene (siehe Abbildung 31) durch „Western Blot“ Analysen bestätigt.

2.2.3 Transfektion des murinen TRPA1 Plasmids in HEK 293T Zellen

HEK 293T Zellen wurden für die Transfektion mit dem murinen TRPA1-Plasmids in 6-Lochplatten ausgesät und nach dem Erreichen einer Zelldichte von 60 % zur Transfektion verwendet. Als Transfektionsreagenz wurde nach Austestung verschiedener Reagenzien Lipofectamin® der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet. Gemäß des Herstellerprotokolls [102] wurde 24 Stunden nach Versuchsbeginn die Transfektionseffizienz mittels eines Fluoreszenz-Mikroskops die GFP-exprimierenden grün fluoreszierenden Zellen quantifiziert. Die Zellen wurden dreimal in kaltem PBS Puffer gewaschen, mit einem sterilen Zellschaber in 200 µl eisgekühlten PBS abgekratzt und nach Zentrifugation für „Western Blot“ Analysen bei minus 80 °C gelagert.

2.2.4 Präparation und Isolierung primärer muriner Lungenzellen

2.2.4.1 Alveoläre Epithelzellen TypII (ATII) und TypI (ATI)

Die Präparation und Isolation alveolärer Epithelzellen TypII erfolgte nach dem Protokoll der Arbeitsgruppe Königshoff [103-105]. Es wurden je fünf Mäuse pro Genotyp im Alter von vier bis fünf Monaten verwendet.

Vorbereitungen am Vortag der Präparation:

- Benetzen der Zellkulturplatten des Typs Falcon® mit 10 ml DMEM und jeweils 15 µl Antikörperlösung (CD16/CD32 und CD45)
- Dichtes Verschließen der Platten mit Parafilm
- Lagerung der Platten über Nacht bei 4 °C

Vorbereitungen am Tag der Präparation:

- Herstellung von Minus- und Plusmedium (siehe Tabelle 8) zu gleichen Teilen
- Steril-Filtration von Minus- und Plusmedium
- Herstellung der 1 % Agarose Lösung unter Erhitzen (siehe Tabelle 8)
- Aufbewahrung der Agaroselösung im 37 °C warmen Wasserbad
- Auftauen der Dispaselösung und Vorlegen von 1 ml pro Lunge in 50 ml Reagenzgefäßen bei Raumtemperatur

Präparation und Isolation der murinen Lungen:

- Verwendung von Wild-Typ oder TRPA1-defizienten Mäusen
- Anästhesie mit 300 µl Narkose Lösung bestehend aus Ketamin (100 mg/ml), Xylazin (Rompun®, 125 mg/ml) und Heparin (500 i.E./ml)
- Testung der Reflexe

- Öffnung des Brustkorbs, Entfernen des Diaphragmas und Einschneiden der *Vena cava*
- Tracheale Ligation und halbseitiger Einschnitt in die Trachea
- Einführung einer abgestumpften Kanüle über die Trachea und Fixierung durch Ligationsschlingen
- Vorsichtiges Entfernen des Thymus
- Perfusion des kleinen Lungenkreislaufs über die Pulmonalarterie (20 ml, 0,9 % Kochsalzlösung)
- Tracheale Infiltration von 1,5 ml Dispase-Lösung
- Tracheale Applikation von ca. 300 µl Agarose-Lösung (37 °C)
- Herausziehen der trachealen Kanüle und Ziehen des Ligationsschlingens
- Vorsichtiges Abschneiden des Herzens
- Herausschneiden und Lösen der intakten Lunge
- Inkubation der infiltrierten Lungen in 1ml Dispase-Lösung (45 Min. bei Raumtemperatur)

Isolation der alveolären Epithelzellen TypII (Zellkultur):

- Vorlegen von 5 ml Plusmedium in Zellkulturschale
- Zerkleinerung einzelner Lungenflügel mit zwei Pinzetten
- Sammeln der Zellsuspension in einem 50 ml Reagenzgefäß
- Wiederholen des Vorgangs mit allen Lungen gleichen Genotyps
- Filtration der Zellsuspension durch 100 µM, 20 µM und 10 µM Nylon Filter
- Sammeln des Filtrats in steriler Glasflasche
- Aufteilen der Suspension auf 50 ml Reagenzgefäß
- Zentrifugation für 10 Min., bei 15 °C und 200 Umdrehungen pro Minute
- Absaugen der Zellkulturplatten mit Antikörperlösung
- Waschen der Platten mit 5 ml Minus-Medium
- Absaugen des Überstandes nach dem Zentrifugationsschritt
- Resuspendieren der Zellen unter Zugabe von 1 ml Minus-Medium
- Auffüllen des Volumens auf 5 ml pro Versuchstier
- 5 ml Zellsuspension auf vorinkubierte Platten verteilen (Negativselektion von Immun- und Blutzellen)
- Inkubation für 30 Min. bei 37 °C
- Spülen der Platten mit Zellsuspension (5x)
- Wiederholung mit 5 ml Minus-Medium
- Abnehmen und Vereinigen der Suspension
- Verteilung der Suspension auf native Platten (Negativselektion Fibroblasten)
- Inkubation für 25 Min. bei 37 °C
- Spülen der Platten mit Zellsuspension (5x)

- Vereinigen der Suspension
- Nachspülen der Platten mit 5 ml Minusmedium
- Zentrifugation für 10 Min., bei 15 °C und 200 Umdrehungen pro Minute
- Herstellen des ATII Mediums (siehe Tabelle 8)
- Absaugen des Mediums
- Zellen maximal in 3 ml ATII Medium resuspendieren

Kultivierung von alveolären Epithelzellen TypII:

Die Anzahl an ATII Zellen wurde mittels Neubauer Kammer bestimmt. Alveoläre Epithelzellen TypII wurden an Hand der Größe und Morphologie im Vergleich zu den anderen Zellen der Suspension im Phasen-Kontrast Modus identifiziert, so dass die Gesamtzahl der isolierten ATII Zellen sehr gut berechnet werden konnte und ein gleichmäßiges Aufteilen der Zellen möglich war. Am ersten Tag nach der Präparation erfolgte ein Mediumwechsel mit ATII Medium, um den Reinheitsgrad der Zellen zu optimieren. Zwei bis drei Tage nach Isolation waren die ersten Zellverbände („Cluster“) gut sichtbar. Alle Versuche mit alveolären Epithelzellen TypII wurden am dritten und vierten Tag durchgeführt.

Ausdifferenzierung von alveolären Epithelzellen TypII (ATII) zu TypI (ATI oder „ATII-ATI like“):

Unter physiologischen Bedingungen im Inkubator differenzierten sieben Tage nach Präparation alveoläre Epithelzellen TypII zu alveolären Epithelzellen TypI (ATI oder „ATII-ATI like“) in 6-Lochplatten auf Plastikmaterial aus [106]. Eine Unterscheidung beider Zelltypen erfolgte durch Identifizierung spezifischer Zellmarker(siehe Punkt 2.2.8). Abbildung 17 zeigt zusammenfassend die Präparation und Isolation alveolärer Epithelzellen TypII.

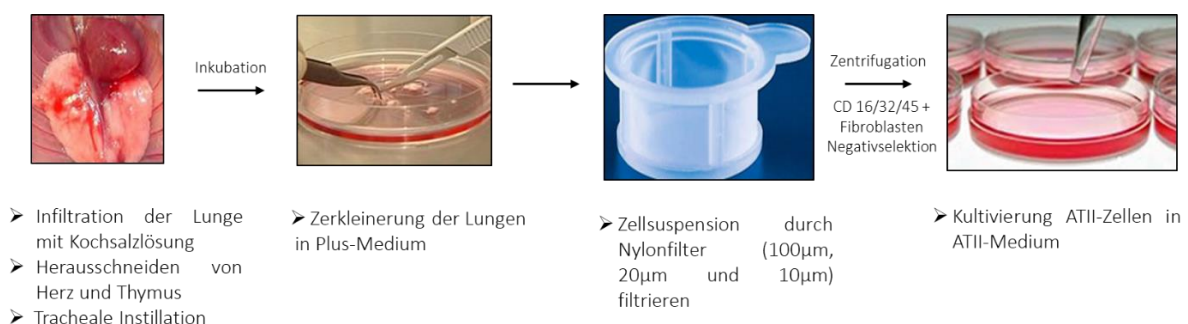


Abbildung 17: Präparation und Isolation alveolärer-epithelialer Zellen TypII

Die Zellsuspension wurde unter Verwendung von mit Antikörpern beschichteter Zellkulturplatten von Zellen des Immun- und blutbildenden Systems mit den Oberflächenmerkmalen CD16, CD32 und CD45 durch Negativselektion aufgereinigt. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit kalter PBS-Lösung gespült und in ca. 300 µl sog. „Cell protect reagent“ Puffer resuspendiert. Nach dem Einfrieren in

flüssigem Stickstoff wurden die Zellen bei minus 80 °C für Nanostring® Versuche gelagert. Alveoläre Epithelzellen TypI und TypII wurden je nach Versuchsaufbau für mRNA-Expressionsanalysen, Calcium-Einstrom-Experimente oder für die Immunofluoreszenz verwendet. Eine Passagierung und Kryokonservierung dieser Zellen war nach mehrmaliger Austestung nicht möglich, so dass die Zellen frisch isoliert werden mussten.

2.2.4.2 Tracheale (tEpC) und bronchiale Epithelzellen (bEpC)

Die Präparation primärer trachealer und bronchialer Epithelzellen erfolgte durch eine Optimierung des bereits etablierten Protokolls für tracheale Epithelzellen [107]. Pro Isolation wurden vier bis fünf Versuchstiere mit einem Alter von drei bis vier Monate verwendet.

Vorbereitungen am Tag der Präparation:

- Versetzen der 6-Lochplatten mit Glasplättchen
- Auftauen der 1 ml Collagenlösung
- Benetzung der Glasplättchen mit Collagenlösung und Trocknung unter der Sterilbank für ein bis zwei Stunden
- Herstellung der Lösung für den Verdau des Gewebes (siehe Tabelle 11) und Aufbewahrung bei 37 °C im Wasserbad
- HBSS ohne Ca^{2+} , Mg^{2+} auf Eis stellen

Präparation trachealer und bronchialer Epithelzellen:

- Verwendung von Wild-Typ oder TRPA1-defizienten Mäuse
- Anästhesie mit 300 µl Narkose Lösung bestehend aus Ketamin (100 mg/ml), Xylazin (Rompun®, 125 mg/ml) und Heparin (500 i.E./ml)
- Testung der Reflexe zur Überprüfung der Anästhesie
- Öffnung des Thorax, Entfernen des Diaphragmas und Einschneiden der *Vena cava*
- Vorsichtiges Entfernen des Thymus
- Freilegen von Trachea und primäre Bronchien
- Vorsichtiges Herausschneiden des primären Bronchus und der Trachea unter dem Binokular
- Säuberung von Bronchien und Tracheen
- Separates Aufbewahren der Tracheen und der primären Bronchien in eisgekühlten HBBS Puffer ohne Calcium und Magnesium

Die Herstellung der Lösung für den Verdau sowie die anschließende Aufbewahrung von Tracheen und Bronchien in Calcium und Magnesium freier HBSS Lösung war essentiell, da es sonst zur Inaktivierung der beiden Enzyme von DNaseI und Pronase gekommen wäre.

Isolation primärer trachealer und bronchialer Epithelzellen:

- Überführung von Tracheen und Bronchien in jeweils 10 ml der 37 °C warmen Lösung zum Verdau des Gewebes (siehe Tabelle 11)
- Inkubation für 40 Min. bei 37 °C
- Anschließende Zugabe von 10 ml DMEM/FCS Lösung zum Abstoppen der Enzymaktivität
- Zentrifugation für 5 Min., 12000 x g
- Absaugen des Mediums
- Benetzen der vorinkubierten 6-Lochplatten mit jeweils 1 ml PASMCMedium (37 °C)
- Überführen einer Trachea oder zwei primären Bronchien jeweils pro Loch
- Zerkleinern und Ausstreichen der Gewebestücke mit zwei Pinzetten
- Zugabe von 1 ml PASMCMedium am ersten, dritten und sechsten Tag nach der Präparation
- Zellen zur Ausdifferenzierung sieben Tage im Inkubator lassen

Die trachealen und bronchialen Epithelzellen wurden für mRNA-Expressionsanalysen, Ca²⁺-Einstrom - Experimente und Immunofluoreszenz verwendet. Eine Passagierung und Kryokonservierung dieser Primärzellen war nicht möglich.

2.2.4.3 Endothelzellen (EC)

Für die Isolierung primärer Endothelzellen aus der murinen Lunge wurde das Protokoll unserer Arbeitsgruppe verwendet [45]. Die Zusammensetzung sämtlicher Lösungen der Zellisolation sind in Tabelle 9 gelistet.

Vorbereitung:

- 2 % Gelatine Lösung im 37 °C warmen Wasserbad erwärmen
- Herstellung von DispaseLösung und HBSS mit Ca²⁺, Mg²⁺ mit 0,5 % BSA
- DispaseLösung, HBSS + 0,5 % BSA, Endothel- und -Stop-Medium auf 37 °C temperieren
- 40 ml HBSS mit Ca²⁺, Mg²⁺ auf Eis stellen
- Vorbereitung: Zellsiebe (40 und 70 µM), Scheren, Spatel, 20 ml Spritze, 14 G Kanüle, Dynalbeads und notwendiger Antikörper (siehe Tabelle 30)

Tabelle 30: Material für die Endothel Selektion

Produkt	Artikelnummer	Firma
„Dynalbeads“ Suspension	M 450	Thermo Fisher, Darmstadt
„Sheep anti-rat“ IgG	110.07	Thermo Fisher, Darmstadt
„Rat anti-mouse“ (VE-Cadherin-Antikörper)	CD144	Invitrogen, Carlsbad, USA

Beschichten der „Dynalbeads“:

Das Beschichten der „Dynalbeads“ musste für jede Zellisolation während der Inkubation des Gewebes neu erfolgen. Die beschichteten „Dynalbeads“ sollten spätestens nach einer Stunde verwendet werden. Pro Genotyp wurden jeweils sechs Mäuse im Alter von drei bis vier Monaten verwendet.

- 6 µl „Dynalbeads“-Suspension pro Lunge werden in 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt (30 µl gesamt)
- Anlegen des Gefäßes an den „Dynal“-Magneten und Absaugen der Flüssigkeit
- Viermaliges Waschen mit HBSS 0,5 % BSA (37 °C) und jeweils 1 Minute stehen lassen
- Resuspendierung der „Dynalbeads“ in 500 µl HBSS 0,5 % BSA
- Hinzugabe von 5 µl CD144 Antikörper Lösung
- Inkubation von einer Stunde bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler
- Viermaliges Waschen mit HBSS 0,5 % BSA (37 °C) und jeweils 1 Minute stehen lassen
- Resuspendierung der „Dynalbeads“ im Ausgangsvolumen

Präparation:

- Mäuse durch zervikaler Dislokation töten
- Entnahme der Lungenflügel und Lagerung in eiskalter HBSS Lösung
- Zerkleinerung mit 3-Scheren Methode
- Gewebestücke durch 40 µm Zellsieb filtrieren
- Überführen des Gewebes in Dispaselösung
- Inkubation für 45 Min. in Brutschrankschüttler bei 350 Umdrehungen pro Minute
- Zerkleinerung des Gewebes durch 14 G Kanüle und anschließend durch eine 18 G Kanüle (20 ml Spritze)
- Filtration durch 70 µm Sieb mit Medium zum Abstoppen des Verdaus (15 ml Gefäß)
- Zentrifugation 5 Min. bei 400 x g
- Absaugen des Überstandes
- Resuspendieren der Zellen in Restflüssigkeit
- Auffüllen auf 1 ml mit HBSS mit Ca²⁺, Mg²⁺ und 0,5 % BSA
- Überführen in Eppendorf Gefäß mit beschichteten „Dynalbeads“

- Rotation für 30 Min. bei Raumtemperatur
- Zweimaliges Beschichten der 35 cm Zellkulturschale mit 2 % Gelatinelösung
- Absaugen des Überstands und 30 Min. trocknen lassen
- Verteilen der Zellsuspension auf vier Eppendorf Gefäße
- Fünfmaliges mit 1 ml HBSS mit Ca^{2+} , Mg^{2+} und 0,5% BSA waschen (1 Min. warten)
- Resuspendierung der Zellen in je 1 ml Endothelzell Medium und Suspension vereinigen
- Aussaat der Zellsuspension auf zwei beschichtete 35 mm Zellkulturschalen

Nach drei Tagen im Inkubator erfolgte die Nachselektion der Endothelzellen wie folgt:

- Erwärmen von HBSS mit 0,5 % BSA, Endothelzell-Medium, Stop-Medium, Trypsin, PBS, 2 % Gelatine Lösung bei 37 °C (siehe Tabelle 9)
- Zwei 10 cm Zellkulturschale mit 2 % Gelatinelösung beschichten,
- Absaugen des Überstands und 30 Min. trocknen lassen
- Herstellung von 30 ml HBSS mit Calcium, Magnesium und 0,5 % BSA
- Beschichten der „DynaBeads“ (siehe oben)
- Absaugen des Mediums von den Endothelzellen
- Trypsinieren und Zentrifugation der Zellsuspension
- Pellet in 1 ml HBSS mit Ca^{2+} , Mg^{2+} und 0,5 % BSA resuspendieren
- Zugabe der Zellsuspension zu den „DynaBeads“
- Inkubation für 30 Min. in Über-Kopf-Schüttler
- Verteilen der Zellsuspension auf 2 Eppendorf Gefäße und an „Dyna“ Magneten anlegen
- Fünfmaliges Waschen mit HBSS mit Ca^{2+} , Mg^{2+} und 0,5% BSA Lösung
- Aussäen der Zellen auf beschichtete 10 mm Schale

Konfluente Endothelzellen (mit einem Zellrasen von 80-90 %) der ersten Passage wurden wiederholt in einem Verhältnis von 1 zu 2 gesplittet. Passage Zwei dieser Zellen wurde mit einer Konfluenz von mindestens 80 % dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 150 µl „Cell protect reagent“ für mRNA-Expressionsanalysen resuspendiert (siehe Abbildung 39) und nach dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.4.4 Fibroblasten (pmLF)

Die Methode der Isolation primärer muriner Fibroblasten (pmLF) wurde von Katharina Hofmann aus unserer Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit der AG von Melanie Königshoff analog zum Protokoll zur Isolation humaner primärer Fibroblasten etabliert [108]. Die Durchführung der Präparation erfolgte nach standardisierten Protokoll [49].

2.2.4.5 Präkapilläre glatte Muskelzellen (PASMC)

Die Isolation präkapillärer arterieller glatter Muskelzellen (PASMC) aus der Maus wurde von unserer Arbeitsgruppe nach einem publizierten Protokoll für die Ratte etabliert [109]. Nach Kultivierung der glatten Muskelzellen unter physiologischen Bedingungen wurden die Zellen vier bis fünf Tage nach Isolation dreimal mit kaltem PBS gewaschen und mit einem Volumen von 200 µl PBS Puffer abgelöst [44]. Die Proben sind als Zellpellet, nach Schockfrostung in flüssigem Stickstoff bei minus 80 °C, bis zum weiteren Gebrauch gelagert worden.

2.2.5 „Non-contact Laser Capture Microdissection“ zur Isolierung von Lungengeweben

2.2.5.1 Prinzip der Laser-Mikrodissektion

Die Laser-Mikrodissektion ist eine Methode, um spezifische Zellen aus Gewebeproben oder Zellkulturen zu trennen und zu sammeln. Mit dem PALM MicroBeam Mikroskop der Firma Karl Zeiss können mit einem fokussierten Laserstrahl Zellen und Zellverbände aus einem Gewebe isoliert werden. Die Energie des Lasers wird durch das Objektiv so stark gebündelt, dass mit sehr hoher Genauigkeit und Sensitivität spezielle Gewebeschichten erfasst werden können, was das Arbeiten im Mikrometer (µM) Bereich ermöglicht. Durch das patentierte Laser-Katapult-Verfahren ist ein schnelles und kontaminationsfreies Arbeiten möglich. Damit eignet sich die Laser-Mikrodissektion als eine sehr effektive und genaue Methode zur Isolierung spezifischer Zellverbände [110].

2.2.5.2 Isolierung von humanen Epithel- und Endothelzellen mittels der Laser-Mikrodissektion

Für die Isolierung spezifischer Zellen aus Gewebeschichten wurde primäres, humanes Lungengewebe der Firma Cultex® (Hannover) verwendet. Die Laser-Mikrodissektion erfolgte in Kooperation mit Dirk Steinritz an der Sportuniversität Köln. Das kryokonservierte Gewebe wurde mittels eines Lasermikrotoms in 3 µM dünne Scheiben geschnitten. Nach dem Herauswaschen des „Freezing“-Mediums mit eiskaltem, pyrogenfreien destilliertem Wasser, dem Schneiden des Gewebes und anschließender Fixierung mit 70 % Ethanol erfolgte das Anfärben durch eine gebrauchsfertige Hämatoxylin-Lösung, um so die Gewebeschichten in Epithel-, Endothel- und Knorpelgewebe differenzieren zu können. Wurde das Einfriermedium nicht eliminiert, konnte es zu einer Effizienzminderung des Lasers kommen, so dass eine effektive und sensitive Isolation des Gewebes erschwert würde [111]. Die unterschiedlichen Gewebeschichten wurden mit spezifischer Software (PALMRobo Software und Zen Imaging System) von Zeiss Mikroskopie separat markiert und Zellverbände durch den gebündelten Laser herausgeschnitten. Anschließend wurden die Proben automatisch in ein adhäsives Auffangbehältnis, befüllt mit 50 µl reiner PBS Lösung, katapultiert. Die Proben wurden direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

2.2.5.3 Hämatoxylin Färbung

Folgendes Protokoll wurde entsprechend den Angaben des Herstellers Sigma Aldrich zur Färbung der Lungenschnitte mit gebrauchsfertiger Hämatoxylin Lösung durchgeführt.

- Herauswaschen des Einfriermediums mit destilliertem Wasser (5-6mal)
- Fixierung mit 70 % Ethanol für 5 Sek.
- Eintauchen in Hämatoxylin-Lösung für 30 Sek.
- Rückstände abtropfen lassen
- Waschen in destilliertem Wasser
- Eintauchen in 70 % Ethanol (3-5 mal)
- Eintauchen in 100 % Ethanol
- Lufttrocknung für 1-2 Min.

2.2.6 Nanostring® mRNA-Expressionsanalyse

2.2.6.1 Prinzip der Nanostring® mRNA-Expressionsanalyse

Die Nanostring® mRNA-Expressionsanalyse ist eine direkte Methode zur Quantifizierung von nativer mRNA ohne vorgeschaltete Erststrangsynthese, während es sich bei der quantitativen Echtzeit Polymerase-Ketten-Reaktion „qPCR“ um eine indirekte Methode mit vorgeschalteter Erststrangsynthese handelt. Das Prinzip der Nanostring® Technologie basiert auf einer Farbcodierung von Oligonukleotiden („Primer“), die an ausgewählte mRNAs binden, so dass eine Quantifizierung der mRNA-Expression möglich ist. Die Hybridisierungsreaktion erfolgt zwischen der einsträngigen mRNA im Hybridisierungspuffer und dem sog. „Multiplex Pool“, bestehend aus „Primer Pool“ **A** („Capture Probes“) und **B** („Reporter Probes“) [112]. An die Oligonukleotide des „Primer Pool“ **A** ist Streptavidin gekoppelt. Durch eine Streptavidin-Biotin Reaktion zwischen RNA-Primer Komplex und Messzelle innerhalb der „nCounter® Prep Station“ wird eine Fixierung des Hybridisierungsprodukts ermöglicht, die essentiell für die Auswertung ist. „Primer Pool“ **B** ist an die Farbcodierung gekoppelt, die den entsprechenden mRNAs zugeordnet werden kann, so dass eine direkte Quantifizierung der mRNA-Expression möglich ist. Abbildung 18 zeigt das Nanostring® Prinzip:

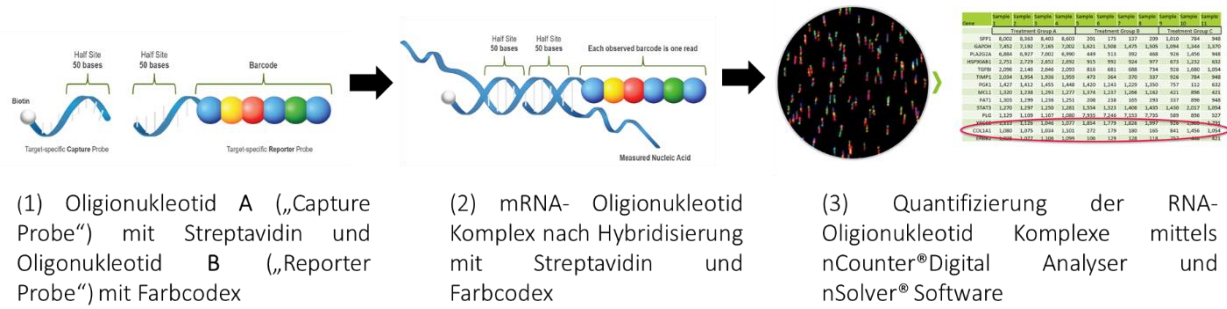


Abbildung 18: Nanostring® Prinzip [113]

2.2.6.2 Isolation von humaner und muriner mRNA

2.2.6.2.1 Isolation von humaner und muriner mRNA aus Zelllinien und Primärzellen

Die Isolation muriner und humaner mRNA aus Zelllinien und Primärzellen erfolgte mit Hilfe des sog. „RNeasy® Mini Kits“ der Firma Qiagen® entsprechend des dazu gehörigen Protokolls [114]. Zusätzlich wurde ein DNaseI Verdau, wie vom Hersteller empfohlen, durchgeführt. Sämtliche notwendigen Puffer und Lösungen werden in Tabelle 20 beschrieben.

Vorbereitungen:

- Herstellung von Mix1 und DNaseI Mix (siehe Tabelle 24)
- Zugabe von 600 µl Mix1 zu den Zellen (max. 10^7 Zellen)
- Zugabe von 600 µl reinen Ethanol und durchmischen
- Transfer von 700 µl auf eine sog. „RNeasy Mini Spin“ Säule
- Zentrifugation 15 Sek. bei 8000 x g
- Eluat verwerfen

DNaseI Verdau:

- Zugabe von 350 µl **RW1** Puffer
- Zentrifugation 15 Sek. bei 8000 x g
- Eluat verwerfen
- Zugabe von 80 µl DNaseI Mix auf Säule
- Inkubation für 15 Min. bei Raumtemperatur
- Zugabe von 350 µl **RW1** Puffer
- Zentrifugation 15 Sek. bei 8000 x g
- Eluat verwerfen

RNA Aufreinigung und Elution:

- Zugabe von 500 µl **RPE** Puffer
- Zentrifugation 15 Sek. 8000 x g
- Eluat verwerfen
- Zugabe von 500 µl **RPE** Puffer
- Zentrifugation 2 Min. bei 8000 x g
- Verwendung eines neuen Sammelgefäßes
- Zentrifugation 1 Min. bei 14000 x g
- Überführen der Säule in ein RNase-freies Eppendorf Gefäß (1,5 ml)
- Zugabe von 30 bis 50 µl RNase-freies Wasser
- Zentrifugation 1 Min. bei 8000 x g
- Lagerung des Eluats bei minus 80 °C

2.2.6.2.2 Qualitätskontrolle der RNA für die Nanostring® mRNA-Expressionsanalyse

Nach Extraktion der RNA wurde die Konzentration und Reinheit mittels des Nanodrop® Photometers kontrolliert. Anschließend wurde die RNA mit RNase-freiem Wasser auf 100 ng/µl normiert, so dass ein einfaches Pipettieren vor dem Hybridisierungsschritt gewährleistet war. Tabelle 31 zeigt die Reinheitsanforderungen der zu verwendenden RNA. Entsprechend der geforderten Qualität, wurde diese nicht verwendet und verworfen. Eine zu geringe RNA-Konzentration führte zu fehlerhaften Messwerten, die in der nSolver® Analysesoftware dementsprechend markiert („QC flag“) wurden und nicht in die Evaluation flossen.

Tabelle 31: Qualitätsanforderung der RNA für Nanostring® mRNA-Expressionsanalyse

Ratio Absorption [nm]	Intervall	Mögliche Verunreinigungen
260nm/280nm	1,8-2,0	Protein, Phenole
260nm/230nm	1,7-2,0	Genomische DNA

2.2.6.2.3 Isolation von mRNA aus murinen dorsalen Spinalganglien

Für die Isolation von mRNA aus murinen dorsalen Spinalganglien („dorsal root ganglia“, DRG) wurden drei Monate alte Wildtyp Mäuse nach Isofluran Anästhesie durch zervikale Dislokation getötet und anschließend die Nerven nach einem publizierten Protokoll präpariert [115]. Während der Präparation wurden die Ganglien in RNA „Protect cell reagent“ Puffer auf Eis gelagert. Die Lagerung des neuronalen Gewebes erfolgte bis zum Tag der RNA Aufreinigung bei minus 80 °C. Durch den hohen Lipidanteil der Ganglien nach Gewebezerkleinerung waren die Säulchen des klassischen „RNeasy® Mini Kits“ nicht

geeignet, so dass zur Aufreinigung der neuronalen mRNA der „RNeasy® Lipid Mini Kit“ verwendet wurde. Im Folgenden wird die Vorgehensweise aufgezeigt:

- Zugabe von 1 ml „QIAzol Lysis Reagent“ zum „Precellys Keramik Kit 1.4/2.8mm“
- Überführen der Ganglien in „Lysis Reagent“
- Zerkleinern der Proben mit „Precellys®24 Homogenisator“ (2x 30 Sek. und 6000 Umdrehungen pro Minute)
- Überführen des Homogenats in neues RNase-freies Eppendorf Gefäß
- Inkubation für 5 Min. bei Raumtemperatur
- Zugabe von 200 µl Chloroform
- Konvertieren für 15 Sek.
- Zentrifugation für 15 Min. bei 12000 x g und 4 °C

Nach erfolgter Zentrifugation zeigte sich eine Auftrennung des Lösungsmittelgemisches in drei Phasen: eine rote Phase (organische Bestandteile), eine weiße Interphase und eine obere transparente Phase (hydrophile Phase). In letztgenannter befand sich die gelöste RNA. Die transparente Phase (≥ 600 µl) wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues RNase-freies Eppendorf Gefäß überführt [114].

- Zugabe zu gleichen Teilen reinen Ethanol (1:1) und mischen
- Transfer von maximal 700 µl auf eine „RNeasy® Mini Spin“ Säule
- Zentrifugation 15 Sek. bei 8000 x g
- Eluat verwerfen

Anschließend wurde ein DNaseI Verdau durchgeführt. Entsprechend des Protokolls „Isolation von RNA aus Zelllinien“ (siehe Punkt 2.2.6.2.1) wurde die Aufreinigung und Elution der neuronalen RNA durchgeführt.

2.2.6.2.4 Isolation von mRNA aus Lungengewebe

Zu Beginn der Isolation des primären humanen und murinen Lungengewebes wurde zunächst 20 mg Gewebe mit der Feinwaage abgewogen und in ein mit Lysepuffer (Mix1) gefülltes „Precellys Lysing Kit“ (Nr. KT03961-1-015.2) überführt. Das Gewebe wurde anschließend zweimal 20 Sekunden bei 6000 Umdrehungen pro Minute mit dem „Precellys® 24 Dual“ homogenisiert. Danach wurde das Homogenat zügig in einen „QiaShredder™“ überführt und bei maximaler Umdrehung für vier Minuten zentrifugiert [114], so dass eine komplette Homogenisierung des elastischen Gewebes und die komplette Freisetzung der RNA gewährleistet war. Nach diesem Schritt wurde dem Protokoll zur Isolation von RNA aus Zelllinien und Primärzellen (siehe Punkt 2.2.6.2.1) gefolgt.

2.2.6.3 Hybridisierungsreaktion

Die Hybridisierungsreaktion wurde am Vortag des Aufreinigungsschritts in der „Nanostring® nCounter Prep Station“ durchgeführt, da das Binden der Oligonukleotide im sog. „Annealingprogramm“ inklusive Abkühlungsschritt mindestens siebzehn Stunden beanspruchte. Anschließend wurde das Hybridisierungsprodukt bis zum weiteren Gebrauch vor Licht geschützt im Kühlschrank gelagert. Während des gesamten Pipettiervorgangs wurde bei Raumtemperatur gearbeitet und gleichzeitig darauf geachtet, dass der mRNA-Oligonukleotid Mix vor Beginn der Hybridisierung durch sehr vorsichtiges Auf- und Abpipettieren homogen vermischt und zuletzt für etwa zwei Sekunden vorsichtig abzentrifugiert wurde. Vor Beginn des Pipettierens wurde der PCR Block zunächst auf 67 °C vorgeheizt, um eine optimale Hybridisierung der komplementären Nukleinsäuren zu gewährleisten. Eine genaue Temperatureinstellung des PCR-Blocks musste vor Beginn der Hybridisierung vorgenommen werden.

Das Hybridisierungsprogramm setzt sich wie folgt zusammen:

Tabelle 32: Nanostring® Hybridisierungsprogramm

Vorgang	Temperatur/ Zeit
Vorheizen (Block 67 °C/Deckel 70 °C)	67°C
„Annealing“	67 °C/16 Stunden
Abkühlung	4 °C

Folgendes Pipettierschema bei Raumtemperatur wurde strikt eingehalten:

- 30x „Working Probe Pool“ herstellen (siehe Tabelle 20)
- „TaqSet“ auftauen (Raumtemperatur)
- **70 µl** Hybridisierungspuffer in „TaqSet“ pipettieren
- **7 µl** 30x „Working Probe Pool“ **A** hinzugeben
- **7 µl** 30x „Working Probe Pool“ **B** hinzugeben
- Dreimal vorsichtig Auf- und Abpipettieren (nicht vortexen)
- 12-Lochgefäß beschriften
- Zugabe von **8 µl** Mastermix in jedes Reaktionsgefäß
- 200 ng native mRNA in **maximal 7 µl** Gesamtvolumen
- Gesamtvolumen mit RNase-freiem Wasser auf 15 µl auffüllen
- Zentrifugation der Proben für 1 Sek.
- Beginn der Hybridisierung bei 67 °C für 16 Stunden
- Abkühlung auf 4 °C
- Lagerung im Kühlschrank

Zusammensetzung der 30x „Working solution“ nach Herstellerangaben [112]:

Tabelle 33: Herstellung von 30x „Working solution“

Reaktionen	Master Probe Stock (µl)	TE-Tween (µl)	Finales Volumen (µl)
12	4	29	33
24	4	29	33

Pro Durchgang wurden zwölf Reaktionen innerhalb einer Messzelle („Catrige“) vermessen. Das Endvolumen der 30x „Working Solution“ entsprach der jeweiligen Probenanzahl. Für diese Messungen wurden stets 33 µl Gesamtvolumen der 30x „Working solution“ am Tag der Hybridisierung frisch hergestellt. Ist es innerhalb des „Digital Analysers“ zu technischen Problemen gekommen, war eine Lagerung der Messzelle bis zu 24 Stunden im Kühlschrank möglich. Eine Zwischenlagerung der Mastermix-mRNA Lösung ist vor und nach der Hybridisierung nicht möglich.

2.2.6.4 Aufreinigung und Immobilisierung der RNA mittels nCounter® Prep Station

Nach der Hybridisierung wurden die mRNA-Oligonukleotid Komplexe auf Eis gelagert und an das Institut für Pathologie der LMU München transportiert. Hier erfolgten die weiteren Schritte der Nanostring® mRNA-Expressionsanalyse. Folgende Verbrauchsmaterialien waren für den Aufreinigungs- und Immobilisierungsschritt innerhalb der „nCounter® Prep“ Station notwendig: Waschpuffer Platten (2x), „Prep Pack“ für 12 Reaktionen, Messzelle („Catrige“). Die Waschpuffer-Platten wurden vor Beginn des Messprogramms für zwei Minuten bei 12000 Umdrehungen pro Minute und die Hybridisierungskomplexe im 12-Lochgefäß für maximal zwei Sekunden zentrifugiert. Nach dem Auftauen der „Catrige“ bei Raumtemperatur wurde die „nCounter® Prep“ Station mit den notwendigen Verbrauchsmaterialien und der zu analysierenden RNA befüllt. Nach automatischer Testung der einwandfreien Funktionsweise der „Prep“ Station wurde mit dem Immobilisierungs- und Aufreinigungsschritt begonnen. Nach Beendigung des Programms wurden die Proben in den „Digital Analyser“ überführt und die Auszählung der mRNA-Oligonukleotid Komplexe gestartet.

2.2.6.5 Quantifizierung der mRNA-Oligonukleotid Komplexe durch den „Digital Analyser“ und der nSolver® 3.0 Software

Vor der ersten Quantifizierung im „Digital Analysers“ musste die Installation der sog. „RCC files“ (Firma Nanostring®) für die murinen und humanen „Primer Pools“ vorgenommen werden. Somit konnte eine automatische Zuordnung der Zielsequenzen (mRNA der TRP-Kanäle) zur jeweiligen Farbkodierung erfolgen. Innerhalb des „Digital Analysers“ kam es durch die Negativladung der mRNA und durch das Anlegen eines Magnetfelds mit Hilfe der sich im Waschpuffer befindenden Metallspäne zu einer vertikalen Aufrichtung der mRNA-Oligonukleotid Komplexe. Damit wurde ein einfaches Auszählen der

unterschiedlichen Farbcodices, die den ausgewählten Zielsequenzen durch die Firma Nanostring® zugeordnet wurden, ermöglicht. Die Rohdaten wurden nach Fertigstellung im „Digital Analyser“ direkt als „RLF-file“ per Email versandt. Nach dem Öffnen der Messungen innerhalb der nSolver® „Software“ wurde eine automatische Qualitätskontrolle hinsichtlich spezieller Parameter (siehe Tabelle 34) durchgeführt.

Tabelle 34: Qualitätsparameter (QC) nSolver® Software

Prüfparameter	Bedeutung
„Imaging QC“	75 % der Messfläche muss auslesbar sein. Hinweise auf technische Probleme
„Binding QC“	Sättigung, entspricht der Messdichte („Counts“ pro Fläche)
„Positive control“	Linearität des Ergebnisses. Wert muss größer als 10000 „Counts“ sein, Variabilität innerhalb der Messungen möglich (30000 bis 50000)

2.2.7 Immunoblotting („Western Blot“)

Standardisierte Arbeitsanweisungen (SOPs) der „Western Blot“ Analysen wurden der Doktorarbeit „Molekulare Analyse der Funktion des TRPC6-Kanals in primären Podozyten der Maus“ von Jana Demleitner [97] entnommen.

2.2.7.1 Proteinisolierung

- Waschen der Zellen mit warmen PBS
- Entfernen der Zellen mit eiskaltem Ripa-Puffer mit Proteaseinhibitor vom Untergrund.
- Proben in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß füllen (pro Loch einer 6-Lochplatte etwa 150 µl Ripa)
- Die Lysate anschließend mindestens 45 Min. auf Eis stellen und dabei mehrmals vortexen.
- Die Proben für 30-60 Min. bei 4 °C auf höchster Stufe zentrifugieren, um die Zellreste zu entfernen.
- Überstand (5 + 1) mit 6 X Laemmlipuffer (siehe Tabelle 18) versetzt und gut vermischen.
- 10 Min. kochen bei 95 °C im Thermomix.
- Auftragen der Proben auf das SDS-Gel und den Rest bei minus 20 °C lagern [97].

2.2.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels „BCA-Assay“

Der BCA-„Assay“ der Firma „Thermo Fisher Scientific“ ist eine Methode zur kolorimetrischen Quantifizierung von Proteinen. Diese Methode kombiniert die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Proteine im alkalischen Milieu mit der hoch selektiven und sensitiven kolorimetrischen Detektion von Cu^{1+} durch BCA („bicinchoninic acid“), wodurch ein violetter Chelatkomplex gebildet wird. Der Komplex hat bei 562 nm sein Absorptionsmaximum, wobei die Absorption annähernd linear zur Proteinkonzentration ansteigt. Dieser Assay wurde zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlysaten verwendet [97]. Abbildung 19 zeigt die Reaktion [116] zwischen Bicinchoninsäure (BCA) und Kupfer(I)-Ionen zum violetten BCA-Kupfer Komplex zur Quantifizierung der Gesamteproteinkonzentration in Lysaten für „Western Blot“ Analysen.

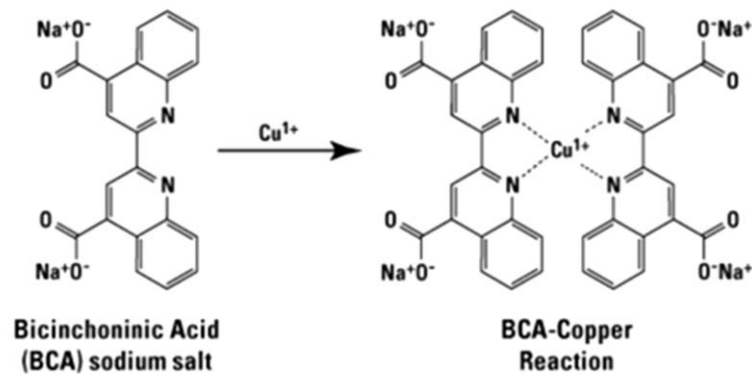


Abbildung 19: Reaktion von Bicinchoninsäure- Kupfer- Komplex zur Gesamtproteinbestimmung

2.2.7.3 Trenn- und Sammelgel

Zum Gießen der Gele wurde zuerst die Gießvorrichtung zusammengesetzt, anschließend das Trenngel und dann das Sammelgel gegossen. Das Trenngel dient zur Auftrennung der Proteine und das Sammelgel zur Konzentrierung der Proteine, damit die Auftrennung zum selben Zeitpunkt startet [97].

- Acrylamid, Tris / HCL pH 8,8 und H_2O , in der angegebenen Reihenfolge, in einem 50 ml Röhrchen vermischen (nicht vortexen)
- APS und TEMED zugeben und leicht schwenken
- Gel zügig in die Gießvorrichtung füllen
- Überschichtung mit Isopropanol
- Nach 45 Min. Isopropanol abschütten und 10 Min. trocknen lassen
- Sammelgel laut Tabelle 36 vorbereiten, zum Schluss APS und TEMED zugeben
- Lösung durch Schwenken vermischen

- Zügiges Einfüllen des Gels in die Gießvorrichtung ohne Luftblasen
- Umgehend den Kamm für die Proteintaschen einsetzen
- Gel ca. 45 Min. polymerisieren lassen

Für die Untersuchung des TRPA1-Kanals wurde das 10 % Gel verwendet. Folgende Tabellen (siehe unten) zeigen die Zusammensetzung des Trenngels sowie die des Sammelgels. Wichtig hierbei war, die Polymerisationsstarter APS und TEMED stets zum Schluss hinzuzugeben, um ein vorzeitiges Aushärten des Gels zu verhindern. Außerdem musste darauf geachtet werden, die Gelansätze nur durch leichtes Schwenken zu vermischen, damit möglichst wenig Luftsauerstoff in die Lösungen gelangen konnte. Dadurch konnte es zu einer Störung der Polymerisation kommen, was zu einer unzureichenden Aushärtung des Gels geführt hätte.

Tabelle 35: Zusammensetzung des 10 %-Trenngels

Lösung	Trenngel
Acrylamid / Bisacrylamid (30 %)	5 ml
4 X TRIS / SDS pH 8,8	3,75 ml
H ₂ O (Millipore)	6,125 ml
10 % Ammoniumpersulfat (APS) in H ₂ O	100 µl
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	20 µl

Tabelle 36: Zusammensetzung des Sammelgels

Lösung	Sammelgel
Acrylamid / Bisacrylamid 30 %	0,65 ml
4 X Tris / SDS pH 6,8	1,25 ml
H ₂ O (Millipore)	3,05 ml
10 % APS in H ₂ O	50 µl
TEMED	10 µl

2.2.7.4 Auftrennung von Proteinen mittels „Sodiumdodecylsulfate Polyacrylamidelectrophoresis“ (SDS-PAGE) und Proteintransfer

Auftrennung der Proteine

Für die Auftrennung der Proteine wurde der 10 x Laufpuffer mit VE Wasser (1:10) verdünnt. Das Gel wurde in die Kammer gestellt und der Kippverschluss geöffnet. Die Laufkammer wurde bis zur Eichlinie

mit verdünnten Laufpuffer befüllt. Es wurde darauf geachtet, dass die Gelkammern ausreichend mit Laufpuffer gefüllt waren. Die Kämme wurden entfernt und die Gele mit Proteinmarker (ca. 10 µl) und Probe (10 bis 30 µl) entsprechend der Konzentration vorsichtig und ohne überzulaufen in die Taschen gefüllt. Leere Taschen wurden mit reinem Lämmli-puffer befüllt. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 20 mA pro Gel, bis die gewünschte Auftrennung der Proben erreicht wurde [97].

Transfer der Proteine

Der Transfer der Proteine erfolgte auf eine PDVF (Polyvinidylidenfluorid) Membran. Zu beachten war, die Gele stets mit Puffer zu benetzen, um ein Austrocknen zu verhindern. Vor Transferbeginn wurde der Transferpuffer laut Tabelle 18 hergestellt. Methanol wurde zum Schluss hinzugegeben. Nach Fertigstellung des Puffers wurde dieser bei 4 °C gekühlt, damit es zu keiner Degradation der aufgetrennten Proteine während des Transfers kommen konnte. Vor- und Nachteile der unterschiedlichen Membranen werden in der folgenden Tabelle gezeigt. Nach Austestung der unterschiedlichen Membranen wurde für den Transfer der Proteine zur Untersuchung des murinen und humanen TRPA1-Kanals die PVDF Membran gewählt.

Tabelle 37: Nitrocellulose versus PVDF

Membran	Vorteile	Nachteile
Nitrocellulose	Hohe Sensitivität	Hohe Proteinmenge notwendig
PVDF (Polyvinylidenfluorid)	Widerstandsfähigkeit, Geeignet für gering Proteinmenge	Unspezifität der Membran

Transferkammern, Gel, PVDF Membran, Schwämme und Filterpapier wurden nach definierter Reihenfolge zusammengebaut. Die Proteine wurden bei 20 mA über Nacht transferiert. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die Membran ausgebaut, der Proteinmarker mit Kugelschreiber markiert und bei 4 °C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

2.2.7.5 Immuno- und Signaldetektion

Die Antikörper wurden, wie in Tabelle 17 angegeben, in 5 % PBST-Milchpulver Lösung verdünnt. Vor Beginn der Antikörper-Inkubation wurde die Membran für eine Stunde in 5 % Milchpulver PBST-Puffer gelegt, um die unspezifische Bindung von Antikörpern zu verhindern. Die gesamte Vorgehensweise der Inkubation wird im Detail in Jana Demleitners Dissertation beschrieben [97].

Allgemein galt für alle Immunoblots dieser Arbeit eine Inkubationszeit von 12 bis 14 Stunden bei 4 °C für die Erstantikörper und zwei Stunden bei Raumtemperatur für die Zweitantikörperlösungen. Nach Beendigung der Antikörperinkubation folgte dreimaliges Waschen der Membran mit 1x PBST-Puffer für

jeweils zehn Minuten und eine anschließende Signaldetektion. Die Entwicklung der Membranen wurde im Liqour Gerät nach Herstellerangaben im ungesättigten Bereich durch Zugabe der Chemilumineszenzsubstrate Luminata Forte (Merck Millipore) oder SuperSignal West Dura (Pierce) durchgeführt.

2.2.8 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Die Immunfluoreszenz-Mikroskopie von Zelllinien und Primärzellen wurde nach dem Protokoll unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Aus folgender Tabelle geht hervor, auf welche Art und Weise die verschiedenen Zellen ausgesät wurden.

Tabelle 38: „Coating“ und Fixierung für Immunfluoreszenz- Mikroskopie

Zellen	Konfluenz	Tag X nach Präparation	„Coating“
ATII	Zellverbände	Tag 4	-
ATII-ATI	-	Tag 8	-
bEpC	Zellverbände	Tag7	2 % Collagenlösung
HEK 293T hTRPA1	ca.70-80 %	-	-
HEK 293T	ca.70-80 %	-	-
tEpC	Zellverbände	Tag 7	2 % Collagenlösung

Nach zehnminütiger Fixierung der Zellen in 3,7 % Formaldehyd/ PBS Lösung bei Raumtemperatur erfolgte der schrittweise Austausch gegen eisgekühltes PBS. Anschließend wurde wie folgt gearbeitet.

Permeabilisierung und Blockade unspezifischer Bindungen:

- Inkubation in 0,5 % Triton X-100/ PBS bei Raumtemperatur (10 Min.)
- Zweimaliges Waschen in PBS
- Inkubation in 4 % BSA/ Goat Serum/ PBS (1Stunde)

Erstantikörper Inkubation:

- Inkubation über Nacht bei 4 °C in dunkler, feuchter Kammer.
- Sechsmaliges Waschen in 0,1 % BSA/PBS

Zweitantikörper Inkubation:

- Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur in dunkler, feuchter Kammer.
- Sechsmaliges Waschen in 0,1 % BSA/PBS

Hoechst Färbung:

- Inkubation für 10 Min. bei Raumtemperatur
- Sechsmaliges Waschen in 0,1 % BSA/PBS

Zum Eindeckeln der Gläschen wurden die Objektträger mit Millipore Wasser gewaschen, dann mit einem Tropfen „Dako Mounting“ Medium versehen und das Gläschen mit der Zellseite nach unten aufgelegt. Nach Abnehmen des überschüssigen „Mounting“ Mediums wurden die Ränder des Gläschens mit Nagellack luftblasenfrei versiegelt. Die Objektträger wurden bis zum weiteren Gebrauch in einem Präparate-Kasten bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.9 Messung der intrazellulären Calciumkonzentration mittels FURA-2 (Übernahme aus der Doktorarbeit von Jana Demleitner [97])

Die funktionelle Charakterisierung von Ca^{2+} -leitenden Kanälen ist unter anderem durch den Einsatz von Calcium-Indikatoren möglich, zu denen Fura-2 gehört. Fura-2 ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der eine einfache Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ermöglicht. Beladen werden die Zellen mit dem Ester des Farbstoffes (Fura-2-Acetoxy-methylester (Fura-2-AM)), welcher lipophil ist, wodurch er die Zellmembran nahezu ungehindert passieren kann. Intrazellulär spalten Esterasen den Farbstoff in hydrophile Spaltprodukte, sodass dieser nicht mehr durch die Membran zurück in den Extrazellulärraum diffundieren kann. Das Fluoreszenzexcitationsspektrum von Fura-2 wird in Abbildung 20 näher charakterisiert. Das Exzitationsmaximum des mit Ca^{2+} -beladenen Fura-2 befindet sich bei 340 nm, während es sich für das calciumfreie Fura-2 nach 380 nm verschiebt. Das Emissionsspektrum bleibt hingegen nahezu gleich und liegt bei 510 nm.

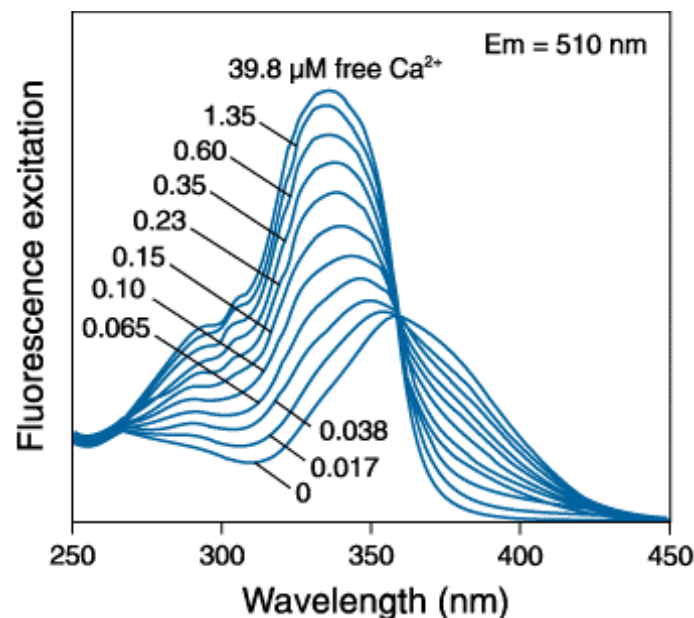


Abbildung 20: Exzitationsspektrum des Calciumindikators Fura-2. Das Exzitationsmaximum des mit Ca^{2+} -beladenen Fura-2 befindet sich bei 340 nm, das für das calciumfreie Fura-2 bei 380 nm. Der isobestische Punkt liegt bei 360 nm (roter Punkt in der Abbildung) (verändert nach Invitrogen).

Die Exzitationswellenlänge, die völlig Calcium unabhängig ist, wird isosbestischer Punkt genannt und liegt bei Fura-2-AM bei 360 nm. Vereinfacht lässt sich sagen, dass der Quotient (Ratio) der messbaren Fluoreszenz bei 340 nm und der messbaren Fluoreszenz bei 380 nm ein Maß für die absolute, intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ist ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Dies ist unabhängig von der Effizienz der Beladung der Zellen mit Fura-2. Vor Beladung mit FURA-2-AM Messlösung wurden die Zellplättchen einmal mit 37 °C warmen HBSS Puffer gewaschen und folgendermaßen inkubiert.

Tabelle 39: Inkubationszeiten unterschiedlicher Zellen mit FURA-2-AM

Zellen	Inkubationszeit	Temperatur (Heizmatte)
HEK 293T	30 Min.	Raumtemperatur
HEK 293T hTRPA1	20-25 Min.	Raumtemperatur
ATII	15-20 Min.	37 °C
tEpC	15-18 Min.	37 °C
bEpC (sehr sensible Zellen)	15 Min.	37 °C

2.2.9.1 TRPA1 Aktivierung durch Allylisothiocyanat und Hemmung durch A-967076

FURA-2-AM, AITC und A-967079 Messlösung wurden laut Tabelle 22 hergestellt. Allylisothiocyanat (AITC), ein spezifischer TRPA1 Aktivator [51], wurde zu jedem Versuchstag frisch angesetzt, da es sonst zur Hydrolyse der Isothiocyanat kommt [117]. Nach Beladung und Inkubation von HEK 293T, HEK 293T hTRPA1 und ATII Zellen mit FURA-2-AM Messlösung wurden die Glasplättchen in eine dafür spezifische Messkammer eingespannt. Anschließend wurde mit 400 µl warmen HBSS Puffer befüllt und die „Regions of interest“ (ROIs) markiert.

An Hand der Tabellen (siehe unten) wird die Durchführung der Aktivierung des TRPA1-Kanals durch AITC (finale Konzentration [100 µM]) und dessen Inhibierung durch A-967079 (finale Konzentration [16,6 nM]) gezeigt. AITC und A-967079 Lösungen wurden bei Raumtemperatur verwendet.

Tabelle 40: Versuchsaufbau AITC Stimulation (FURA-2-AM)

Zeitverlauf [Min.]	Kontrolle	AITC final [100 µM]
0 Min.	400 µl HBSS (Ausgangsvolumen)	400 µl HBSS (Ausgangsvolumen)
2 Min.	Zugabe von 100 µl HBSS	Zugabe von 100 µl HBSS
5 Min .	Zugabe von 100 µl HBSS	Zugabe von 100 µl AITC [60 µM] Messlösung
10 Min.	ENDE der Messung	

Tabelle 41: Versuchsaufbau AITC Stimulation und Inhibition mit A-967079 (FURA-2-AM)

Zeitverlauf [Min.]	AITC final [100 µM]	A-967079 final [16,6 nM] + AITC final [100 µM]
0 Min.	400 µl HBSS (Ausgangsvolumen)	400 µl HBSS (Ausgangsvolumen)

2 Min.	Zugabe von 100 µl HBSS	Zugabe von 100 µl A-967079 [100 nM] Messlösung
5 Min.	Zugabe von 100 µl AITC Messlösung	Zugabe von 100 µl AITC [600 µM] Messlösung
10 Min.	ENDE der Messung	

2.2.9.2 TRPA1 Aktivierung durch Kältereiz und Inhibition durch A-967079

„Ca²⁺-Imaging“-Experimente wurden mit HBSS Kontrolllösung (T₁), eisgekühlten HBSS Puffer (T₂) und dem TRPA1 Hemmstoff A-967079 mit einer Endkonzentration von [16,6 nM] durchgeführt (Versuchsaufbau siehe Tabelle 42). Hierzu wurden HEK 293T WT Zellen als Kontrolle mit den stabil hTRPA1-exprimierenden HEK 293T Zellen verglichen [51]. Eine normale Zellfunktion konnte durch eine anschließende Stimulation mit AITC Messlösung [600 µM] sieben Minuten nach Messbeginn gezeigt werden.

Tabelle 42: Versuchsaufbau Kälteexperiment (FURA-2-AM)

Zeitverlauf [Min.]	Kontrolle	Kältereiz	Kältereiz / Inhibition
0 Min (Ausgangsvolumen)	400 µl HBSS / T ₁ (Ausgangsvolumen)	400 µl HBSS / T ₁ (Ausgangsvolumen)	400 µl A-967079 Messlösung/ T ₁ (Ausgangsvolumen)
2 Min.	Zugabe von 100 µl HBSS / T ₁	Zugabe von 100 µl HBSS / T ₂	Zugabe von 100 µl HBSS / T ₂
7 Min.	Zugabe von 100 µl AITC Messlösung/ Raumtemperatur	Zugabe von 100 µl AITC Messlösung/ Raumtemperatur	Zugabe von 100 µl AITC Messlösung/ Raumtemperatur
10 Min.	ENDE der Messung		

Das Mischverhältnis von Lösungen unterschiedlicher Temperatur und die daraus resultierende Endtemperatur wurde unter Anwendung der Richmannschen Mischungsregel zur Bestimmung der Mischtemperatur berechnet. Die jeweiligen Temperaturen T₁, T₂ und T₁+T₂ (siehe Tabelle 43) wurden mit einem handelsüblichen Thermometer kontrolliert und notiert.

Tabelle 43: Temperaturen Kälteexperiment

Lösung	Temperatur ₁ (T ₁)	Temperatur ₂ (T ₂)	Mischtemperatur (T ₁ +T ₂)
HEPES	30 °C	3,5 °C	ca. 10-12 °C

2.2.9.3 Hypoxie (N₂) und Hyperoxie (O₂) Experiment

Vor Beginn der Hypoxie [N₂] und Hyperoxie [O₂] Messungen wurde HBSS Puffer mit reinem Sauerstoff oder Stickstoff der Firma Praxair® (siehe Tabelle 14) innerhalb einer speziellen 3-Hähne Apparatur [118] für mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur begast. Anschließend wurden, wie unter Punkt 2.2.9

beschrieben, die jeweiligen Zellen mit FURA-2-AM Messlösung beladen. Während der Inkubationszeit wurde die Messvorrichtung mit Pumpe, Schlauchsystem und Kammer vorbereitet, so dass nach Befüllen der Messkammer mit 1ml HBSS Lösung und Abdichtung des Systems zügig mit den Messungen begonnen werden konnte. Der tatsächliche Sauerstoffgehalt der jeweiligen HBSS Lösung wurde mit einer handelsüblichen Sauerstoffelektrode zwei Stunden nach Begasung bei Raumtemperatur bestimmt. Die hyperoxische Lösung hatte einen Gehalt von 80,4 % Sauerstoff (35,7 mg/ml) und die hyperoxische Lösung entsprach einem Gesamtsauerstoffgehalt von 10,5 % (2,5 mg/ml). Die normoxische Lösung lag bei einem Sauerstoffgehalt von 21,5 % (9,8 mg/ml).

Die hypoxischen und hyperoxischen Messungen wurden wie folgt durchgeführt. Nach zwei Minuten Äquilibrationszeit wurde die Perfusion mit einer maximalen Flussrate von 0,5 ml/min mit normoxischer HBSS Lösung gestartet. Nach sieben Minuten wurde entweder normoxische (Negativkontrolle), hypoxische bzw. hyperoxische HBSS Lösung durch das geschlossene System geleitet. Nach 15 Minuten Gesamtmesszeit wurden die Experimente beendet und mit der Akquirierung der Daten begonnen.

2.2.10 Etablierung des murinen isolierten-perfundierten Lungenmodells (IPL) zur Quantifizierung von Lungenödemen

Während des Arbeitens für diese Promotion wurde die Etablierung des isolierten-perfundierten Lungenmodells (IPL) der Firma Hugo Sachs Elektronik sowie die methodische Optimierung der Präparation und Isolation muriner *ex-vivo* Lungen erreicht und für folgende Experimente eingesetzt.

- Messung des Ischämie-Reperfusion- und Toxin-induzierten Lungenödems
- Austestung von Nebenwirkungen neuer pharmakologischer Substanzen auf die Lunge
- Quantifizierung eines Lungenödems nach trachealer Applikation von toxischen Substanzen
- Messung spezifischer pulmonaler Parameter wie zum Beispiel Atemzugvolumen, periarterieller Druck und vaskuläre Resistenz unter positiver und negativer Beatmung

Vor Beginn der Messungen wurde das isolierte-perfundierte Lungenmodell nach Herstellerangaben kalibriert und die Messparameter durch die PULMODYN® Software [100] von Hugo Sachs Elektronik auf korrekte Funktionsweise untersucht. Die Kalibrierung der Messparameter sollte alle acht Wochen und vor Beginn eines neuen Experiments durchgeführt werden, so dass die Richtigkeit und Messgenauigkeit des IPLM Systems gewährleistet ist. Details zu technischen Fragen des IPL und zur PULMODYN® Software waren in den jeweiligen Herstelleranweisungen zu finden.

2.2.10.1 Aufbau des isolierten-perfundierten Lungenmodells (IPL)

Abbildung 21 [119] zeigt den Aufbau des isolierten-perfundierten Lungenmodells (IPL). Über einen automatischen Gewichtssensor kann kontinuierlich das Lungengewicht und dadurch eine Ödembildung quantifiziert werden. Abhängig vom Versuchsaufbau konnte zwischen Überdruck- (positiv) und Unterdruckbeatmung (negativ) ausgewählt werden. Bei der Positivbeatmung erfolgt die Ventilation der murinen Lunge durch das Einbringen von Überdruck, vergleichbar mit der druckkontrollierten mechanischen Ventilation in der Notfallmedizin. Die Unterdruckbeatmung zeichnet sich durch eine sehr sanfte und natürliche Ventilation der Lunge aus. Dabei wird die Messkammer des Lungenmodells komplett abgedichtet und ein Vakuum erzeugt. Auf Grund des Unterdrucks kommt es zu einer natürlichen Aufblähung der Lunge und damit zum Ansaugen von Luftsauerstoff. Der Kammerdruck bewegt sich während In- und Expiration abwechselnd zwischen drei und acht cmH₂O. Diese Art der Ventilation ähnelt sehr stark der Atmung im physiologischen System. Hierbei wird durch Absenken des Diaphragmas ein Unterdruck im Thorax erzeugt, was zu einer Aufblähung der Lunge führt und damit zur Aufnahme von Sauerstoff. Diese Art der Ventilation im isolierten-perfundierten Lungenmodell kann als „Lungenprotektive Beatmung“ unter Minimierung beatmungsinduzierter Lungenschäden bezeichnet werden.



Abbildung 21: Aufbau isoliertes-perfundiertes Lungenmodell (IPL)

2.2.10.2 Allgemeine Versuchsvorbereitungen

Allgemeine Versuchsvorbereitungen, die vor Messbeginn durchgeführt wurden:

- Anschalten des Wasserbads
- Aufwärmung des IPL Systems auf 37 °C
- Perfusionskammer mit feuchtem Tuch bestücken
- Schließen der Kammer (Äquilibration der Kammer mit Feuchtigkeit)
- 200ml Perfusionslösung mit 4,4 ml 10 % Hydrogencarbonatpuffer versetzen (siehe Tabelle 19)

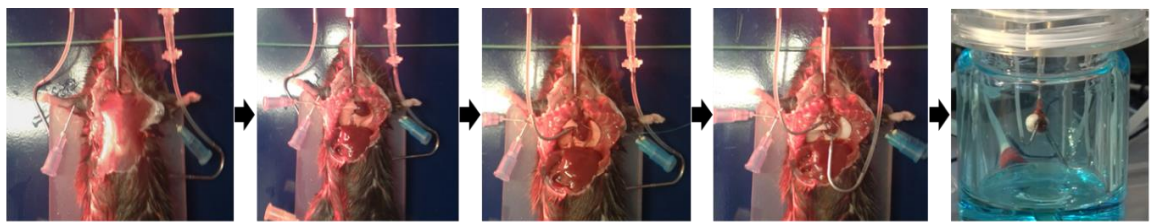
- Perfusionslösung mit Carbogen begasen (30 Min.)
- Vorbereitung notwendiger Applikationslösungen
- Kontrolle der Kalibrierung und Messparameter mittels PULMODYN® „Software“

2.2.10.3 Präparation der isolierten Lunge

Die Isolation und Präparation der isolierten Lunge erfolgte mit drei bis vier Monate alten Wild-Typ oder TRPA1-defizienten Mäusen.

- Anästhesie durch i.p. Injektion von 300 µl Narkose-Lösung bestehend aus Ketamin (100 mg/ml), Xylazin (125 mg/ml) und Heparin (500 i.E./ml)
- Befestigen der Halterung mit Zu- und Abflusskanüle am OP-Tisch
- Fixieren der Maus auf dem Präparationstisch
- Reflextestung zur Überprüfung der Narkose
- Öffnen des Thorax, Entfernen des Diaphragmas und Einschneiden der *Vena cava*
- Tracheale Ligation und kleiner halbseitiger Einschnitt in die Trachea
- Einführen der Beatmungskanüle über die Trachea und Fixierung durch Ligationsfaden
- Ventilation der Lunge (80 Atemzüge pro Minute)
- Entfernen des Thymus
- Vorlegen einer Ligatur um die Pulmonalarterie
- Einschneiden des rechten Ventrikels
- Anschalten der Perfusion (0,2-0,3 ml/Min.)
- Zuflusskanüle ohne Luftblasen in Pulmonalarterie einführen
- Kontrolle periarterieller Druck (PAP) < 20 cmH₂O
- Ausschalten der Perfusion
- Fixierung der Ligation
- Punktieren des linken Ventrikels mit Pinzette
- Einführen der Abflusskanüle und Fixierung
- Kontrolle von Zu- und Abfluss (Lunge sollte komplett weiß werden)
- Erhöhen des Perfusionsflusses in 0,2 ml Schritten auf 1 bzw. 2 ml/Min.

Die Präparation der isolierten-perfundierten Lunge wird in Abbildung 22 im Detail gezeigt:



(1) Intubation und Positivbeatmung (2) Öffnung Thorax (3) Zufluss über Pulmonal Arterie (4) Venöser Abfluss über rechtes Ventrikel (5) Isolierte, perfundierte Lunge

Abbildung 22: Präparation isolierte-perfundierte Lunge

2.2.10.4 Protokoll zur Quantifizierung des Ischämie-Reperfusion induzierten Lungenödems im isolierten-perfundierten Lungenmodell (IPL)

Nach Isolation der Lunge und Kontrolle der Messparameter folgte nach 15 Minuten Vorlaufphase („Prewflow“) durch Ausschalten der Pumpe eine ischämische Phase von 90 Minuten. Nach einer Normalisierung des Ausgangsgewichts (Gewichtstara) wurde der Perfusionsfluss in 0,2 ml Schritten auf 2 ml/Min. Fließgeschwindigkeit erhöht. Anschließend wurde die kontinuierliche Zunahme des Lungengewichts über zwei Stunden alle 30 Minuten gemessen. Der Versuchsablauf wird in den folgenden Tabellen zusammengefasst:

Tabelle 44: Versuchsaufbau Kontrolle IPL

Kontrolle	Zeitverlauf
„Prewflow“ [0,2 ml/Min.]	15 Min.
Perfusion [2 ml/Min.]	120 Min.

Tabelle 45: Versuchsaufbau Ischämie-Reperfusion-induziertes Ödem

Ischämie-Reperfusion induziertes Ödem	Zeitverlauf
„Prewflow“ [0,2 ml/Min.]	15 Min.
Ischämie	90 Min.
Reperfusion [2 ml/Min.]	120 Min.

2.2.10.5 Protokoll zur Quantifizierung des Halb-Losts (2-Chlorethylethylsulfid/ CEES) -induzierten Lungenödems im isolierten-perfundierten Lungenmodell (IPL)

Die Auswirkungen der trachealen Applikation des Lost Derivates CEES (2-Chlorethylethylsulfid) auf die Ödembildung von isolierten perfundierten Lungen wurde wie folgt bestimmt.

Zu Beginn wurden alle notwendigen Puffer und CEES Applikationslösungen (siehe Tabelle 19) hergestellt. Die Lösung (100 µl 4 mM CEES) wurde nach halbseitigem Einschnitt der Trachea mittels Mikroliter Spritze und abgestumpfter Kanüle sehr vorsichtig unter leichtem Druck injiziert. Anschließend

folgte das Einführen und zügiges Befestigen der Beatmungskanüle sowie die Weiterführung der allgemeinen Isolation in maximal 15 Minuten (siehe Punkt 2.2.10.3). Nach Installation der Lunge im IPL wurde der Fluss in 0,2 ml Schritten pro Minute auf 1 ml/Min. Fließgeschwindigkeit erhöht und die Toxin-induzierte Ödembildung im Vergleich zur Kontrollgruppe über 60 Minuten gemessen (siehe Tabelle 46).

Tabelle 46: Versuchsaufbau der trachealen Halb-Lost Applikation im IPL

Versuchsaufbau	Kontrolllösung	CEES-Lösung
Tracheale Applikation von	100 µl HBSS/ 0,1 % DMSO	100 µl CEES [4 mM]
Präparation in max. 15 Min.	+	+
Gewichtsnormalisierung (TARA)	+	+
Perfusion 60 Min. bei 1 ml/min	+	+

2.2.11 *In-vivo* Modell der Hyperoxie-induzierten [O₂] alveolären-epithelialen Hyperplasie

2.2.11.1 Allgemeiner Versuchsaufbau

Für das *in-vivo*-Modell der Hyperoxie-induzierten alveolären-epithelialen Hyperplasie wurden sechs männliche Versuchstiere pro Genotyp in einem Alter von drei Monaten verwendet. Nach Kalibrierung und Funktionstestung der Kammer entsprechend der Herstellerangaben der Firma BioSpherix erfolgte die Exposition der Tiere für fünf Tage mit 80 % Sauerstoff und anschließend für zehn Tage mit 50 % Sauerstoff. Das Gasmischung ist durch reinen Sauerstoffs (siehe Tabelle 14) mit normaler Raumluft hergestellt worden. Der prozentuale Sauerstoffgehalt wurde kontinuierlich vom Sauerstoffsensoren ProOx Modell P110 (BioSpherix) ermittelt und kontrolliert. Während der Durchführung des Hyperoxie [O₂] Experiments in der BioSpherix Kammer („A-chamber“) erfolgte eine tägliche Überprüfung der Versuchstiere an Hand eines Kontrolldatenblatts („Score Sheet“). Allgemeine Parameter, wie das äußere Erscheinungsbild, das Verhalten und die Atmung der Tiere, wurden durch die Vergabe von 0 bis 2 Punkten bewertet. Bei normaler Verfassung der Tiere wurde eine Punktzahl von 0 vergeben. Die Vergabe eines Punktes bedeutete eine engmaschige Kontrolle der Tiere. Normalisierte sich der Score nicht innerhalb von 48 Stunden, wurde der Versuch abgebrochen. Erreichte der Gesamtscore maximal 2 Punkte, so musste der Versuch sofort beendet werden. Die Dokumentation erfolgte jeden Tag zur gleichen Uhrzeit. Alle Tiere erreichten innerhalb der Versuchsdauer keinen kritischen Wert. Abgesehen von einer leicht erhöhten Atemfrequenz der Tiere zu Beginn der Hyperoxie [80 %] wurde das zweiwöchige Experiment ohne Unterbrechungen durchgeführt.

2.2.12 Quantifizierung histomorphologischer Strukturen in murinen Lungenschnitten mittels stereologischer Methode (CAST)

Die Quantifizierung histomorphologischer Strukturen erfolgte unter Anwendung einer stereologischen „Software“ (Computer-assisted stereological toolbox (CAST)) nach Durchführung des *in-vivo* Modells der

Hyperoxie-induzierten alveolären-epithelialen Hyperplasie (siehe Punkt 2.2.11). Mittels dieser Methode lassen sich strukturelle Unterschiede innerhalb des Lungengerüsts verschiedener Genotypen evaluieren sowie pathologische Veränderungen in Folge einer Exposition von Hyperoxie oder Hypoxie quantifizieren. Nach Isolation, anschließender Gewebekonservierung und Schnittpräparation des murinen Lungengewebes folgte die Färbung mit Masson-Trichrom und Eindeckelung der Proben. Zur visuellen Darstellung der Lungenschnitte wurden alle Proben in Kooperation mit Dr. Ali Önder Yildirim des Helmholtz Zentrums München unter Anwendung des „MIRAX Scans“ digitalisiert und gespeichert. Die weitere Bearbeitung der Digitalbilder wurde durch die MIRAX Software der Firma Zeiss ermöglicht. Neben der Visualisierung der Schnitte erfolgte die Quantifizierung ausgewählter Messgrößen, wie unter Punkt 2.2.12.4 erläutert.

2.2.12.1 Prinzip der CAST Methode („Computer Assisted Stereological Toolbox“)

CAST steht für „Computer Assisted Stereological Toolbox“. Dabei handelt es sich um eine von der europäischen respiratorischen Gesellschaft (ERS) anerkannte stereologische Evaluationsmethode zur Abschätzung und Quantifizierung dreidimensionaler morphologischer Lungenstrukturen. Das Prinzip der Stereologie besteht darin, die 3D-Struktur der Lunge an Hand einiger ausgewählter 2D-Proben abzuschätzen. Wichtig ist, die Proben nach einem festgelegten Schema zu ermitteln, so dass für jede Struktur der Lunge die gleiche Wahrscheinlichkeit besteht, ausgewählt zu werden. Damit wird ein verzerrtes Ergebnis durch Auswahl zu vieler ähnlicher Strukturen vermieden. Das genaue Prinzip der Probenauswahl wurde in Hsia et al. erläutert [98].

2.2.12.2 Präparation, Gewebekonservierung und Einbettung

In Kooperation mit Jiong Zhang (Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der LMU) wurden die Lungen von behandelten und unbehandelten Wild-Typ und TRPA1-defizienten Mäusen präpariert, fixiert, konserviert und eingebettet.

Präparation und Fixierung:

Am Tag der Präparation wurden die Kontrolltiere und hyperoxisch [O₂] behandelten Mäuse mit Ketamin (100 mg/ml), Xylazin (125 mg/ml) und Heparin (500 i.E./ml) in tiefe Narkose versetzt. Sämtliche Lösungen wurden vor Versuchsbeginn auf Eis gekühlt, so dass es während der Isolation zu keiner Degradation des Lungengewebes kommen konnte. Die Lungen wurden wie folgt präpariert.

- Vorbereitung der 4 %-Paraformaldehydlösung (PFA-Lösung)
- Befüllen der Spritzen mit PBS und 4 % PFA-Lösung

- Überprüfung der Narkose durch Testung der Reflexe
- Fixierung des Versuchstiers
- Öffnung des Thorax, Entfernen des Diaphragmas und Einschneiden der *Vena cava*
- vorsichtige Entfernung des Thymus
- „Butterfly“-Kanüle in linken Ventrikel des Herzens einführen und fixieren
- Spülen des großen Blutkreislaufs mit 20 ml PBS
- Perfusion mit 20 ml 4 % PFA-Lösung
- Entfernung des Herzens
- vorsichtiges Herauslösen der Lunge
- Lagerung in 5 ml 4 % PFA-Lösung über Nacht (bei 4 °C)

Gewebekonservierung und Einbettung:

Am folgenden Tag wurden die fixierten Lungen dreimal mit 70 % Ethanol für fünf Minuten gewaschen, in Einbettungskassetten gelegt, gekennzeichnet und in die Infiltrationsanlage überführt. Die Gewebekonservierung der Lungenflügel erfolgte nach festgelegter Reihenfolge in Xylol, Ethanol und Paraffin (Programm 8 des Einbettapparats der Firma Systemex). Am Ende des Programms wurden alle Flügel jeder Lunge luftblasenfrei in Paraffin eingebettet. Die Paraffinblöcke wurden nach zwei Stunden Aushärtezeit auf der Kühlplatte aus den Metallbehältnissen entnommen und lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.12.3 Masson-Trichrom-Färbung

Wie in Punkt 2.2.12.2 beschrieben wurden die in Paraffin konservierten Lungen mittels Lasermikrotom nach exakter Vorgabe von Heike Bollig (Helmholtz Zentrum München, Neuherberg) in 3 µm dünne Scheiben geschnitten [98], wodurch ein repräsentativer und einheitlicher Überblick der gesamten Lungenstruktur gelingt. Im Folgenden wird das Einfärben der Lungenschnitte mit Masson-Trichrom beschrieben. Nach der Färbung wurden die Objektträger vor Licht geschützt bei 4 °C gelagert.

- Erhitzen der Schnitte bei 62 °C/ 10 Min.
- Zweimal in Xylol schwenken (5 Min.)
- Zweimal in Ethanol 100 % schwenken (1 Min)
- Schnitte vorsichtig unter fließendem Leitungswasser waschen (4 Min.)
- Spülen mit destilliertem Wasser (dH₂O)
- Einfärben mit Hemalaun Lösung (8 Min.)
- Waschen unter fließendem Leitungswasser (4 Min.)
- Spülen mit destilliertem H₂O (dH₂O)

- Schnelles Spülen in 70 % Ethanol 0,1 % HCL
- Waschen unter fließendem Leitungswasser (5 Min.)
- Färben mit Ponceau Fuchsin Lösung (6 Min.)
- Schnelles Spülen mit Leitungswasser, anschließend dH2O
- Färben mit Phosphomolybdän-Säure (1 Min.)
- Färben mit „Light Green“ Farbstoffen (5 Min.)
- Schnelles Spülen in Ethanol 100 %
- Schnitte zweimal in Ethanol 100 % geben(1 Min.)
- Schnitte zweimal in Xylol geben (1 Min.)
- Eindeckeln der Schnitte mit Deckgläschen
- Dichtes Verschließen mit Nagellack

2.2.12.4 Repräsentative Auswahl der Messbereiche durch die Visopharm®- „Software“

Bis zu acht Objektträger konnten in die Halterung des Olympus Mikroskops gespannt werden. Nach elektronischem Scan und manueller Markierung (siehe Abbildung 23) der einzelnen Lungenflügel („Regions of interest“=ROIs) erfolgt, nach Festlegung der Anzahl der Messfelder, die automatische Randomisierung von 30 (+/- 3) blauen Messbereichen durch die Visiopharm® „Software“. Waren zu viele Messfelder außerhalb der markierten Bereiche, so wurde die Randomisierung wiederholt. Bereiche mit weniger als 30 % septalem Gewebe wurden nicht für die Quantifizierung berücksichtigt. Die spontane Auswahl dieser Bereiche war essentiell, um eine repräsentative Darstellung der dreidimensionalen Struktur des pulmonalen Gewebes zu erhalten.



Abbildung 23: Randomisierung der Messbereiche während der CAST-Messung.

2.2.12.5 Messung ausgewählter Parameter mittels CAST-System

Abbildung 24 zeigt die repräsentative Darstellung eines zufällig ausgewählten Messfeldes mit entsprechender Unterteilung in grüne Kreuze und gelbe Linien. Tabelle 47 zeigt die definierten Messparameter sowie die dazugehörige Bedeutung.

Darstellung und Erläuterung ausgewählter CAST-Parameter:

Tabelle 47: Darstellung und Erläuterung der CAST-Parameter

CAST Parameter	Nummer	Beispiel	Erläuterung
S-septal	1	S/A	Grünes Kreuz mit blauem Kreis im Sichtfeld (oben links). Befindet sich das Kreuz im septalen Bereich, dann mit S markieren, ansonsten mit A (nicht-septal).
A-nicht-septal	2	A	Alle grünen Kreuze im Sichtfeld beachten. Befindet sich das Kreuz im nicht septalen Bereich, dann mit A markieren.
M-Sa-septal	3	M	Alle gelben Linien im Sichtfeld beachten. Kennzeichnung mit M , wenn der Punkt auf septalem Gewebe liegt. (Gewebe, „tissue“)
P-Sa-air	4	P	Alle gelben Linien im Sichtfeld beachten. Kennzeichnung mit P , wenn sich der Punkt im septalen Luftraum befindet (Luft, „air“)
I-sept	5	I	Erste drei gelbe Linien mit rotem Kreis im Sichtfeld beachten. Ein- und Ausgang im septalen Bereich mit 2 Linien markieren. Für Endothel und Epithel je eine Linie.

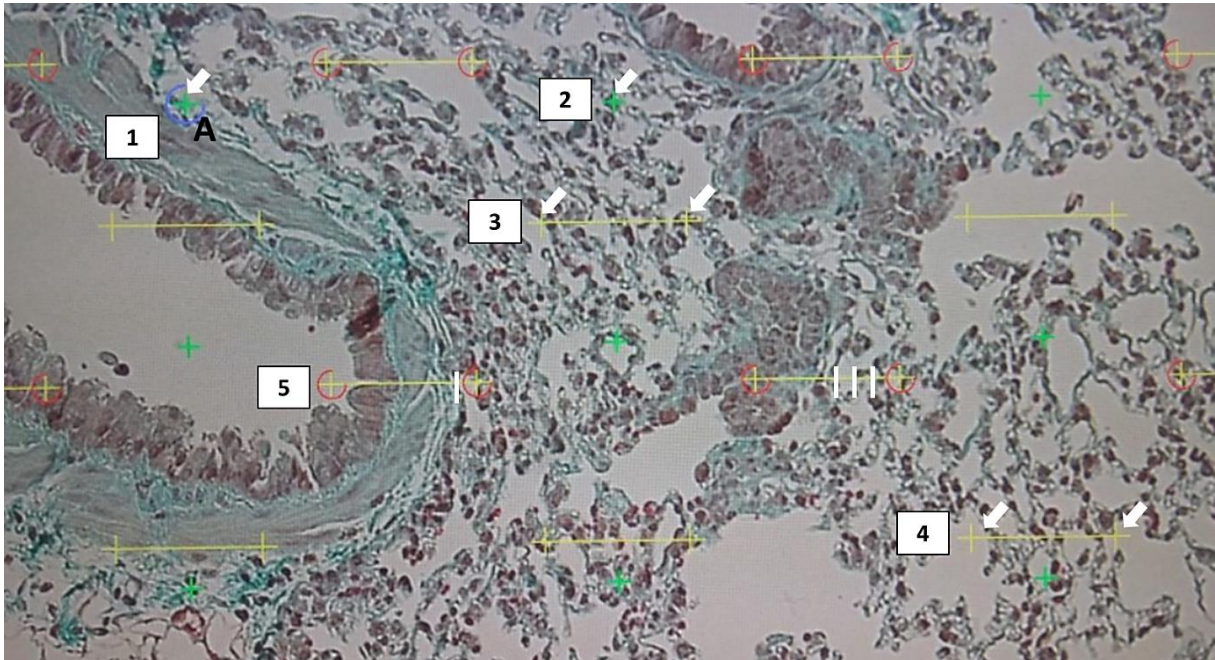


Abbildung 24: Repräsentative Darstellung der CAST-Messung

2.2.12.6 Quantifizierung ausgewählter stereologischer Parameter

Tabelle 48 zeigt die Berechnung der festgelegten Messparameter [98] zur Evaluation pathologischer Veränderungen nach hyperoxischer Exposition der Versuchstiere im Vergleich zur normoxischen Kontrolle. Bei den ausgewählten Parametern handelte es sich um den Anteil an Septum [A_s] (Alveolarraum), der prozentuale Gewebeanteil [A_G] innerhalb des alveolären Raums, die Ratio von Luftraum zu septalem Gewebe [V/G] und das Oberflächen Volumen [S_v].

Tabelle 48: Quantifizierung der Messparameter

Messparameter	Abkürzung	Berechnung
Anteil Septum	A_s	$(S\text{-septal} \times 10) / ((S\text{-septal} \times 10) + A\text{-non-septal})$
Anteil Gewebe [%]	A_G	$(M\text{-Sa-septal} \times 100) / (P\text{-SA-air} + M\text{-Sa-septal})$
Ratio Volumen/ Gewebe	V/G	$(M\text{-Sa-septal} \times \text{length/point} \times 0,5) / I\text{-Intersept}$
Oberflächen Volumen	S_v	$(2 \times I\text{-Intersept}) / ((P\text{-Sa-air} + M\text{-Sa-septal}) \times \text{length/point})$

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der isolierten Epithelzellen durch Immunocytochemie und im „Western Blot“

Nach der Isolierung der Lungenzellen (siehe Punkt 2.2.4) erfolgte der Nachweis spezifischer Zellmarker für tracheale, bronchiale und alveoläre Epithelzellen. Anschließend wurden diese Zellen für Nanostring® mRNA-Expressionsanalysen und funktionelle Ca^{2+} -Einstrom-Experimente verwendet, um so eine mögliche Rolle des TRPA1-Kanals als Sauerstoffsensoren zu evaluieren. In trachealen und bronchialen Epithelzellen gelang es, den spezifischen Epithelzell-Marker Pan-Cytokeratin nachzuweisen (siehe Punkt 3.1.1). Eine weiterführende Untersuchung bronchialer und trachealer Epithelzellen auf mögliche Precursorzellen (siehe Punkt 1.1.3) mittels der spezifischen Zellmarker CC10 für Clubzellen und CD63 für Basalzellen ist innerhalb dieser Arbeit nicht erfolgt [4]. Alveoläre Epithelzellen TypI und TypII wurden durch die Marker-Proteine Pro-Surfactant Protein C für ATII Zellen und Podoplanin für ATI Zellen charakterisiert.

3.1.1 Nachweis von Zytokeratinen in primären murinen trachealen (tEpC) und bronchialen (bEpC) Wildtyp Epithelzellen

Der Nachweis von Zytokeratinen innerhalb der clusterartigen trachealen und bronchialen Epithelzellen gelang mit dem Einsatz eines α -Zytokeratin Antikörpers (Pan-Mixtur). Bei diesem biotechnologischen Produkt handelt es sich um eine Mischung unterschiedlicher monoklonaler Antikörper, die gegen ausgewählte Zytokeratine gerichtet sind und als spezifische Zellmarker für gesunde und neoplastische Epithelzellen von Wirbeltieren gelten [120-122]. Zytokine sind intermediäre Filamente, die die mechanische Stabilität und physiologische Funktionalität dieser Zellen gewährleisten [123].

3.1.1.1 Nachweis der Pan-Zytokeratinen in trachealen Wild-Typ Epithelzellen (tEpC)

Tracheale Epithelzellen (siehe Abbildung 25) wurden mittels der Immunocytochemie auf das Vorhandensein charakteristischer Zytokeratine untersucht. In Bild 1 wird ein repräsentatives Phasen-Kontrast Foto eines charakteristischen Zellverbands mit trachealen Wild-Typ Epithelzellen sieben Tage nach Isolation gezeigt. In Bild 2 zeigte sich eine unterschiedlich starke grüne Färbung durch α -Pan-Zytokeratin Antikörper C256 (siehe Tabelle 17), die an den grünen Fluoreszenzfarbstoff FITC gekoppelt waren. Die Färbung der Zellkerne erfolgte durch Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs DAPI (blau).

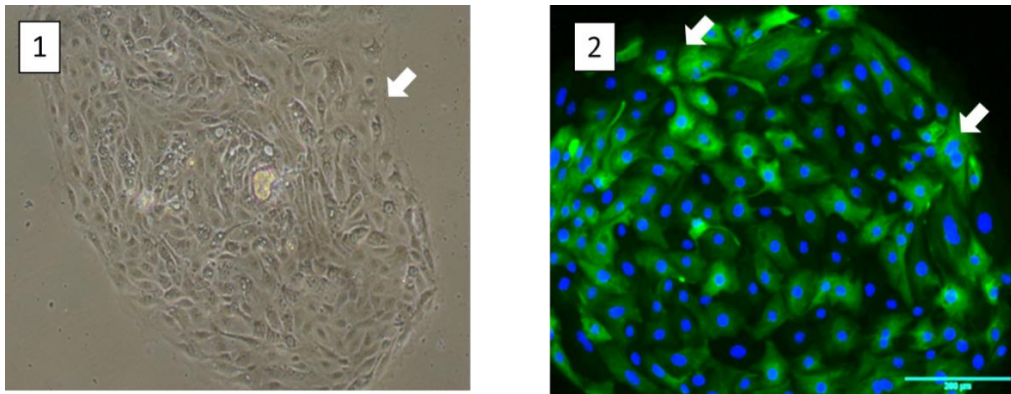


Abbildung 25: Nachweis von Zytokeratinen mittels Immunocytochemie in trachealen Wild-Typ Epithelzellen am siebten Tag nach Isolation. In Bild 1 ist ein typischer Zellverband mit trachealen Epithelzellen im Phasen-Kontrast Modus dargestellt. Der Zytokeratin Nachweis als typischer Epithelzellmarker (grün) erfolgte in Bild 2 mittels α -Zytokeratin-Antikörper (Pan Mixtur) gekoppelt an den Fluoreszenzfarbstoff FITC. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau).

3.1.1.2 Nachweis der Zytokeratinen in bronchialen Wild-Typ Epithelzellen (bEpC)

Bronchiale Wild-Typ Epithelzellen des primären Bronchus (siehe Abbildung 26) wurden wie die trachealen Epithelzellen (siehe Punkt 2.2.8) mittels der Immunocytochemie auf das Vorhandensein von Zytokeratinen untersucht. In Bild 1 ist ein repräsentatives Phasen-Kontrast-Foto eines Zellverbands bronchialer Wild-Typ Epithelzellen sieben Tage nach Isolation dargestellt. Im Bild 2 zeigte sich eine grüne Fluoreszenzfärbung (grün) des gebundenen Anti-Pan-Zytokeratin-Antikörpers C256 (siehe Tabelle 17) gekoppelt an den Fluoreszenzfarbstoff FITC. Die Färbung der Zellkerne erfolgte durch die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs DAPI (blau).

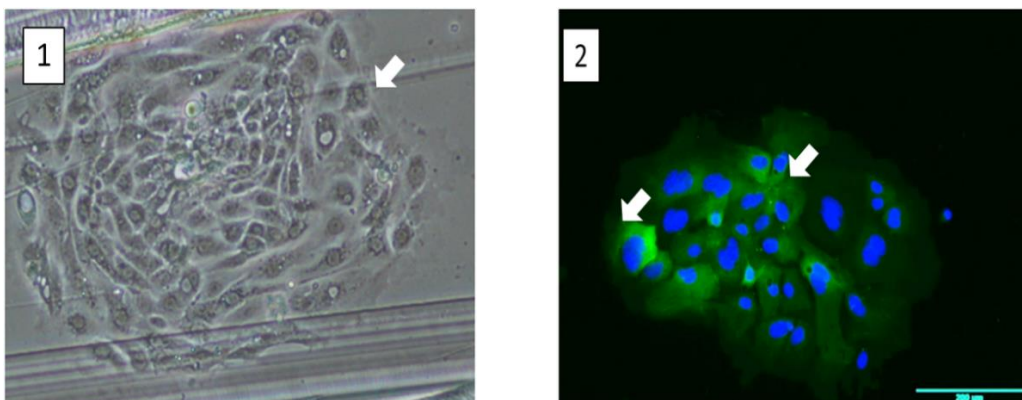


Abbildung 26: Nachweis von Zytokeratinen in primären bronchialen Wild-Typ Epithelzellen am siebten Tag nach Isolation mittels der Immunocytochemie. In Bild 1 wurde ist ein typischer Zellverband bronchialer Epithelzellen im Phasen-Kontrast-Modus dargestellt. Der Zytokeratin Nachweis als typischer Epithelzellmarker (grün) erfolgte in Bild 2 mittels des α -Zytokeratin-Antikörpers (Pan Mixtur) gekoppelt an den Fluoreszenzfarbstoff FITC. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau).

3.1.2 Nachweis von Pro-Surfactant Protein C in primären murinen alveolären Wild-Typ Epithelzellen TypII und Podoplanin in Epithelzellen TypI

Bereits am zweiten Tag nach Isolation wurde der spezifische ATII Zellmarker Pro-Surfactant Protein C (ProSp-C) durch Immunocytochemie mittels des spezifischen polyklonalen Anti-Pro-Surfactant Protein C Antikörpers nachgewiesen (siehe Tabelle 17). Gemäß der Datenlage sollte in Plastikzellkulturschalen sechs Tage nach Isolation eine Ausdifferenzierung der ATII Zellen zu ATI ähnlichen Zellen erfolgen [106]. Podoplanin, ein membranständiges Glykoprotein [124], gilt als charakteristisches Markerprotein für alveoläre Epithelzellen TypI [3, 125]. In „Western Blot“ Analysen (siehe Abbildung 29) konnten durch Verwendung eines Podoplanin-Antikörpers alveoläre Epithelzellen TypI und TypII voneinander unterschieden werden.

3.1.2.1 Nachweis von Pro-Surfactant Protein C durch Immunocytochemie in alveolären Wild-Typ Epithelzellen TypII am zweiten Tag nach Isolation

In Abbildung 27 werden Zellverbände alveolärer Epithelzellen TypII im Phasen-Kontrast-Modus gezeigt (siehe 1). Ein immunocytochemischer Nachweis des spezifischen ATII Zellmarkers Pro-Surfactant Protein C in (siehe 2) erfolgte mittels des Anti-Pro-Surfactant Protein C Antikörpers (grün/AB3786). Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Neben den Epithelzellen TypII (siehe weiße Pfeile) waren zu Beginn der Kultivierung geringe Mengen andersartiger Zellen auf den Objektträgern mikroskopisch sichtbar. Die Reinheit der Zellen betrug ca. 80-90 %.

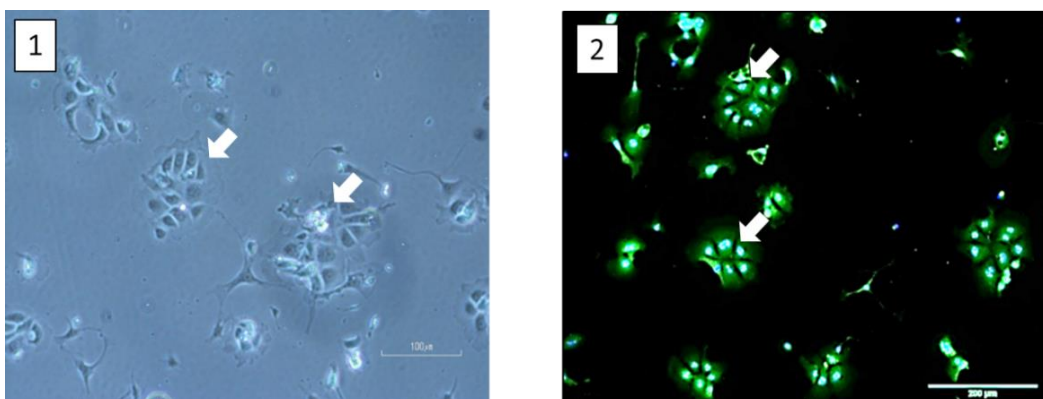


Abbildung 27: Phasen-Kontrast (1) und Immunofluoreszenz (2) Aufnahmen von alveolären Wild-Typ Epithelzellen TypII am zweiten Tag nach Isolation. In Bild 1 werden typische Zellverbände mit ATII Zellen im Phasen-Kontrast-Modus gezeigt. Im Bild 2 wird Pro-Surfactant Protein C (grün) mittels des Anti-ProSP-C Antikörpers, der an den Fluoreszenzmarker FITC gekoppelt ist, als spezifischer ATII-Marker nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau).

3.1.2.2 Nachweis von Pro-Surfactant Protein C und Podoplanin durch Immunocytochemie in alveolären Epithelzellen am sechsten Tag nach der Isolation

Das Phasen-Kontrast Bild (Bild 1, siehe Abbildung 28) zeigt sehr dicht gewachsene alveoläre Epithelzellen sechs Tage nach Isolation der ATII-Zellen in Plastikschalen, die sich nur noch sehr schwach mit den Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen den ATII spezifischen Zellmarker Pro-Surfactant Protein C (ProSP-C) mittels Immunocytochemie anfärben ließen. Der Verlust der Pro-Surfactant Protein C (ProSP-C)-Produktion könnte für eine mögliche Ausdifferenzierung von ATII zu ATI Zellen sprechen. Aus diesem Grund wurde der monoklonale Anti-Podoplanin Antikörper (43 [kDa]) als ATI-Zellmarker in „Western Blot“ Analysen verwendet. Nach Einsatz identischer Proteinmengen wurden Epithel-Zelllysate von Tag zwei und sechs nach der Zellisolation auf das Vorhandensein von Podoplanin (siehe Abbildung 29) untersucht. Mit Zunahme der Kultivierungszeit nahm eindeutig auch die Produktion von Podoplanin zu, was für die Ausbildung von ATI-ähnlichen ATII-Zellen („ATII-ATI like“) spricht. Dieses Projekt wurde in Zusammenarbeit mit dem Master Studenten Benjamin Lukas Heinz durchgeführt. Als Ladekontrolle wurde α -Vinculin durch spezifische Antikörper bei 130 [kDa] identifiziert. Diese Zellen wurden aufgrund der hohen Zelldichte nicht für Ca^{2+} -Einstrom-Experimente verwendet.

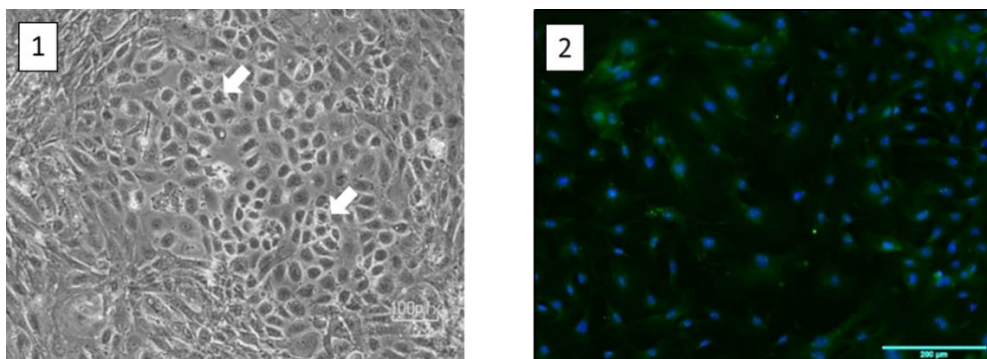


Abbildung 28: Phasen-Kontrast (1) und Immunofluoreszenz (2) Aufnahmen von alveolären Wild-Typ Epithelzellen am sechsten Tag nach der Isolation. In Bild 1 werden die Zellen im Phasen-Kontrast-Modus gezeigt. In Bild 2 wird Pro-Surfactant Protein C (grün) als spezifischer ATII Marker mittels Anti-ProSP-C Antikörper, der an den Fluoreszenzmarker FITC gekoppelt ist, nur noch sehr schwach nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau).

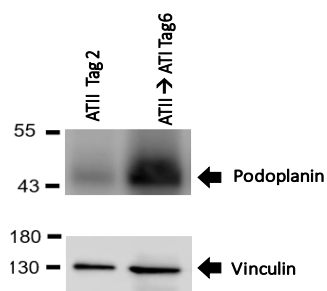


Abbildung 29: Nachweis von Podoplanin mittels „Western-Blot“ in Zelllysaten aus alveolären Wild-Typ Epithelzellen am zweiten und sechsten Tag nach der Präparation. Podoplanin (>43 kDa) wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers in Epithelzellen nach zwei und sechs Tagen in Kultur in Plastikschalen identifiziert. Als Ladekontrolle wurde α -Vinculin durch einen spezifischen Antikörper bei 130 kDa detektiert.

3.1.3 Selektion von Zellen des blutbildenden Systems und Immunzellen mittels der spezifischen Oberflächenmarker CD16/CD32 und CD45

Murine Immun- und Blutzellen wurden während der ATII Isolation (siehe Punkt 2.2.4.1) nach Inkubation mittels Antikörper-beschichteter Zellkulturplatten (α -CD16/CD32/CD45) selektiert. Spezifische Oberflächenmarker CD16, CD32 und CD45 dieser Zellen wurden von den Antikörpern gebunden und verblieben auf der Zellkulturplatte (siehe Abbildung 30), um eine weitere Aufreinigung der ATII Zellsuspension zu erreichen. Aus diesem Zellgemisch wurde, wie in Punkt 2.2.6.2 beschrieben, RNA extrahiert und für die Nanostring® mRNA-Expressionsanalysen verwendet. Allerdings entsprachen Quantität und Qualität der extrahierten RNA dieser Zellen nicht der gewünschten Vorgaben, so dass sich die evaluierten Daten der nSolver® Software nicht eigneten, um statistische Analysen durchführen zu können.

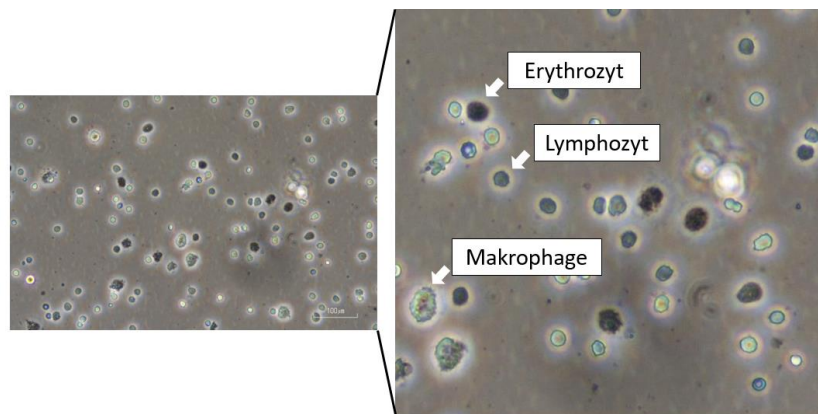


Abbildung 30: Selektion von Zellen des Immun- und blutbildenden Systems durch CD16/CD32 und CD45 Antikörper. Gezeigt werden Makrophagen, Lympho- und Erythrozyten im Phasen-Kontrast-Modus, die während der Isolation alveolärer Epithelzellen TypII identifiziert werden konnten.

3.1.4 Nachweis des murinen und TRPA1-Proteins mittels „Western Blot“ Analysen

Folgende nicht-neuronale Gewebe der Lunge wurden hinsichtlich einer möglichen TRPA1-Expression auf Protein-Ebene in „Western Blot“ Analysen untersucht: Wild-Typ und TRPA1-defiziente Lungen (murin), HEK 293T hTRPA1, HEK 293T mTRPA1 (erhalten durch transiente Transfektion), alveoläre Wild-Typ Epithelzellen TypI und TypII (ATII und ATI WT), präkapilläre arterielle glatte Wild-Typ Muskelzellen (PASM), Wild-Typ Fibroblasten (pmLF) und Endothelzellen (EC). Auf Protein-Ebene konnte ein qualitativer Nachweis des TRPA1-Kanals bei 124 [kDa] in den unterschiedlichen pulmonalen Geweben mittels Immunoblot Analysen unter Verwendung der beiden α -TRPA1 Antikörper Ab68847 und Ab68848 erfolgen (siehe Tabelle 17). Die Expression des murinen TRPA1-Proteins wurde in Wild-Typ Lungenlysat (Ab68847), in alveolären Epithelzellen TypII (Ab68847), Endothelzellen (Ab68847) und Fibroblasten (Ab68848) gezeigt. Als Positivkontrolle wurden transfizierte mTRPA1 HEK 293T Zellen verwendet (siehe Punkt 2.2.3). Murine TRPA1-defiziente Lungen sowie präkapilläre arterielle glatte

Muskelzellen zeigten kein detektierbares Signal für das murine TRPA1-Protein. Als Ladekontrolle wurde bei allen Proben Beta-Aktin mit einem spezifischen Antikörper bei 43 [kDa] detektiert (siehe Tabelle 17).

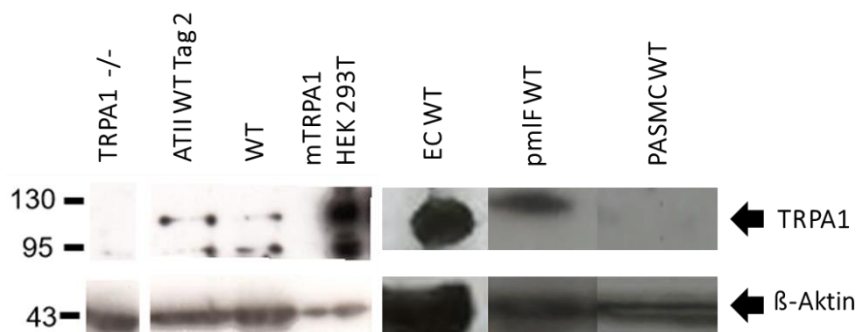


Abbildung 31: Nachweis von TRPA1-Protein (124 kDa) im „Western-Blot“ mittels TRPA1-Antikörpern (AB68847 (Spur 1-4) und Ab68848 (Spur 5-7) in Lungenlysaten (TRPA1^{-/-}, WT), alveolären Wild-Typ Epithelzellen (ATII WT Tag 2), Endothelzellen (EC WT), pulmonalen murinen Lungenfibroblasten (pmLF WT), präkapillären glatten Muskelzellen (PSMC WT). Proteinlysate aus HEK 293T-Zellen, die murinen TRPA1-Kanal transient exprimierten dienten als Positivkontrolle. Als Ladekontrolle wurde β-Aktin durch einen spezifischen Antikörper bei 43 kDa detektiert.

3.2 Isolation von humanem Lungeneithelgewebe mittels der Laser-Mikrodissektion

Abbildung 32 zeigt alle Schritte der Laser-Mikrodissektions-Methode: Hämatoxylin Färbung (1) Lungeneithel (2), Markierung der „Regions of interest“ (ROI/rote Bereiche) (3) Gewebe nach Entfernung der gewünschten Zellschichten in (4).

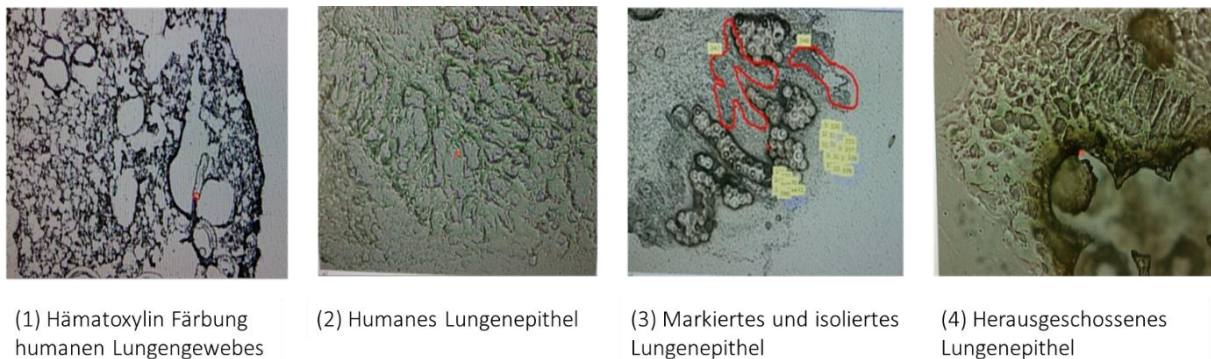


Abbildung 32: Isolation von humanem Lungeneithelgewebe mittels Laser-Mikrodissektion

3.3 Nanostring® mRNA-Expressionsprofil ausgewählter ORAI-, STIM- und TRP-Proteine in neuronalen und nicht-neuronalen Geweben

Die „Primer Pools“ der Nanostring® Technologie bestehen aus einer definierten Auswahl muriner (siehe Punkt 2.1.11.1) bzw. humaner Oligonukleotide (siehe Punkt 2.1.11.2). Deshalb wurde nicht nur das mRNA-Expressionsprofil des TRPA1-Kanals in den unterschiedlichen pulmonalen Geweben quantifiziert (siehe Abbildung 31), sondern auch die mRNA-Expression vieler anderen TRP-Kanälen sowie ORAI- und

STIM-Proteinen evaluiert (siehe Tabelle 49). Im Folgenden werden die generierten mRNA-Daten in den unterschiedlichen murinen und humanen Geweben dargestellt. Die Rohdaten und die normalisierten Werte der gezählten, durch Oligonukleotide gebunden, mRNA-Moleküle („Counts“) wurden durch die nSolver® 3.0 „Software“ ermittelt. Die grafische Darstellung und statistische Auswertung erfolgte mittels Graph Pad Prism.

Punkt 2.1.11 zeigt eine Zusammenfassung der ausgewählten Zielsequenzen, die zur Ermittlung der mRNA-Expression in den unterschiedlichen murinen nicht-neuronalen pulmonalen Geweben und dorsalen Spinalganglien (DRG) eingesetzt wurden. Die mRNA-Expression des murinen und humanen TRPA1-Kanals wird unter Punkt 3.4 im Detail dargestellt. Die Mittelwerte der quantifizierten „Counts“ nach Abzug der Werte der Negativkontrollen aus drei unabhängigen Präparationen werden mit der Standardabweichung des Mittelwerts („standard error of the mean“ (SEM)) dargestellt. Entweder wurde auf die vier Haushaltsgene Beta-Aktin, Beta2-Mikroglobulin, Succinat-Dehydrogenase-Komplex (SdHa) und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert („Normalized DATA“) oder bei einer sehr schwachen mRNA als Rohdaten („RAW DATA“) aufgetragen. Eine Anzahl von weniger als 100 „Counts“ bedeutet eine schwache mRNA-Expression. Zwischen 100-1000 „Counts“ spricht man von einer moderaten und über 1000 „Counts“ von einer starken mRNA-Expression. Da sich die mRNA der untersuchten Zielsequenzen (ORAI-, STIM- und TRP-Kanäle) zum größten Teil im schwachen bis moderaten Expressionsbereich befand, wurden 200 ng (Herstellerempfehlung 50 ng mRNA) native mRNA verwendet. Das Maximum von 2.000.000 „Gesamtcounts“ (Summe aller „Counts“) wurde in keiner der Messungen auch nur annähernd erreicht.

3.3.1 MRNA-Expressionsprofil für ORAI-, STIM- und TRP-Proteine in immortalisierten Zelllinien

3.3.1.1 HEK 293T hTRPA1 versus HEK 293T Wild-Typ Zellen

Die von Dr. Thomas Büch bereitgestellten HEK 293T Zellen, die den humanen TRPA1 Kanal stabil exprimieren, wurden im Vergleich zur HEK 293T Wild-Typ Negativkontrolle auf das mRNA-Expressionsprofil ausgewählter ORAI-, STIM- und TRP-Proteine untersucht. In Abbildung 33 werden die normalisierten Daten („Counts“) dreier unterschiedlicher Zellpassagen dargestellt. Innerhalb der hTRPA1 HEK 293T-Zelllinie wurde mit 19032 „Counts“ im Vergleich zu 42 „Counts“ in der Wild-Typ Kontrolle eine sehr stark signifikant erhöhte TRPA1 mRNA-Expression ($p < 0,01$) gemessen. Die untersuchten Zelllinien zeigten bis auf eine signifikante Abweichung innerhalb der „Counts“ für TRPC1 ($p < 0,05$) keine weiteren Unterschiede in der mRNA-Expression. Getestet wurde mittels „Mann-Whitney t-Test“. Die Daten wurden als normalisierte Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) angegeben.

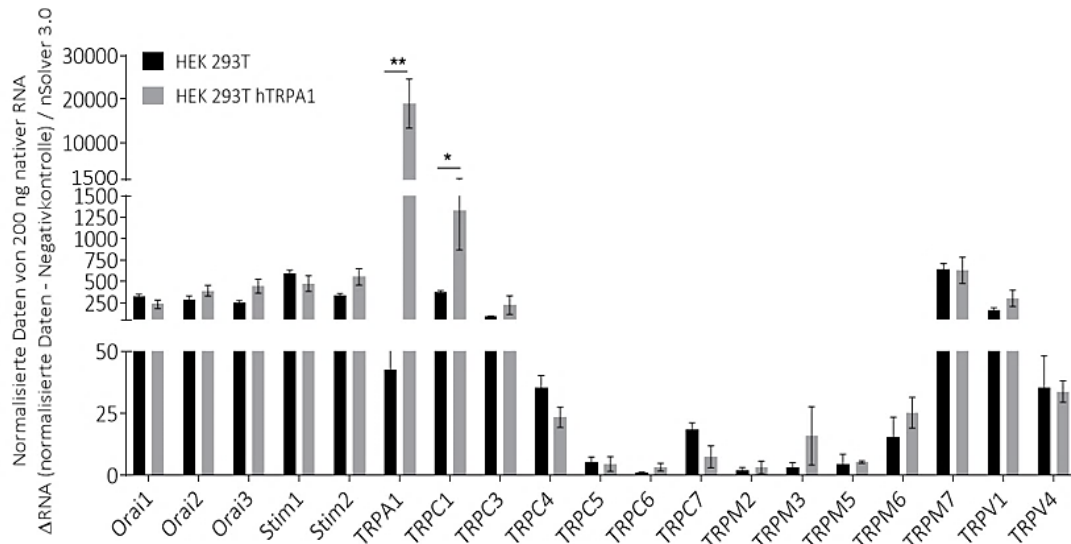


Abbildung 33: Nanostring® mRNA-Expressionsprofile für ORAI-, STIM- und TRP-Proteine in HEK 293T Zellen (HEK 293T) und stabil hTRPA1-exprimierenden HEK 293T Zellen (HEK 293T hTRPA1). Darstellung der normalisierten Daten minus der Werte der Negativkontrollen aus 200 ng nativer mRNA. Ausgewertet mittels nSolver® 3.0 und „Mann-Whitney t-Test“. Die Daten entsprechen den normalisierten Mittelwerten mit Angabe des Standardfehlers (+/-SEM).

3.3.1.2 A 549 Zellen

Die immortalisierte humane Epithelzelllinie A 549 wurde auf ihr mRNA-Expressionsprofil in Abbildung 34 untersucht. Da die „Counts“ für TRPC6, TRPM3, TRPM5, TRPM6 und TRPV4 weniger als das Doppelte der Negativkontrolle entsprachen und nicht signifikant zur Negativkontrolle sind, ist hier keine mRNA Expression nachweisbar. ORAI und STIM mRNA war neben TRPC1, TRPC4, TRPM2 und TRPM7 mit 100-1000 „Counts“ moderat vertreten. Die übrigen Zielsequenzen TRPA1, TRPC3 und TRPC7 zeigten mit einem

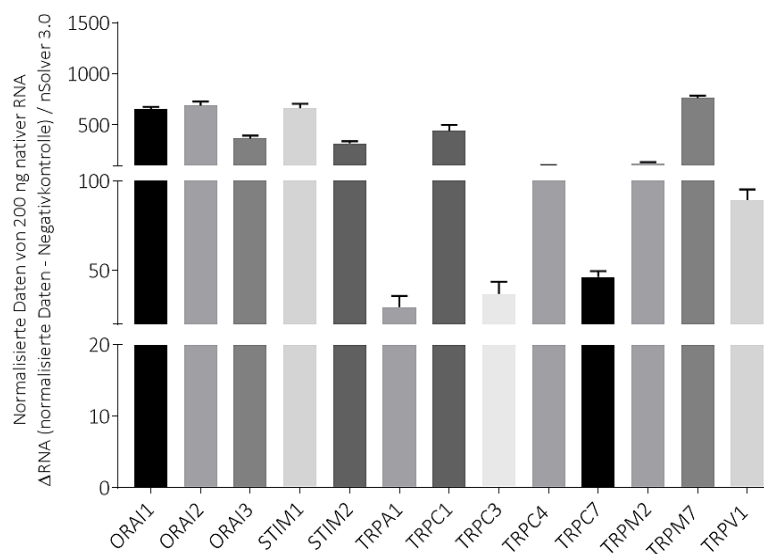


Abbildung 34: Nanostring® mRNA-Expressionsprofile für ORAI-, STIM- und TRP-Proteine in A 549 Zellen. Darstellung der normalisierten Daten minus der Werte der Negativkontrolle aus 200 ng nativer RNA. Ausgewertet mittels nSolver® 3.0. Die Daten entsprechen der normalisierten Mittelwerte mit Angabe des Standardfehlers (+/-SEM).

Resultat geringer als 100 „Counts“ eine eher schwache mRNA-Expression. Die Daten wurden als normalisierte Mittelwerte unter Angabe des Standardfehlers des Mittelwerts (SEM) dargestellt.

3.3.2 mRNA-Expressionsprofil für ORAI-, STIM- und TRP-Proteine in murinen Geweben

3.3.2.1 mRNA-Expression in Lungengewebe

Das mRNA-Expressionsprofil für ORAI-, STIM- und TRP-Proteine in murinen Lungengewebe wird in Abbildung 35 gezeigt. STIM1, STIM2, STIM3, TRPM6 und TRPM7 zeigten mit einem Wert von circa 1000 „Counts“ eine starke mRNA-Expression in der murinen Lunge. Die höchste mRNA-Expression zeigt TRPC6 im blutfreien Gesamtlungenlysat

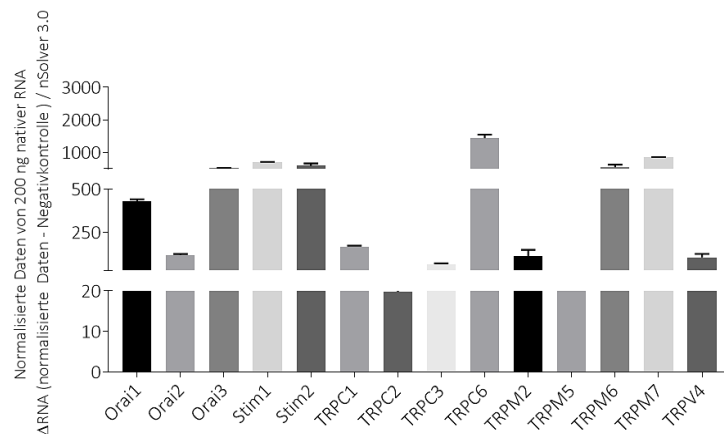


Abbildung 35: Nanostring® mRNA-Expressionsprofil für ORAI-, STIM- und TRP-Proteine in murinen Lungengewebe. Darstellung der normalisierten Daten minus der Werte der Negativkontrollen aus 200 ng nativer RNA. Ausgewertet mittels nSolver® 3.0. Die Daten entsprechen der normalisierten Mittelwerte mit Angabe des Standardfehlers (+/-SEM).

mit einem normalisierten Mittelwert von 1440 „Counts“. Eine derart starke mRNA-Expression konnte in keiner Probe der pulmonalen Zellen gemessen werden. Der höchste Wert mit 400 „Counts“ wurde in alveolären Epithelzellen TypI (siehe Abbildung 37) erhalten. Alle Daten wurden als normalisierte Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt.

3.3.2.2 mRNA-Expression in alveolären Epithelzellen TypII

In Abbildung 36 folgte die Auswertung der mRNA-Expressionsprofile für ORAI-, STIM- und TRP-Proteine in alveolären Epithelzellen TypII (ATII). In diesen Zellen wurde eine moderate bis starke mRNA-Expression für ORAI1, ORAI3, STIM1, STIM2, TRPM7 und TRPV4 gemessen. TRPC4-, TRPC5-, TRPC7, TRPM3- und TRPV1- mRNA war in diesen Zellen nicht nachweisbar. Die übrigen Zielsequenzen wurden

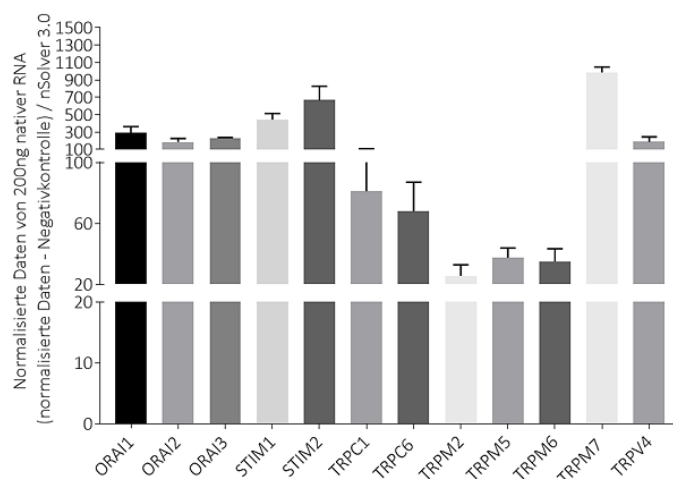


Abbildung 36: Nanostring® mRNA-Expressionsprofil von ORAI-, STIM- und TRP-Proteine in primären alveolären Epithelzellen TYP II. Darstellung der normalisierten Daten minus der Werte der Negativkontrollen aus 200 ng nativer RNA. Ausgewertet mittels nSolver® Software 3.0. Die Daten entsprechen der normalisierten Mittelwerte mit Angabe des Standardfehlers (+/-SEM).

im schwachen bis moderaten Bereich (< 100 „Counts“) exprimiert. Alle Daten werden als normalisierte Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) dargestellt.

3.3.2.3 mRNA-Expression in alveolären Epithelzellen TypI

Wie in Punkt 2.2.4.1 beschrieben, konnte nach sechs Tagen eine Ausdifferenzierung der alveolären Epithelzellen TYP II zu Typ I [106] auf Protein-Ebene (siehe Punkt 3.1.2) beobachtet werden. Die mRNA-Expression für sämtliche ORAI- und STIM-Proteine war moderat bis stark (100-1000 „Counts“). Für TRPM7-mRNA wurde der höchste Wert mit fast 2000 „Counts“ gemessen (siehe Abbildung 37). Im

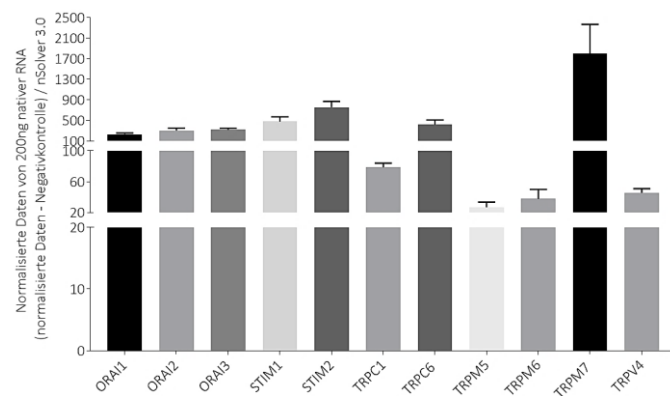


Abbildung 37: Nanostring® mRNA-Expressionsprofil für ORAI-, STIM- und TRP-Proteine in primären alveolären Epithelzellen TypI. Darstellung der normalisierten Daten minus der Werte der Negativkontrollen aus 200 ng nativer RNA. Ausgewertet mittels nSolver® 3.0. Die Daten entsprechen der normalisierten Mittelwerte mit Angabe des Standardfehlers (+/-SEM).

Vergleich zu alveolären Epithelzellen Typ II konnte eine Steigerung der mRNA-Expression für TRPM7-Kanäle in ATI Zellen um circa 50 % beobachtet werden. Alle Daten entsprechen den normalisierten Mittelwerten bezogen auf die vier Haushaltsgene mit „Standard error of the mean“ (+/-SEM).

3.3.2.4 Vergleich der mRNA-Expression für ORAI-, STIM- und TRP-Proteine in alveolären Epithelzellen Typ II mit Typ I

Durch einen Vergleich von alveolären Epithelzellen Typ II (Tag drei) zu Typ I (Tag sechs) wurden Veränderungen im mRNA-Expressionsprofil ausgewählter ORAI-, STIM- und TRP-Proteine dargestellt (siehe Abbildung 38). TRPM7 zeigte am sechsten Tag nach Präparation mit 983 zu 1799 „Counts“ eine sehr deutliche, aber nicht signifikante Steigerung der mRNA-Expression in alveolären Epithelzellen Typ II im Vergleich zu Typ I. Des Weiteren wurde eine signifikante Zunahme der TRPC6-mRNA (68 versus 418 „Counts“) ermittelt. Am dritten Tag nach Präparation zeigte TRPV4 mit 200 „Counts“ in alveolären Epithelzellen Typ II eine moderate mRNA-Expression. Diese Expressionsrate konnte am sechsten Tag in den ausdifferenzierten ATI Zellen nicht mehr gemessen werden, sondern nur noch ein sehr schwaches Vorhandensein von TRPV4 mit 45 „Counts“. Für die übrigen Zielsequenzen wurden keine Unterschiede in der mRNA-Expressionsstärke festgestellt. Getestet wurde mittels nicht-parametrischen „Mann-Whitney t-Test“ mit Angabe des „Standard error of the mean“ (SEM).

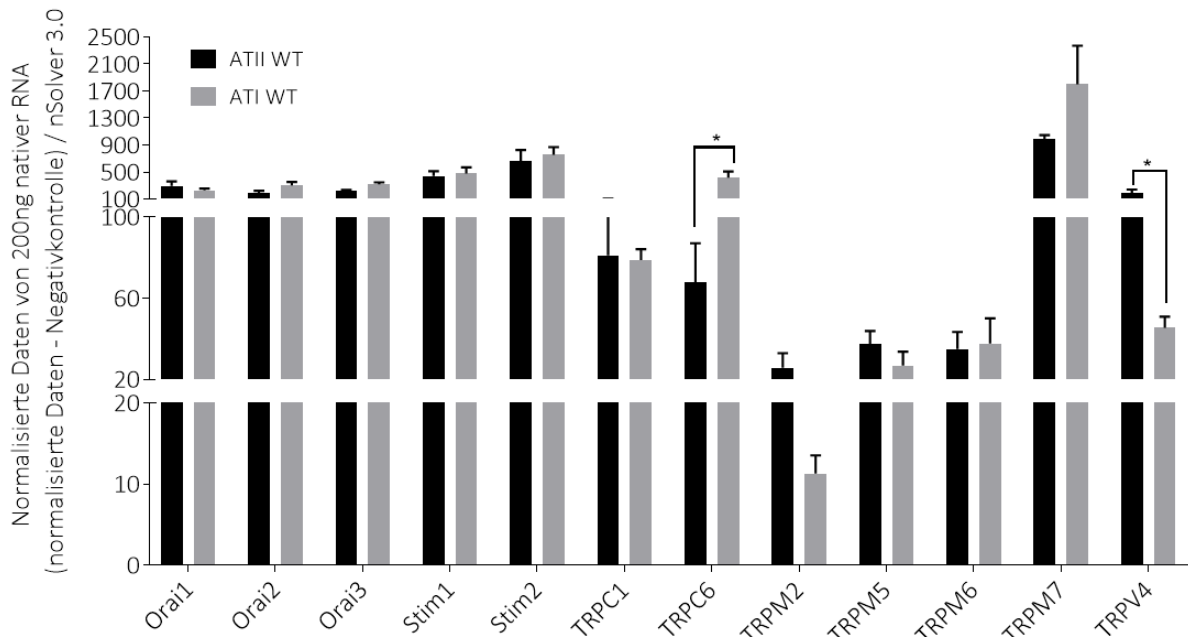


Abbildung 38: Nanostring® mRNA-Expressionsprofile für ORAI-, STIM- und TRP-Proteinen in alveolären Epithelzellen **TypII** und **TypI**. Darstellung der normalisierten Daten minus der Werte der Negativkontrollen aus 200 ng nativer RNA. Ausgewertet mittels nSolver® Software 3.0. Die Daten entsprechen der normalisierten Mittelwerte (+/-SEM).

3.3.2.5 mRNA-Expressionsprofil in Endothelzellen der Lungengefäße

In Abbildung 39 wurde die mRNA-Expression von ORAI-, STIM- und TRP-Proteine in primären Endothelzellen (EC) untersucht. In den Proben wurden ORAI1-, ORAI2-, ORAI3-, TRPC3-, TRPC6-, TRPM7- und TRPV4-mRNA mit fast 500 „Counts“ moderat exprimiert. TRPC1- und TRPM2- TRPM3-mRNAs wurden in den endothelialen murinen Zellen mit weniger als 100 „Counts“ eher

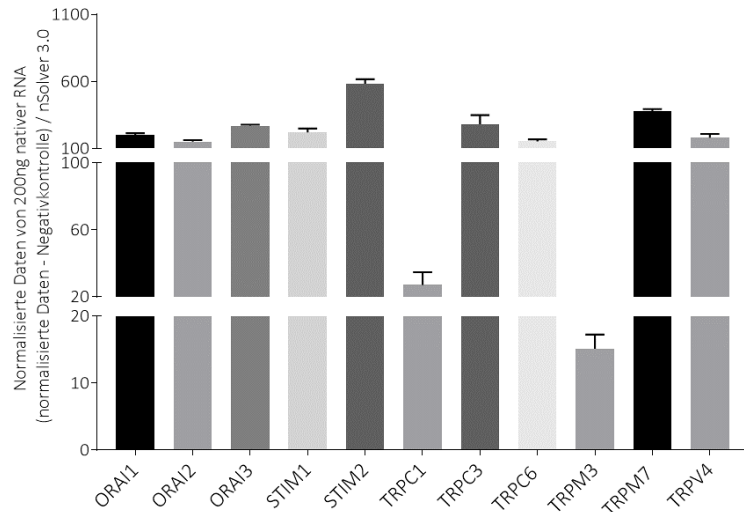


Abbildung 39: Nanostring® mRNA-Expressionsprofile für ORAI-, STIM- und TRP-Proteine in primären Endothelzellen. Darstellung der normalisierten Daten minus der Werte der Negativkontrollen von 200 ng nativer RNA. Ausgewertet mittels nSolver® 3.0. Die Daten entsprechen der normalisierten Mittelwerte mit Angabe des Standardfehlers (+/-SEM).

schwach produziert. TRPC2-, TRPC4-, TRPC5-, TRPC7-, TRPM6-, TRPM7- und TRPV1-mRNAs wurden nicht nachgewiesen. Es handelt sich um normalisierte Daten mit Angabe des Standardfehlers (+/-SEM).

3.3.2.6 mRNA-Expressionsprofile in Fibroblasten

Die Untersuchung des mRNA-Expressionsprofils in murinen Lungenfibroblasten (pmLF) ergab für TRPM7 mit fast 1000 „Counts“ den höchsten Wert (siehe Abbildung 40). ORAI1-, ORAI2-, ORAI3-, STIM1-, STIM2-, TRPC1- und TRPV4-mRNAs wurden mit über 100 bis 500 „Counts“ moderat exprimiert. In Fibroblasten wurde die mRNA von TRPM2, TRPM5 und TRPC6 mit weniger als 50 „Counts“ sehr schwach quantifiziert. Alle

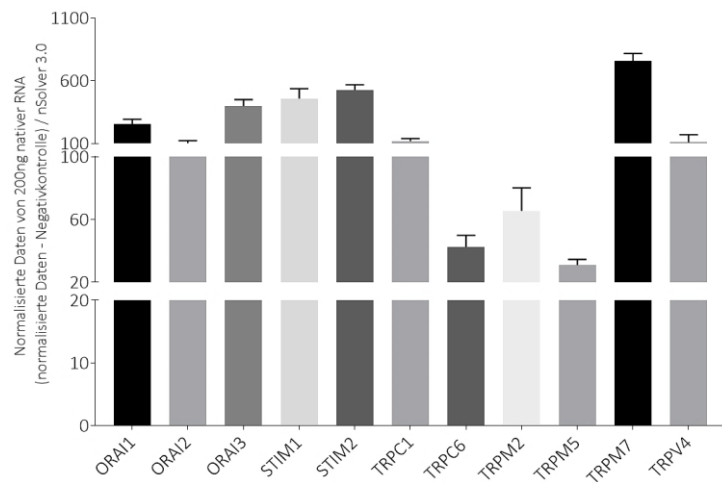


Abbildung 40: Nanostring® mRNA-Expressionsprofile für ORAI-, STIM- und TRP-Proteinen in primären Lungenfibroblasten. Darstellung der normalisierten Daten minus der Werte der Negativkontrollen von 200 ng nativer RNA. Ausgewertet mittels nSolver® 3.0. Die Daten entsprechen der normalisierten Mittelwerte mit Angabe des Standardfehlers (+/-SEM).

übrigen Zielsequenzen wurden in den untersuchten Proben nicht nachgewiesen. Alle in Abbildung 40 gezeigten Daten sind normalisierte Mittelwerte bezogen auf die vier Haushaltsgene mit Standardfehler des Mittelwerts (+/-SEM).

3.3.2.7 mRNA-Expression in präkapillären arteriellen glatten Muskelzellen

Das mRNA-Expressionsprofil von präkapillären glatten Muskelzellen (PASMC) ähnelte sehr stark dem Profil für Fibroblasten (siehe Abbildung 41). Nur TRPC6 wurde eine sechsfach stärkere mRNA-Expression in präkapillären glatten Muskelzellen im Vergleich zu Fibroblasten ermittelt (216 versus 42 „Counts“). TRPM2, TRPM3, TRPM5 sowie TRPV4 wurden sehr schwach quantifiziert. Bei den übrigen TRPC-Kanälen wurden sehr geringe „Counts“ gezählt, dass

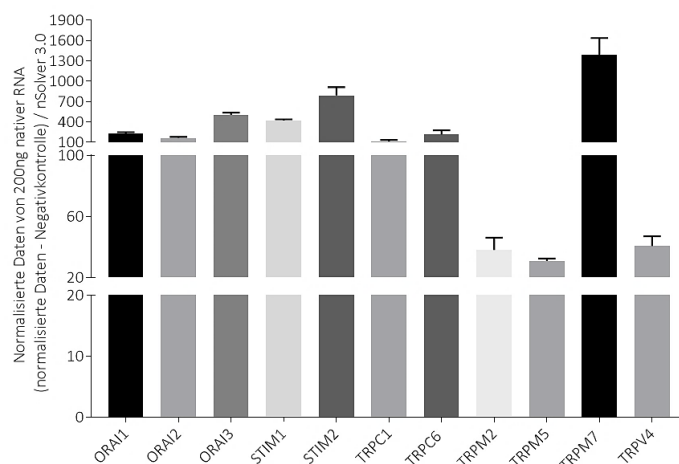


Abbildung 41: Nanostring® mRNA-Expressionsprofil für ORAI-, STIM- und TRP-Proteine in präkapillären arteriellen glatten Muskelzellen. Darstellung der normalisierten Daten minus der Werte der Negativkontrolle von 200 ng nativer RNA. Ausgewertet mittels nSolver® 3.0. Die Daten entsprechen der normalisierten Mittelwerte mit Angabe des Standardfehlers (+/-SEM).

diese neben TRPM6 und TRPV1 auf mRNA-Ebene nicht exprimiert wurden. Die in Abbildung 41 gezeigten Daten sind auf die vier Haushaltsgene normalisierte Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwerts (+/-SEM).

3.3.2.8 mRNA-Expressionsprofil trachealer Epithelzellen

Die mRNA-Expression von ORAI-, STIM- und TRP-Kanäle in trachealen Epithelzellen ist in Abbildung 42 dargestellt. Wie in allen untersuchten nicht-neuronalen Lungengewebe wurden ORAI- und STIM-mRNAs moderat exprimiert (100-1000 „Counts“). Für die TRPM7-mRNA konnte mit 1000 „Counts“ der höchste Wert ermittelt werden. TRPC1-, TRPC6- und TRPM6-mRNA zeigten mit weniger als 100 „Counts“ eine schwache

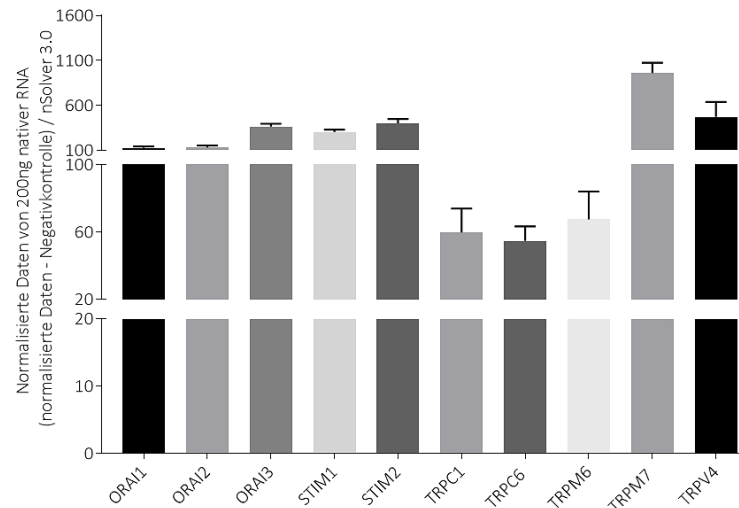


Abbildung 42: Nanostring® mRNA-Expressionsprofil von ORAI-, STIM- und TRP-Kanäle in trachealen Epithelzellen. Darstellung der normalisierten Daten minus der Negativkontrolle von 200 ng nativer RNA. Ausgewertet mittels nSolver® 3.0. Die Daten entsprechen der normalisierten Mittelwerte (+/-SEM).

Expression. Alle anderen TRPCs, TRPM2, TRPM3, TRPM5 und TRPV1 konnten nicht in trachealen Epithelzellen auf RNA-Ebene quantifiziert werden. Alle in Abbildung 42 gezeigten Daten sind auf die vier Haushaltsgene normalisierte Mittelwerte mit „Standard error of the mean“ (+/-SEM).

3.3.3 mRNA-Expressionsprofil von ORAI-, STIM- und TRP-Proteinen in humanen Primärgewebe

Aus frischen humanen Biospieproben der Lunge der Firma Cultex® wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Dirk Steinritz an der Sport Universität Köln in der Arbeitsgruppe von Prof. Diel mittels Laser-Mikrodissektions-Methode Zellmaterial isoliert. Es handelte sich größtenteils um sehr knorpeliges Material mit nur wenigen lungenspezifischen Zellen.

3.3.3.1 mRNA-Expressionsprofil in humanem Lungengewebe

Aufgrund des begrenzten Lungenbiospiematerials sind die in Abbildung 43 dargestellten Expressionsprofile für ORAI-, STIM- und TRP-mRNAs nicht repräsentativ für das humane Lungengewebe.

Der höchste Wert konnte für STIM2-mRNA mit fast 200 „Counts“ gemessen werden. ORAI1-, ORAI2-, ORAI3-, TRPC1-, TRPC6-, TRPM7- und TRPV4-mRNAs wurde mit weniger als 100 „Counts“ nur schwach exprimiert. TRPA1-, TRPC3-, TRPC4-, TRPC5-, TRPC7-, TRPM2-, TRPM3-, TRPM5- und TRPM6-mRNA war nur sehr schwach bzw. nicht den untersuchten Lungengewebe vorhanden. Alle in Abbildung 43

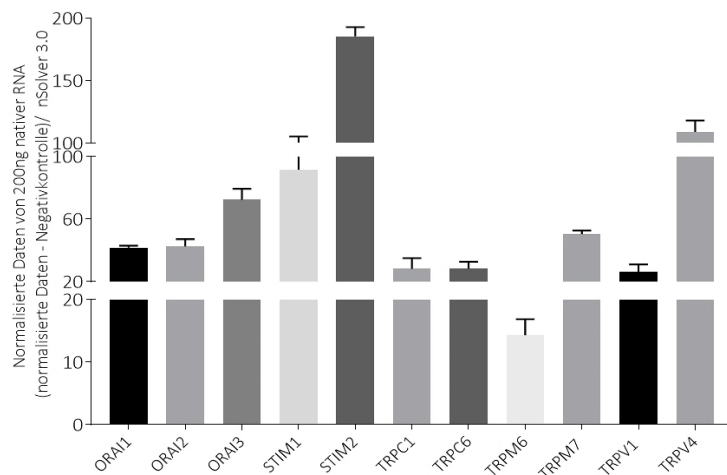


Abbildung 43: Nanostring® mRNA-Expressionsanalyse von humanen Lungengewebe. Darstellung der normalisierten Daten minus der Negativkontrolle von 200 ng nativer RNA (n=3). Ausgewertet mittels nSolver® 3.0. Die Daten entsprechen der normalisierten Mittelwerte mit Angabe des Standardfehlers (+/-SEM).

gezeigten Daten sind auf die vier Haushaltsgene normalisierte Mittelwerte mit „Standard error of the mean“ (+/-SEM).

3.3.4 mRNA-Expressionsprofil von ORAI-, STIM- und TRP-Proteinen in dorsalen Spinalganglien (DRG)

Abbildung 44 zeigt das mRNA-Expressionsprofil ausgewählter ORAI-, STIM- und TRP-Proteinen in murinen dorsalen Spinalganglien („dorsal root ganglia (DRG)“). In den DRGs wurden TRPC2- und TRPM5-mRNAs mit geringen „Counts“ sehr schwach exprimiert. Alle weiteren Zielsequenzen waren mit 100-1000 „Counts“ moderat bis sehr stark vertreten. Die

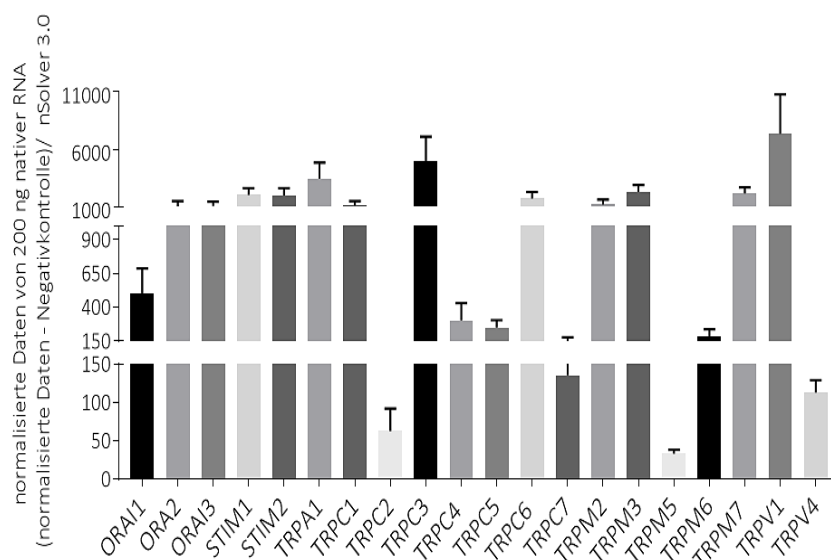


Abbildung 44: Nanostring® mRNA-Expressionsprofile für ORAI-, STIM- und TRP-Proteine in murinen dorsalen Spinalganglien. Darstellung der normalisierten Daten minus der Werte der Negativkontrollen aus 200 ng nativer RNA (n=3). Ausgewertet mittels nSolver® 3.0. Die Daten entsprechen der normalisierten Mittelwerte (+/-SEM).

stärkste mRNA-Expression wurde für TRPA1, TRPV1 und TRPC3 mit ca. 5000 „Counts“ gemessen. Die Expressionsanalyse in DRGs dient als Positivkontrolle für die verwendeten TRPA1-Oligonukleotide und

die Nanostring®-Technologie, da TRPA1-mRNA in diesem Zelltyp bereits mehrfach nachgewiesen werden konnte [51].

3.3.5 mRNA-Expressionsprofile von ORAI-/ STIM- und TRP-Proteinen in murinen Lungengeweben

Eine Zusammenfassung der mRNA-Expressionsprofile normalisiert auf die vier Haushaltsgene aller analysierten ORAI-, STIM- und TRP-Proteine ist in Tabelle 49 dargestellt.

Gezeigt werden die auf die vier Haushaltsgene normalisierten Daten. Keine mRNA-Expression wurde mit einem Minuszeichen (-) markiert. Die Additionszeichen (+, ++, +++ und +++) der Tabelle entsprechen einer schwachen (0-100 „Counts“), einer moderaten (100-1000 „Counts“), einer starken (1000-10000 „Counts“) und bis zu einer sehr starken (>10000 „Counts“) mRNA-Expression in den unterschiedlichen pulmonalen primären Geweben. Der Sättigungsbereich mit maximal 20.000 „Counts“ wurde für keine mRNA in den untersuchten Geweben erreicht.

Tabelle 49: Nanostring® Zusammenfassung der ermittelten mRNA-Expressionsprofile von ORAI-, STIM- und TRP-Proteinen in primären murinen pulmonalen Wild-Typ Geweben mit Hilfe der Nanostring®-Technologie. Darstellung einer starken (+++), moderaten (++) und schwachen (+) und nicht vorhandenen (-) mRNA-Expression an Hand der „Counts“. Siehe Text für weitere Details. (Abkürzungen: ORAI für „Calcium release-activated calcium channel protein“, STIM für „stromal interaction molecule“, TRPC für transient receptor potential cationical, TRPM für transient receptor potential melastatin, TRPV für transient receptor vanilloid).

Gen	Lunge	ATII WT	ATI WT	tEpC	EC	pmlF	PASMC	DRG
ORAI1	++	++	++	++	++	++	++	+
ORAI2	++	++	++	++	++	+	++	+++
ORAI3	++	++	++	++	++	++	++	+++
STIM1	++	++	++	++	++	++	++	+++
STIM2	++	++	++	++	++	++	++	+++
TRPC1	++	+	+	+	+	++	++	+++
TRPC2	+	-	-	-	-	-	-	-
TRPC3	+	-	-	-	+	+	-	+++
TRPC4	-	-	+	-	-	-	-	++
TRPC5	+	-	-	-	-	-	-	+
TRPC6	+++	+	++	+	++	+	++	+++
TRPC7	-	-	-	-	-	-	-	+
TRPM2	++	+	+	+	+	+	+	+++
TRPM3	-	-	-	-	+	-	+	+++
TRPM5	+	+	+	+	-	+	+	-
TRPM6	+++	+	+	+	+	-	-	+
TRPM7	+++	+++	+++	++	++	++	+++	+++
TRPV1	-	-	-	-	-	-	-	+++
TRPV4	++	++	+	++	+	++	+	+

3.4 Nanostring® mRNA-Expressionsprofil von TRPA1 in nicht-neuronalen Zellen und in Lungengewebe

3.4.1 mRNA-Expression des TRPA1-Kanals in primären murinen Geweben

Die Isolation von TRPA1-mRNA wurde in nicht-neuronalen Lungenzellen unter Punkt 2.2.6 beschrieben und mittels der Nanostring® mRNA-Expressionsanalyse gezählt. Während der Etablierung und Optimierung der Nanostring® Methode kristallisierte sich zu Beginn der Messungen eine schwache TRPA1 mRNA-Expression in den untersuchten Geweben heraus. Isolierte TRPA1-mRNA aus dorsalen Spinalganglien (DRGs) wurde als Positivkontrolle für die mRNA-Expressionsanalyse verwendet, da in diesen neuronalen Geweben bekannterweise die stärkste TRPA1-mRNA Expression erfolgt. In Abbildung 45 wird die TRPA1-mRNA Expression in den unterschiedlichen primären Geweben nach Subtraktion der Negativkontrolle mittels fluoreszierender Oligonukleotide als normalisierte Daten dargestellt.

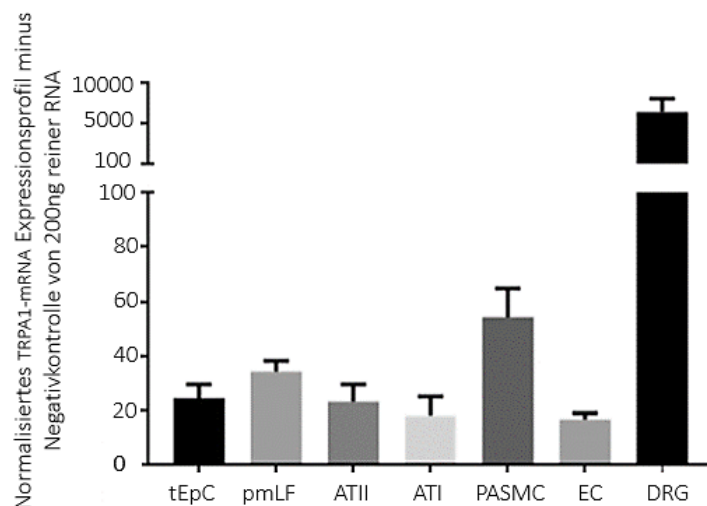


Abbildung 45: Nanostring® mRNA-Expressionsprofil des TRPA1-Kanals in primären Geweben. Darstellung der normalisierten Daten (n=3) der Werte der Negativkontrollen aus 200 ng nativer RNA (tEpC=tracheale Epithelzellen, pmLF=primäre murine Lungenfibroblasten, ATII/ATI = Alveoläre Epithelzellen TypII/TypI, PASMCM = präkapilläre glatte Muskelzellen, Endothelzellen, DRG = Dorsale Spinalganglien). Ausgewertet mittels nSolver® 3.0. Die Daten entsprechen der normalisierten Mittelwerte (+/-SEM).

Um die TRPA1-mRNA Expression im Allgemeinen mit der TRP-mRNA Expression vergleichen zu können, wurden die Daten auf die quantifizierte TRPM7-mRNA normalisiert, da es sich um die am häufigste exprimierte mRNA unter den TRP-mRNAs handelt. In Abbildung 46 werden die Daten als prozentuale mRNA-Expression von TRPM7 in allen Zelltypen zusammengefasst. In nicht-neuronalen Lungenzellen war die TRPA1-mRNA Expression um das 100 bis 200 fache niedriger als die Messungen im neuronalen Gewebe der dorsalen Spinalganglien. Die niedrigste TRPA1-mRNA Expressionsrate wurde in pulmonalen Endothelzellen gemessen und deren höchste Expression in den PASMCMs quantifiziert.

Zusammenfassend konnten sehr geringe Expressionsraten der TRPA1-mRNA in den untersuchten primären pulmonalen Zellen detektiert werden.

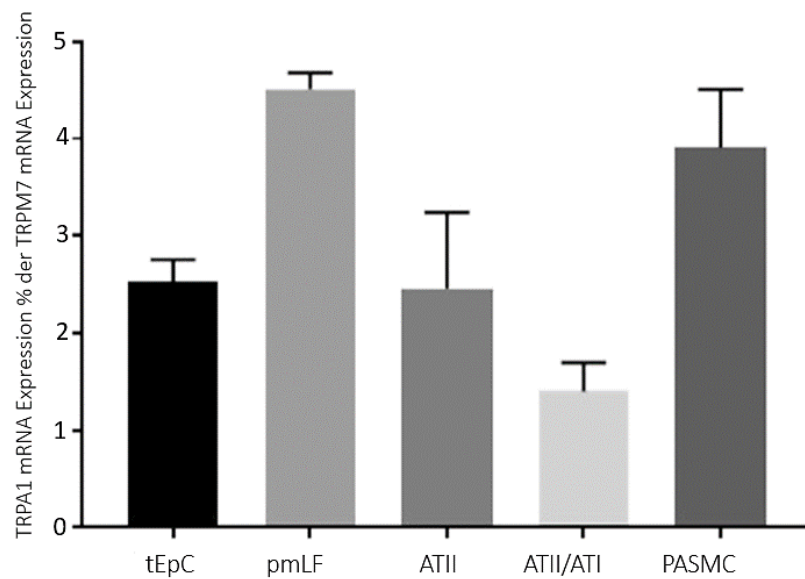


Abbildung 46: Nanostring® Einzelmessungen der „Counts“ des murinen TRPA1-Kanals in pulmonalen Geweben. Darstellung von Δ Rohdaten (RAW Data-Negativkontrolle) von 200 ng nativer RNA (n>3), ausgewertet mittels nSolver® 3.0. Die Daten entsprechen der Einzelmessungen mit Angabe des Standardfehlers (+/-SEM).

3.5 Analysen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in Zelllinien und primären Zellen nach Stimulation mit TRPA1-Kanal-Aktivatoren und Inhibitoren sowie mit kalten, hypoxischen bzw. hyperoxischen Lösungen

Nach Beladung der jeweiligen Zellen mit dem Calciumindikator Fura-2-AM (siehe Punkt 2.2.9) wird der Quotient der Fluoreszenzemissionen nach Exzitation mit Licht der Wellenlängen von 340 und 380 nm (Ratio 340nm/380nm) zu jedem Zeitpunkt vor und nach der Stimulation der Zellen berechnet. Alle Messwerte sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Zellen aus Zelllinien oder Primärzellen aus drei unterschiedlichen Mäusen gleichen Genotyps, die zusammen mit dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) (grauer Bereich) dargestellt werden. Eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) nach Stimulation wurde durch die Berechnung der Flächen unter der Kurve („Area under the curve“ (AUC)) quantifiziert und im Punktdiagramm dargestellt. Anschließend wurde nach vorheriger Testung auf parametrische bzw. nicht-parametrische Verteilung der zweiseitige t-Test für zwei Gruppen bzw. die Varianzanalyse „Two-way Anova“ für vier Gruppen durchgeführt. Signifikante Unterschiede werden durch die Verwendung von einem (für p -Werte $\leq 0,05$), zwei (für $p < 0,05$) oder drei Sternen ($p < 0,001$) dargestellt.

3.5.1 Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in einer stabil TRPA1 exprimierenden humanen HEK 293T-Zelllinie

3.5.1.1 TRPA1-Kanal Aktivierung durch Allylisothiocyanat und Inhibition durch A-967079

Die Expression des humanen TRPA1-Kanals in HEK 293T hTRPA1 Zellen konnte auf mRNA- (siehe Abbildung 33) und auf Protein-Ebene (siehe Abbildung 31) nachgewiesen werden. In Abbildung 47 sind die Ergebnisse von Ca^{2+} -Einstrom-Experimente mit diesen Zellen dargestellt. Zwei Minuten nach Beginn der Messung wurde HBBS-Kontrolllösung (HBSS) hinzugegeben und anschließend der TRPA1-Kanal-Aktivator Allylisothiocyanat (AITC) ($10 \mu\text{M}$

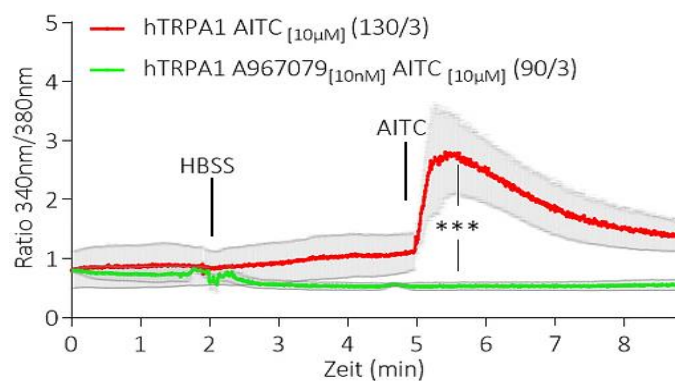


Abbildung 47: Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Applikation des TRPA1-Aktivators Allylisothiocyanat (AITC) auf HEK 293T-Zellen, die den TRPA1-Kanal stabil exprimieren und Inhibition durch den TRPA1-Inhibitor A967079. Die rote Kurve zeigt die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in HEK 293T hTRPA1 Zellen nach Applikation von AITC ($10 \mu\text{M}$ final) Stimulation. In der grünen Kurve wird die Erhöhung der intrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch die Anwesenheit des Inhibitors A-967079 (10nM final) gehemmt. Darstellung der Messwerte als Quotienten der Fluoreszenzwerte nach Exzitation bei 340nm und 380nm (Ratio 340nm/380nm) als Mittelwerte (Linien) +/- Standardfehler des Mittelwerts (graue Bereiche). *** = $p < 0,001$ ($n=3$ unabhängige Experimente mit 130 (rote Kurve) bzw. 90 (grüne Kurve) Zellen).

final) appliziert. Die Zugabe von HBSS nach zwei Minuten führte zu keiner Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Nach der Applikation von AITC wurde eine Erhöhung des Fluoreszenzquotienten (Ratio von 340 nm zu 380 nm) durch Zunahme der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ gemessen. Mit Anwesenheit des TRPA1-Inhibitors A967079 (10 nM final) [60] im HBSS-Puffer war keine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Applikation von AITC sichtbar (grüne Kurve in Abbildung 47).

In Abbildung 47 wird die Inhibition der AITC-induzierten intrazellulären Ca^{2+} -Erhöhung durch Zugabe des TRPA1-Hemmstoffs A967079 vor Beginn der Messung gezeigt. Ein Vergleich der Flächen unter den Kurven (siehe Abbildung 48) zeigt eine signifikante Verringerung der AITC-induzierten Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (p -Wert < 0,001) durch die Applikation von A967079.

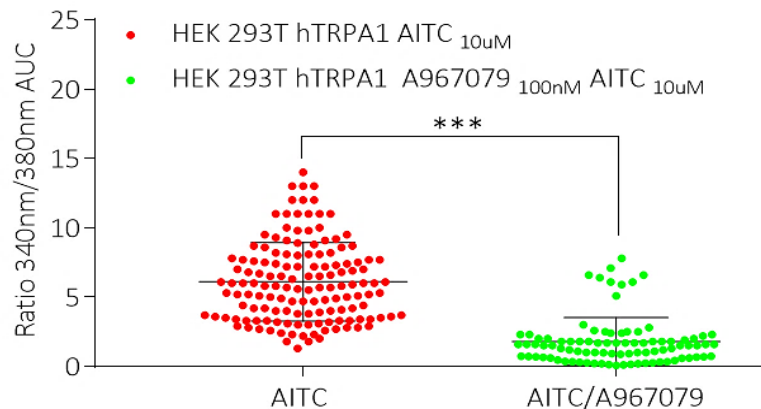


Abbildung 48: Zusammenfassung der berechneten Flächen der Allylisothiocyanat (AITC, 10 μM)-induzierten Ca^{2+} -Einstromkurven unter Abwesenheit (rote Punkte) oder Anwesenheit des TRPA1-Inhibitors A967079 (100 nM, grüne Punkte). Die statistische Analyse erfolgt mittels Welch's Test ($p < 0,001$) mit Angabe der Mittelwerte und der Standardfehler der Mittelwerte (\pm SEM) ($n=3$ unabhängige Experimente).

3.5.1.2 TRPA1-Kanal Aktivierung durch Kälte und Inhibition durch dem Hemmstoff A-967079

Um mögliche sensorische Eigenschaften von TRPA1 als Kältesensor im physiologischen System [75, 77] zu untersuchen, wurden Kälte-Experimente mit HEK 293T hTRPA1 Zellen durchgeführt. In Abbildung 49 wird die Aktivierung des humanen TRPA1-Kanals durch eine 3,5 °C kalte HBSS Lösung (grüne Kurve) im Vergleich zum 30 °C warmen HBSS Kontrollpuffer (schwarze Kurve) gezeigt werden. Zwei Minuten nach Messbeginn erfolgte die Zugabe von jeweils 100 μl HBSS Lösung entsprechender finaler Temperatur (3,5 °C versus 30 °C) zu HEK 293T hTRPA1 Zellen. Durch die Applikation kalter HBSS Lösung zeigte sich eine Zunahme der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in den humanen TRPA1 HEK 293T Zellen im Vergleich zum 30°C warmen HBSS.

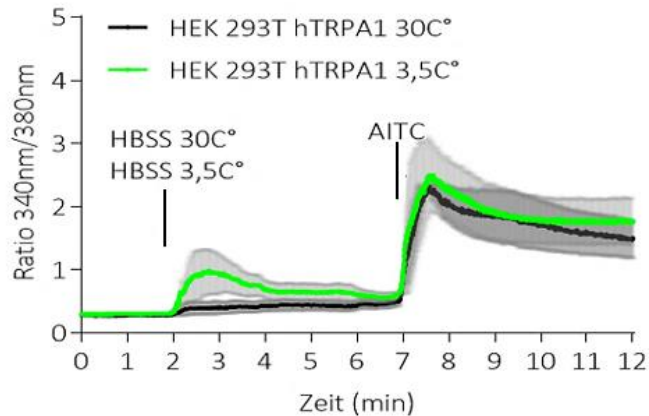


Abbildung 49: Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation von 3,5°C versus 30°C warmen HBSS Puffer auf HEK 293T-Zellen, die den TRPA1-Kanal stabil exprimieren und Aktivierung durch den TRPA1-Aktivator AITC. Die grüne Kurve zeigt die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in HEK 293T hTRPA1 Zellen nach Applikation von 3,5°C kalten HBSS Puffer und Stimulation durch AITC (10 μ M final). In der schwarzen Kurve wird die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ durch die Applikation von 30°C warmen HBSS Puffer und TRPA1-Aktivator AITC (10 μ M final) gezeigt. Darstellung der Messwerte als Quotienten der Fluoreszenzwerte nach Exzitation bei 340nm und 380nm (Ratio 340nm/380nm) als Mittelwerte (Linien) +/- Standardfehler des Mittelwerts (graue Bereiche). *** = $p < 0,001$ (n=3 unabhängige Experimente).

Nachdem die Untersuchung der Reaktion von HEK 293T hTRPA1 Zellen auf 3,5 °C kalte HBBS Lösung im Vergleich zum 30 °C warmen Puffer abgeschlossen war, wurde das identische Experiment mit vorheriger Applikation von A-967079 (10nM final) Inhibitor Lösung durchgeführt. Betrachtet man Abbildung 50, kann die Hemmung der Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Zugabe von 3,5 °C kalter HBSS Lösung (grüner Verlauf) durch die Applikation des Hemmstoffs A-967079 (roter Verlauf) gezeigt werden.

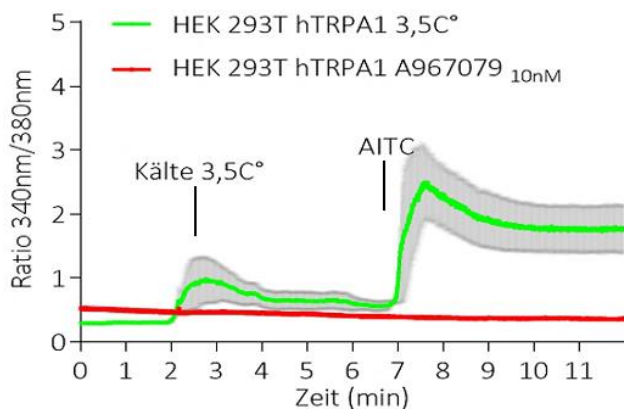


Abbildung 50: Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation von 3,5°C und A967079 auf HEK 293T-Zellen, die den TRPA1-Kanal stabil exprimieren und Aktivierung durch den TRPA1-Aktivator AITC. Die grüne Kurve zeigt die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in HEK 293T hTRPA1 Zellen nach Applikation von 3,5°C kalten HBSS Puffer und Stimulation durch AITC (10 μ M final). In der roten Kurve wird die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ durch die Applikation von A967079 (10nM final) und TRPA1-Aktivator AITC (10 μ M final) gezeigt. Darstellung der Messwerte als Quotienten der Fluoreszenzwerte nach Exzitation bei 340nm und 380nm (Ratio 340nm/380nm) als Mittelwerte (Linien) +/- Standardfehler des Mittelwerts (graue Bereiche). *** = $p < 0,001$ (n=3 unabhängige Experimente).

Zuletzt wurde das Kälteexperiment mit HEK 293T Wild-Typ Zellen als Kontrollversuch in Abbildung 51 durchgeführt. Hier zeigen die Wild-Typ Zellen (graue Kurve) nach Applikation von 3,5 °C (finale Temperatur) kalter HBBS Lösung keine Erhöhung der der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration $[Ca^{2+}]_i$ im Vergleich zur HEK 293T hTRPA1 Zelllinie (grüne Kurve). In der HEK 293T Wild-Typ Kontrolle führte AITC zu keiner messbaren Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$, so dass hier zur Stimulation 200 μ M Carbachol Lösung verwendet wurde.

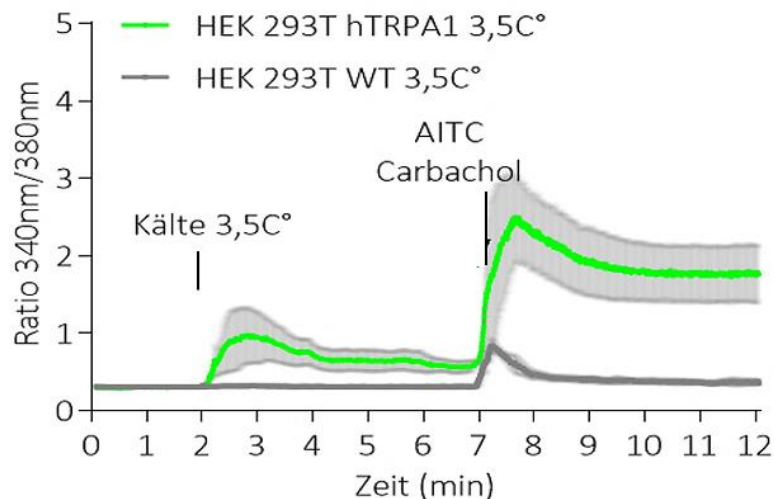


Abbildung 51: Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation von 3,5°C auf HEK 293T-Zellen und HEK 293T-Zellen, die den TRPA1-Kanal stabil exprimieren (HEK 293T hTRPA1) und Aktivierung durch den TRPA1-Aktivator AITC. Die grüne Kurve zeigt die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in HEK 293T hTRPA1 Zellen nach Applikation von 3,5°C kalten HBSS Puffer und Stimulation durch AITC (10 μ M final). In der schwarzen Kurve wird die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ durch die Applikation von 3,5°C kalten HBSS Puffer und Carbachol (10 μ M final) in HEK 293T gezeigt. Darstellung der Messwerte als Quotienten der Fluoreszenzwerte nach Exzitation bei 340nm und 380nm (Ratio 340nm/380nm) als Mittelwerte (Linien) +/- Standardfehler des Mittelwerts (graue Bereiche). *** = $p < 0,001$ (n=3 unabhängige Experimente).

3.5.1.3 Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in HEK 293T hTRPA1 Zellen nach Applikation hyperoxischer HBSS Lösung und Inhibition durch A-967079

Zunächst wurde die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration der $[Ca^{2+}]_i$ in der humanen TRPA1 stabil exprimierenden HEK 293T Zelllinie [52] auf eine hyperoxische (35,7 mg/l O_2 in HBSS, pH 7.4) Lösung (grüne Kurve) untersucht. Als Kontrollversuch wurde an Stelle von hyperoxischer Lösung mit normoxischen HBSS Puffer perfundiert (graue Kurve). In Abbildung 52 wird ein signifikanter Unterschied ($p < 0,005$) in der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation hyperoxischer Lösung im Vergleich zur normoxischen Kontrolle dargestellt.

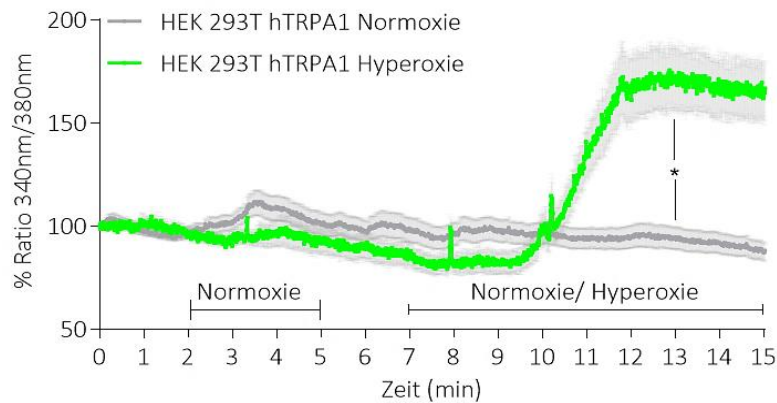


Abbildung 52: Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation hyperoxischer und normoxischer HBSS Lösung auf HEK 293T-Zellen, die den TRPA1-Kanal stabil exprimieren. Die grüne Kurve zeigt die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in HEK 293T hTRPA1-Zellen nach Applikation hyperoxischer HBSS Lösung. In der grauen Kurve wird die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation normoxischer HBSS Lösung gezeigt. Darstellung der Messwerte als Quotienten der Fluoreszenzwerte nach Exzitation bei 340nm und 380nm (Ratio 340nm/380nm) als Mittelwerte (Linien) +/- Standardfehler des Mittelwerts (graue Bereiche). *** = $p < 0,001$ ($n=3$ unabhängige Experimente mit 130 (rote Kurve) bzw. 90 (grüne Kurve) Zellen).

Die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach hyperoxischer Perfusion wird in Abbildung 53 durch die vorherige Applikation des spezifischen TRPA1-Kanal Hemmstoffs A-967079 (10nM final) um fast 50 % in HEK 293T hTRPA1 Zellen inhibiert (rote Kurve). Die Darstellung der Messwerte erfolgte als Mittelwerte der prozentualen normalisierten Ratios von 340nm/380nm (rote bzw. grüne Linie) +/- Standardfehler des Mittelwerts (graue Bereiche).

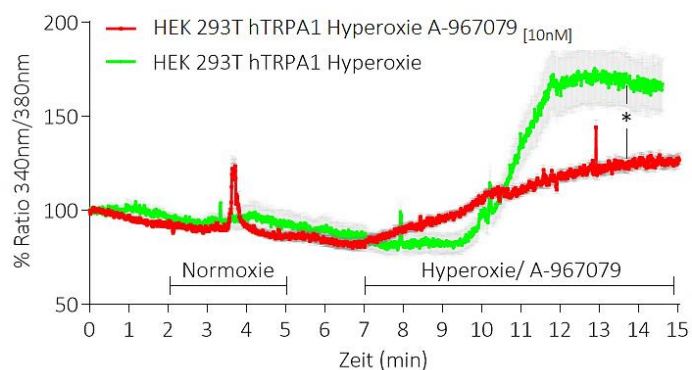


Abbildung 53: Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation hyperoxischer und normoxischer HBSS Lösung auf HEK 293T-Zellen, die den TRPA1-Kanal stabil exprimieren und Inhibition durch A-967079. Die grüne Kurve zeigt die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in HEK 293T hTRPA1-Zellen nach Applikation hyperoxischer HBSS Lösung. In der roten Kurve wird die Messung des $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation hyperoxischer HBSS Lösung und Inhibition durch A-967079 (10nM final) gezeigt. Darstellung der Messwerte als Quotienten der Fluoreszenzwerte nach Exzitation bei 340nm und 380nm (Ratio 340nm/380nm) als Mittelwerte (Linien) +/- Standardfehler des Mittelwerts (graue Bereiche). *** = $p < 0,001$ ($n=3$ unabhängige Experimente mit 130 (rote Kurve) bzw. 90 (grüne Kurve) Zellen).

In Abbildung 54 zeigt sich an Hand der berechneten AUCs ein signifikanter Unterschied (p -Wert $< 0,005$) zwischen hyperoxischen Erhöhung in der $[Ca^{2+}]_i$ (grüne Punkte) und Inhibition der $[Ca^{2+}]_i$ (rote Punkte) durch den TRPA1 Hemmstoff A-967079 (10nM final). Die statistische Analyse erfolgt mittels des Mann-Whitney Tests mit Angabe der prozentualen AUCs +/- Standardfehler des Mittelwertes SEM (graue Bereiche).

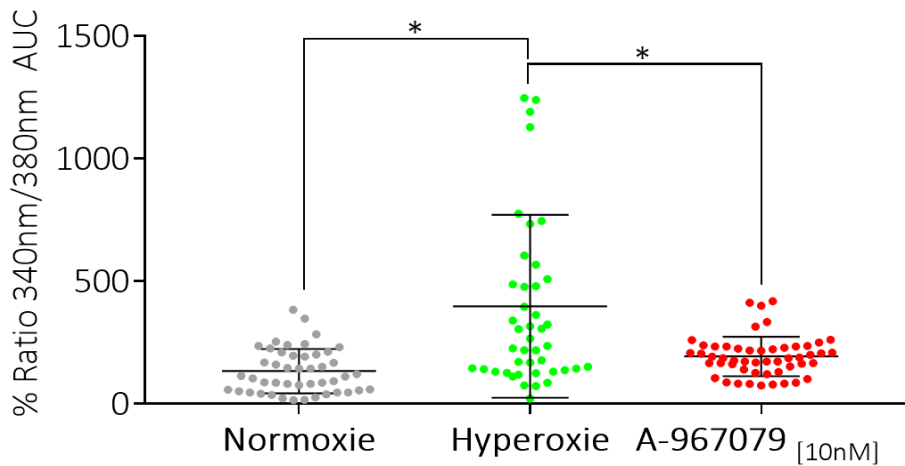


Abbildung 54: Zusammenfassung der berechneten Flächen der Hyperoxisch-induzierten Ca^{2+} -Einstromkurven unter Abwesenheit (rote Punkte) oder Anwesenheit des TRPA1-Inhibitors A967079 (10nM final, grüne Punkte). Die statistische Analyse erfolgt mittels Welch's Test ($p < 0,001$) mit Angabe der Mittelwerte und der Standardfehler der Mittelwerte (\pm SEM) ($n=3$ unabhängige Experimente).

3.5.1.4 Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch hypoxische HBSS Lösung und Inhibition durch A-967079

Nach Durchführung der Ca^{2+} -Einstrom-Experimente mit hyperoxischer HBSS Lösung (35,7 mg O_2/l) in HEK 293T hTRPA1 Zellen folgten identische Versuche mit hypoxischen Lösungen (3,4 mg O_2/l). Zunächst wurde in Abbildung 55 die Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Applikation hypoxischer im Vergleich zur normoxischen Lösung auf HEK 293T hTRPA1 Zellen verglichen. Die Darstellung der Messwerte erfolgt als Mittelwerte der prozentualen normalisierten Ratios von 340nm/380nm (dunkelgraue bzw. grüne Kurve)

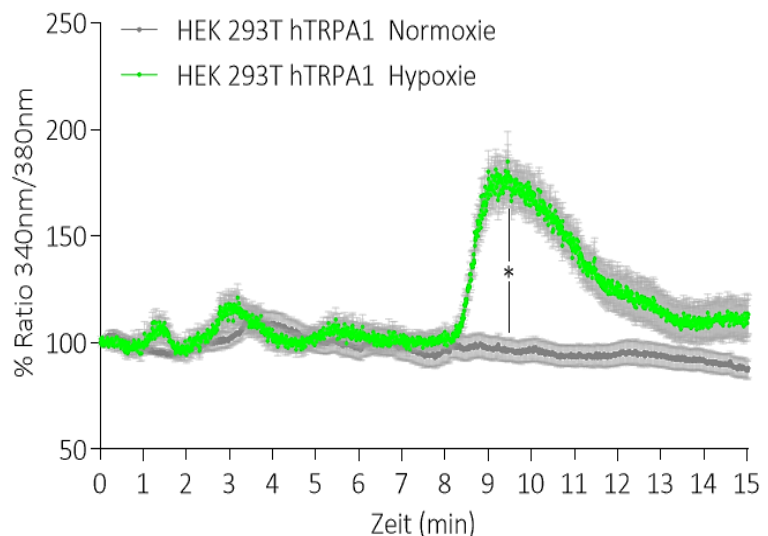


Abbildung 55: Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Applikation hypoxischer und normoxischer HBSS Lösung auf HEK 293T-Zellen, die den TRPA1-Kanal stabil exprimieren. Die grüne Kurve zeigt die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in HEK 293T hTRPA1-Zellen nach Applikation hypoxischer HBSS Lösung. In der grauen Kurve wird die Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Applikation normoxischer HBSS Lösung gezeigt. Darstellung der Messwerte als Quotienten der Fluoreszenzwerte nach Exzitation bei 340nm und 380nm (Ratio 340nm/380nm) als Mittelwerte (Linien) \pm Standardfehler des Mittelwerts (graue Bereiche). *** = $p < 0,001$ ($n=3$ unabhängige Experimente).

\pm Standardfehler des Mittelwerts (graue Bereiche).

Anschließend folgt in Abbildung 56 die Applikation des TRPA1 spezifischen Inhibitors A-967079 [10nM] vor hypoxischer Perfusion (rote Kurve). Durch eine Verminderung der $[Ca^{2+}]_i$ während Hypoxie wird eine Inhibition des Hyperoxie-induzierten intrazellulären Ca^{2+} -Einstroms in HEK 293T hTRPA1 Zellen demonstriert. Die Darstellung der Messungen erfolgt als prozentuale Ratio von 340nm zu 380nm, angegeben als Mittelwert (+/- SEM).

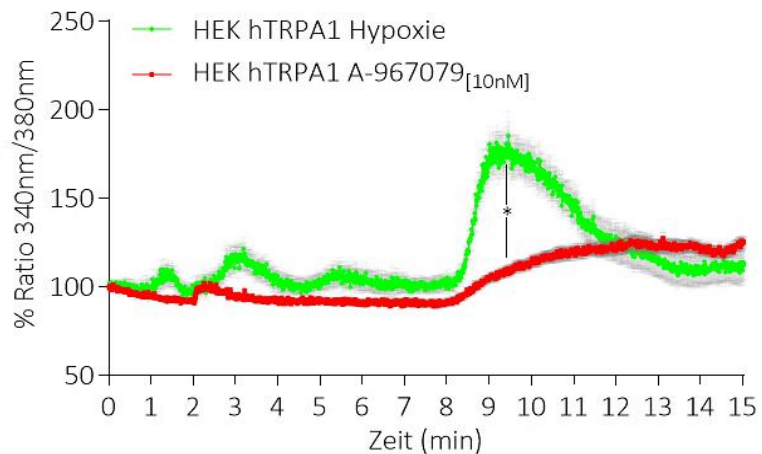


Abbildung 56: Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation hypoxischer und HBSS Lösung auf HEK 293T-Zellen, die den TRPA1-Kanal stabil exprimieren und Inhibition durch A-967079. Die grüne Kurve zeigt die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in HEK 293T hTRPA1-Zellen nach Applikation hypoxischer HBSS Lösung. In der roten Kurve wird die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation hypoxischer HBSS Lösung und Inhibition durch A-967079 (10nM final) gezeigt. Darstellung der Messwerte als Quotienten der Fluoreszenzwerte nach Exzitation bei 340nm und 380nm (Ratio 340nm/380nm) als Mittelwerte (Linien) +/- Standardfehler des Mittelwerts (graue Bereiche). *** = $p < 0,001$ (n=3 unabhängige Experimente).

Zusammenfassend werden in Abbildung 57 die Fläche unter den Ca^{2+} -Einstromkurven (AUC) nach normoxischer (graue Punkte) oder hypoxischer Perfusion (grüne Punkte) sowie nach vorheriger Applikation des TRPA1-spezifischen Hemmstoffs A-967079 (10 nm) (rote Punkte) dargestellt.

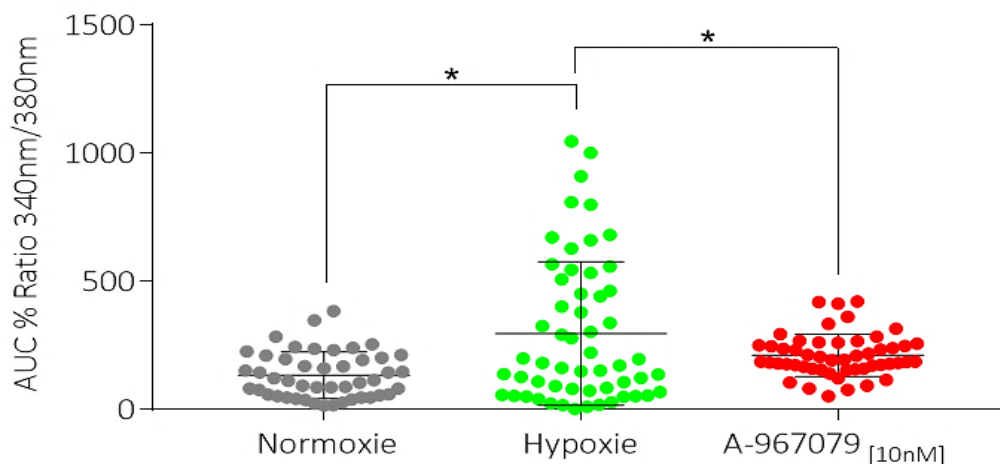


Abbildung 57: Zusammenfassung der berechneten Flächen der Hypoxisch-induzierten Ca^{2+} -Einstromkurven unter Abwesenheit (rote Punkte) oder Anwesenheit des TRPA1-Inhibitors A967079 (10nM final, grüne Punkte). Die statistische Analyse erfolgt mittels Welch's Test ($p < 0,001$) mit Angabe der Mittelwerte und der Standardfehler der Mittelwerte (+/- SEM) (n=3 unabhängige Experimente).

3.5.2 Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration alveolärer Wild-Typ Epithelzellen TypII durch Allylisothiocyanat

Primäre murine alveoläre Wild-Typ Epithelzellen TypII wurden am dritten Tag nach Isolation auf eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch AITC getestet. In Abbildung 58 wird nach Zugabe von 100 μl AITC (10 μM final) eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ im Vergleich zur Kontrolle nach Zugabe von 100 μl HBSS Lösung gezeigt. Die Darstellung der Messwerte erfolgt als Mittelwerte der Ratios von 340nm /380nm (rote Linie) +/- Standardfehler des Mittelwerts (graue Bereiche).

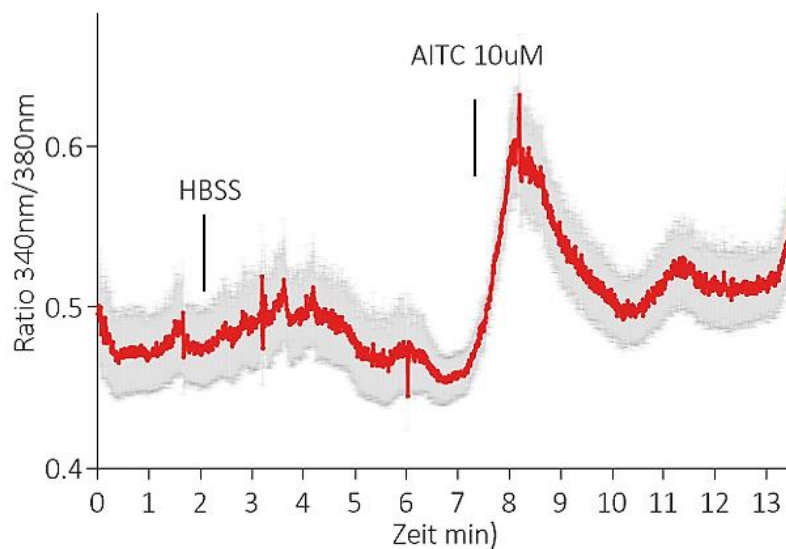


Abbildung 58: Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Applikation von HBSS und AITC Lösung auf HEK 293T-Zellen, die den TRPA1-Kanal stabil exprimieren. Die rote Kurve zeigt die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in HEK 293T hTRPA1-Zellen nach Applikation von HBSS Lösung und anschließend AITC (10 μM final). Darstellung der Messwerte als Quotienten der Fluoreszenzwerte nach Exzitation bei 340nm und 380nm (Ratio 340nm/380nm) als Mittelwerte (Linien) +/- Standardfehler des Mittelwerts (graue Bereiche). *** = $p < 0,001$ ($n=3$ unabhängige Experimente).

3.5.3 Zählung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in hyperoxischer HBSS Lösung in murinen primären Wild-Typ vs. TRPA1-defizienten Zellen mittels FURA-2-AM

Im nächsten Schritt wurden murine primäre Epithelzellen des respiratorischen Systems (ATII, tEpC und bEpC) mit hyperoxischer (35,7 mg O_2/l) bzw. hypoxischer (3,4 mg O_2/l) HBSS-Lösung versetzt und die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bestimmt.

3.5.3.1 Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in trachealen Epithelzellen nach Applikation hyperoxischer Lösung

Es wurden Messungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ für tracheale Epithelzellen durchgeführt (siehe Abbildung 59). Nach Applikation normoxischer HBSS Lösung erfolgte keine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in trachealen Wild-Typ und TRPA1-defizienten Epithelzellen. Während hyperoxischer Perfusion konnte eine Hyperoxie-induzierte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Erhöhung bei Wild-Typ (grüne Kurve) und TRPA1-defizienten Epithelzellen (rote Kurve) detektiert werden. Diese Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ blieb in den Kontrollen aus. Die Darstellung der Messwerte erfolgt als Mittelwerte der Ratios von 340nm /380nm (rote Linie) +/- Standardfehler des Mittelwerts (graue Bereiche).

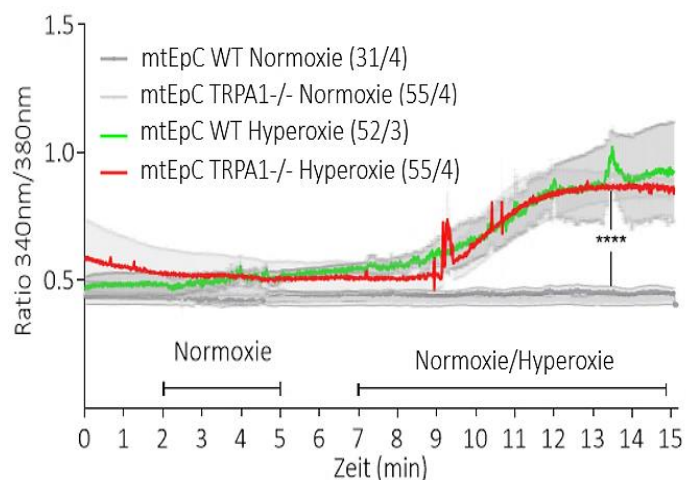


Abbildung 59: Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Applikation hyperoxischer und normoxischer HBSS Lösung auf tracheale Epithelzellen. Die grüne (WT) und rote (TRPA1-defizient) Kurve zeigt die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in trachealen Epithelzellen nach Applikation hyperoxischer HBSS Lösung. In den grauen Kontrollkurven wird die Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Applikation normoxischer HBSS Lösung gezeigt. Darstellung der Messwerte als Quotienten der Fluoreszenzwerte nach Exzitation bei 340nm und 380nm (Ratio 340nm/380nm) als Mittelwerte (Linien) +/- Standardfehler des Mittelwerts (graue Bereiche). **** = $p < 0,001$ ($n=3$ unabhängige Experimente).

Bei Betrachtung der Flächen unter der Kurve („area under the curves (AUCs)“) in Abbildung 60 wird der starke Unterschied in der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Applikation normoxischer und hyperoxischer Lösungen deutlich. Zwischen Wild-Typ und TRPA1-defizienten trachealen Epithelzellen wurde kein signifikanter Unterschied quantifiziert. Die statistische Analyse erfolgt mittels Mann-Whitney t-Test. Die Messungen werden als AUCs (+/- SEM) dargestellt.

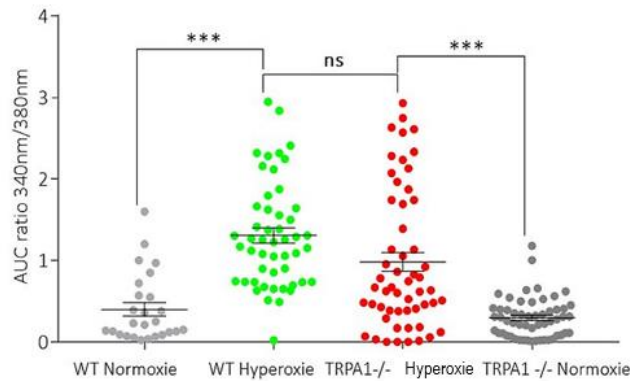


Abbildung 60: Zusammenfassung der berechneten Flächen der Hyperoxie-induzierten Ca^{2+} -Einstromkurven von Wild-Typ (grüne Punkte) und TRPA1-defizienten (rote Punkte) trachealen Epithelzellen unter Abwesenheit (graue Punkte) oder Anwesenheit (grüne und rote Punkte) von Hyperoxie. Die statistische Analyse erfolgt mittels Welch's Test ($p < 0,001$) mit Angabe der Mittelwerte und der Standardfehler der Mittelwerte (\pm SEM) ($n=3$ unabhängige Experimente).

3.5.3.2 Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in bronchialen Epithelzellen nach Applikation hyperoxischer Lösung

Messungen mit hyperoxischer (35,7 mg O_2/l) Lösung zeigten in trachealen Epithelzellen keinen signifikanten Unterschied zwischen Wild-Typ (grün) und TRPA1-defizienten Zellen (rot). Nun wurden identische Messungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Applikation hyperoxischer HBSS Lösung für bronchiale Epithelzellen durchgeführt (siehe Abbildung 61). Bronchiale Wild-Typ und TRPA1-defiziente Epithelzellen wurden mit normoxischer HBSS Lösung (graue Kurven) und

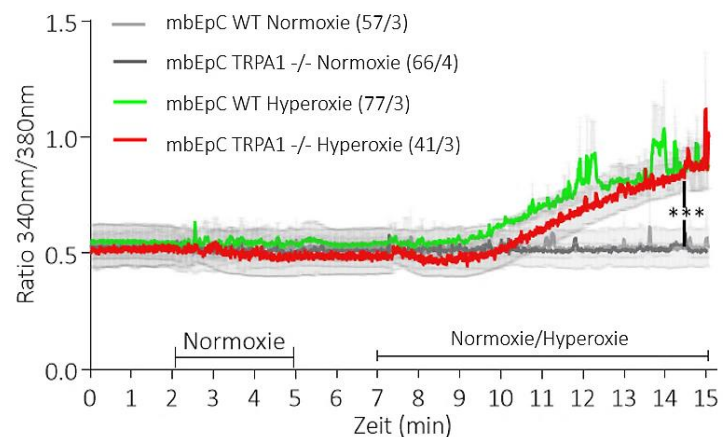


Abbildung 61: Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Applikation hyperoxischer und normoxischer HBSS Lösung auf bronchiale Epithelzellen. Die grüne (WT) und rote (TRPA1-defizient) Kurve zeigt die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in bronchialen Epithelzellen nach Applikation hyperoxischer HBSS Lösung. In den grauen Kontrollkurven wird die Messung des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Applikation normoxischer HBSS Lösung gezeigt. Darstellung der Messwerte als Quotienten der Fluoreszenzwerte nach Exzitation bei 340nm und 380nm (Ratio 340nm/380nm) als Mittelwerte (Linien) \pm Standardfehler des Mittelwerts (graue Bereiche). *** = $p < 0,001$ ($n=3$ unabhängige Experimente).

hyperoxischer Lösung (rote und grüne Kurve) exponiert. Erhöhungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde durch Analysen der Fluoreszenz nach Exzitation von 340nm zu 380nm (Ratio 340nm/380nm) detektiert. Die Darstellung der Messwerte erfolgt als Mittelwerte der Ratios 340nm/380nm (rote bzw. grüne Linie) \pm Standardfehler des Mittelwerts (graue Bereiche).

Bei Betrachtung der Flächen unter der Kurve („area under the curves (AUCs)“) in Abbildung 62 wird der starke Unterschied in der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation normoxischer und hyperoxischer Lösungen deutlich. Zwischen Wild-Typ und TRPA1-defizienten trachealen Epithelzellen wurde kein signifikanter Unterschied quantifiziert. Die statistische Analyse erfolgt mittels Mann-Whitney t-Test. Die Messungen werden als AUCs (+/- SEM) dargestellt.

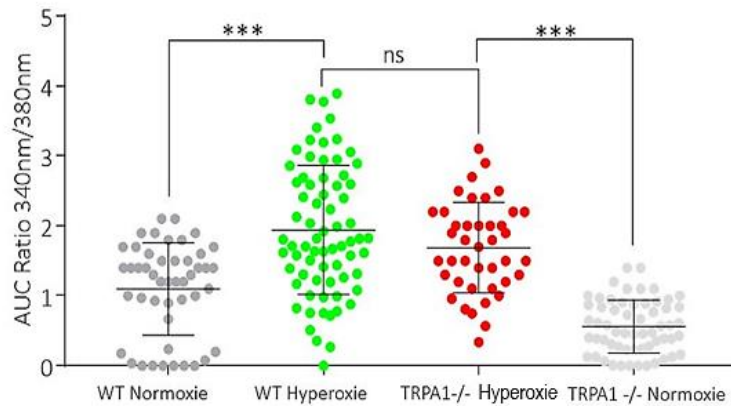


Abbildung 62: Zusammenfassung der berechneten Flächen der Hyperoxie-induzierten Ca^{2+} -Einstromkurven von Wild-Typ (grüne Punkte) und TRPA1-defizienten (rote Punkte) bronchialen Epithelzellen unter Abwesenheit (graue Punkte) oder Anwesenheit (grüne und rote Punkte) von Hyperoxie. Die statistische Analyse erfolgt mittels Welch's Test ($p < 0,001$) mit Angabe der Mittelwerte und der Standardfehler der Mittelwerte (+/- SEM) ($n = 3$ unabhängige Experimente).

3.5.3.3 Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in alveolären Epithelzellen TypII nach Applikation hyperoxischer Lösung

Nachdem die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in immortalisierten HEK 293T hTRPA1 Zellen nach Applikation von hyperoxischer (35,7 mg O_2/l) HBSS Lösung untersucht war, folgten identische Ca^{2+} -Messungen in primären alveolären TypII, bronchialen und trachealen Epithelzellen aus Wild-Typ

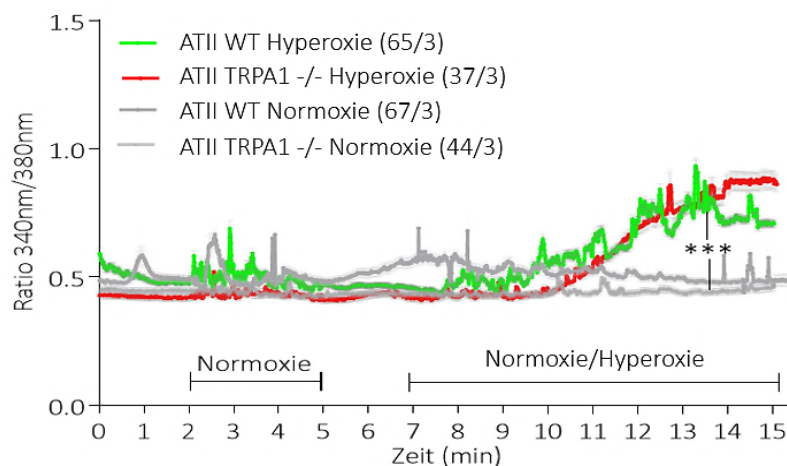


Abbildung 63: Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation hyperoxischer und normoxischer HBSS Lösung in alveoläre TYPII Epithelzellen. Die grüne (WT) und rote (TRPA1-defizient) Kurve zeigt die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in alveolären Epithelzellen TypII nach Applikation hyperoxischer HBSS Lösung. In den grauen Kontrollkurven wird die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Applikation normoxischer HBSS Lösung gezeigt. Darstellung der Messwerte als Quotienten der Fluoreszenzwerte nach Exzitation bei 340nm und 380nm (Ratio 340nm/380nm) als Mittelwerte (Linien) +/- Standardfehler des Mittelwerts (graue Bereiche). *** = $p < 0,001$ ($n = 3$ unabhängige Experimente).

(WT) und TRPA1-defizienten (TRPA1^{-/-}) Mäusen (siehe Abbildung 63). Die Darstellung der Messwerte erfolgt als Mittelwerte der Ratios 340nm/380nm (rote bzw. grüne Linie) +/- Standardfehler des Mittelwerts (graue Bereiche).

Zusammenfassend werden in Abbildung 64 die Flächen unter den Ca²⁺-Einstromkurven (AUC) in Wild-Typ (graue Punkte) und TRPA1-defiziente Epithelzellen (dunkelgraue Punkte) nach normoxischer oder hypoxischer Perfusion (WT, grüne Punkte) (TRPA1^{-/-}, rote Punkte) dargestellt.

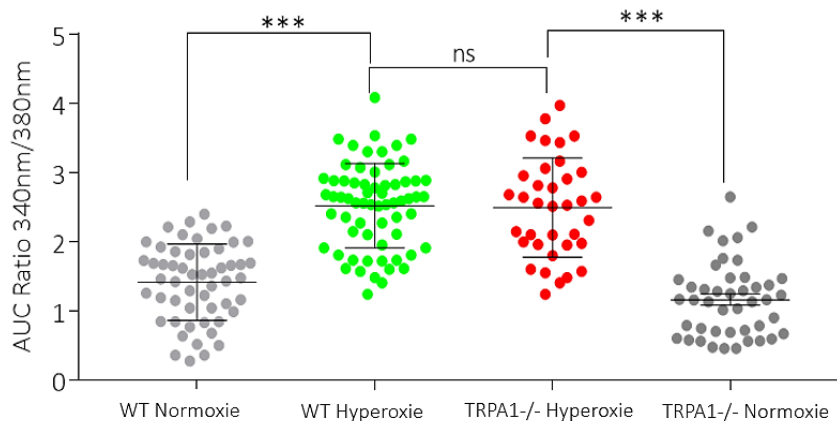


Abbildung 64: Zusammenfassung der berechneten Flächen der Hyperoxie-induzierten Ca²⁺-Einstromkurven von Wild-Typ (grüne Punkte) und TRPA1-defizienten (rote Punkte) in alveolären Epithelzellen unter Abwesenheit (graue Punkte) oder Anwesenheit (grüne und rote Punkte) von Hyperoxie. Die statistische Analyse erfolgt mittels Welch's Test ($p < 0,001$) mit Angabe der Mittelwerte und der Standardfehler der Mittelwerte (+/- SEM) ($n = 3$ unabhängige Experimente).

3.5.4 Messung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration in hypoxischer HBSS Lösung in murinen Wild-Typ versus TRPA1-defizienten Zellen

Während der hyperoxischen [O₂] Messungen (siehe Punkt 3.5.3) in alveolären Epithelzellen TypII, trachealen und bronchialen Epithelzellen wurden keine signifikanten Unterschiede in der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration mittels funktionell basierter Ca²⁺-Einstrom-Experimente zwischen Wild-Typ (grüne) und TRPA1-defizienten (rot) Epithelzellen ermittelt. Nun wurden identische Versuche mit hypoxischer [N₂] HBSS Lösung durchgeführt.

3.5.4.1 Messung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration in trachealen Epithelzellen nach Applikation hypoxischer Lösung

Es wurden hypoxische Messungen der [Ca²⁺]_i für tracheale Epithelzellen durchgeführt (siehe Abbildung 59). Nach Applikation normoxischer HBSS Lösung erfolgte keine Erhöhung der [Ca²⁺]_i in trachealen Wild-Typ und TRPA1-defizienten Epithelzellen. Während hypoxischer Perfusion konnte eine signifikant

stärkere Hypoxie-induzierte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration bei Wild-Typ (grüne Kurve) im Vergleich zu TRPA1-defizienten Epithelzellen (rote Kurve) detektiert werden. Diese Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ blieb in den Kontrollen aus. Die Darstellung der Messwerte erfolgt als Mittelwerte der Ratios von 340nm /380nm (rote Linie) +/- Standardfehler des Mittelwerts (graue Bereiche).

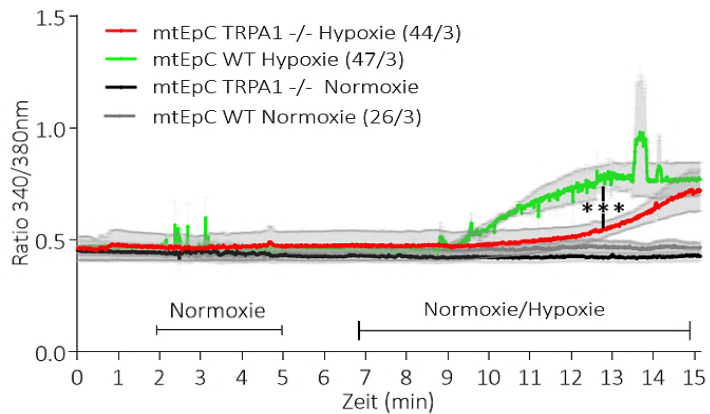


Abbildung 65: Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Applikation hypoxischer und normoxischer HBSS Lösung auf tracheale Epithelzellen. Die grüne (WT) und rote (TRPA1-defizient) Kurve zeigt die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in trachealen Epithelzellen nach Applikation hypoxischer HBSS Lösung. In den grauen Kontrollkurven wird die Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Applikation normoxischer HBSS Lösung gezeigt. Darstellung der Messwerte als Quotienten der Fluoreszenzwerte nach Exzitation bei 340nm und 380nm (Ratio 340nm/380nm) als Mittelwerte (Linien) +/- Standardfehler des Mittelwerts (graue Bereiche). *** = $p < 0,001$ ($n=3$ unabhängige

Bei Betrachtung der Flächen unter der Kurve („area under the curves (AUCs)“) in Abbildung 66 wird der signifikante Unterschied im intrazellulären Ca^{2+} -Gehalt nach Applikation normoxischer und hypoxischer Lösungen deutlich. Zwischen Wild-Typ wurde im Vergleich zu TRPA1-defizienten trachealen Epithelzellen eine stark signifikante Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration gemessen. Die statistische Analyse erfolgt mittels Mann-Whitney t-Test. Die Messungen werden als AUCs (+/- SEM) dargestellt.

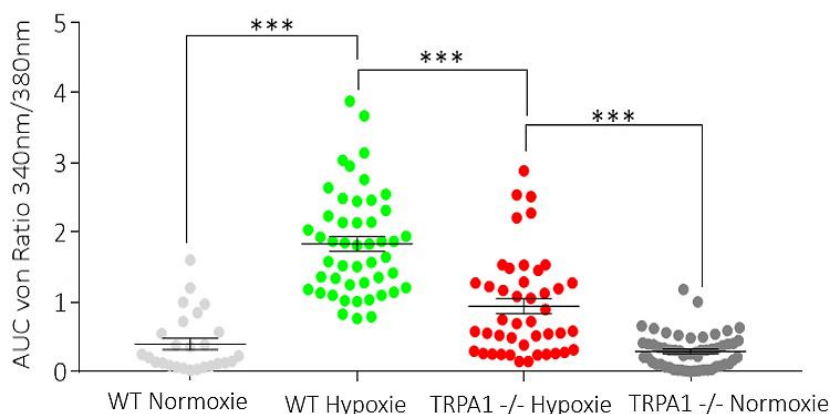


Abbildung 66: Zusammenfassung der berechneten Flächen der Hypoxie-induzierten Ca^{2+} -Einstromkurven von Wild-Typ (grüne Punkte) und TRPA1-defizienten (TRPA1-/-, rote Punkte) trachealen Epithelzellen unter Abwesenheit (graue Punkte) oder Anwesenheit (grüne und rote Punkte) von Hypoxie. Die statistische Analyse erfolgt mittels Welch's Test ($p < 0,001$) mit Angabe der Mittelwerte und der Standardfehler der Mittelwerte (+/- SEM) ($n=3$ unabhängige Experimente).

3.5.4.2 Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in bronchialen Epithelzellen nach Applikation hypoxischer Lösung

Hypoxische (3,4 mg O_2/l) Messungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in bronchialen Epithelzellen (siehe Abbildung 67) zeigte nach Applikation normoxischer HBSS Lösung keine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in bronchialen Wild-Typ und TRPA1-defizienten Epithelzellen. Während hypoxischer Perfusion konnte eine signifikant erhöhte Hypoxie-induzierte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration bei Wild-Typ (grüne Kurve) im Vergleich zu TRPA1-defizienten Epithelzellen (rote Kurve) detektiert werden. Diese Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ blieb in den Kontrollen aus. Die

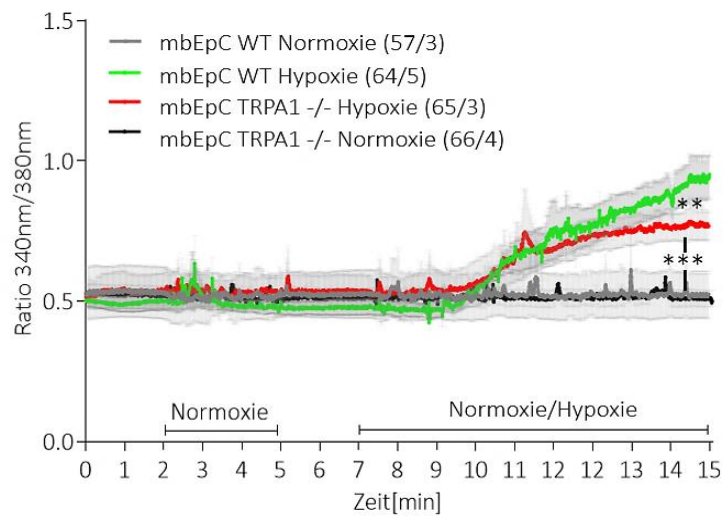


Abbildung 67: Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Applikation hypoxischer und normoxischer HBSS Lösung auf bronchiale Epithelzellen. Die grüne (WT) und rote (TRPA1-defizient) Kurve zeigt die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in bronchialen Epithelzellen nach Applikation hypoxischer HBSS Lösung. In den grauen Kontrollkurven wird die Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Applikation normoxischer HBSS Lösung gezeigt. Darstellung der Messwerte als Quotienten der Fluoreszenzwerte nach Exzitation bei 340nm und 380nm (Ratio 340nm/380nm) als Mittelwerte (Linien) +/- Standardfehler des Mittelwerts (graue Bereiche). *** = $p < 0,001$ ($n=3$ unabhängige

Darstellung der Messwerte erfolgt als Mittelwerte der Ratios von 340nm /380nm (rote Linie) +/- Standardfehler des Mittelwerts (graue Bereiche).

Bei Betrachtung der Flächen unter der Kurve („area under the curves (AUCs)“) in Abbildung 68 wird der signifikante Unterschied im intrazellulären Ca^{2+} -Gehalt nach Applikation normoxischer und hypoxischer Lösungen deutlich. Zwischen Wild-Typ wurde im Vergleich zu TRPA1-defizienten trachealen Epithelzellen eine signifikante Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration gemessen. Die statistische Analyse erfolgt mittels Mann-Whitney t-Test. Die Messungen werden als AUCs (+/- SEM) dargestellt.

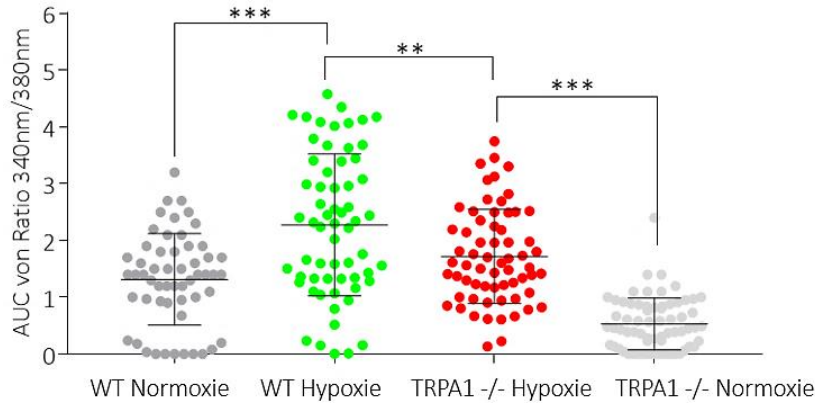


Abbildung 68: Zusammenfassung der berechneten Flächen der Hypoxie-induzierten Ca^{2+} -Einstromkurven von Wild-Typ (grüne Punkte) und TRPA1-defizienten (TRPA1 $^{-/-}$, rote Punkte) bronchialen Epithelzellen unter Abwesenheit (graue Punkte) oder Anwesenheit (grüne und rote Punkte) von Hypoxie. Die statistische Analyse erfolgt mittels Welch's Test ($p < 0,001$) mit Angabe der Mittelwerte und der Standardfehler der Mittelwerte (\pm SEM) ($n=3$ unabhängige Experimente).

3.5.4.3 Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in alveolären Epithelzellen TypII nach Applikation hypoxischer Lösung

Hyperoxische (3,4 mg O_2/l) Messungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in alveolären Epithelzellen TypII (siehe Abbildung 63) zeigte nach Applikation normoxischer HBSS Lösung keine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in alveolären Wild-Typ und TRPA1-defizienten Epithelzellen TypII. Während hypoxischer Perfusion konnte eine signifikant erhöhte Hypoxie-induzierte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration bei Wild-Typ (grüne Kurve) im Vergleich zu TRPA1-defizienten alveolären Epithelzellen (rote Kurve) detektiert werden (siehe Abbildung 69). Diese Änderung

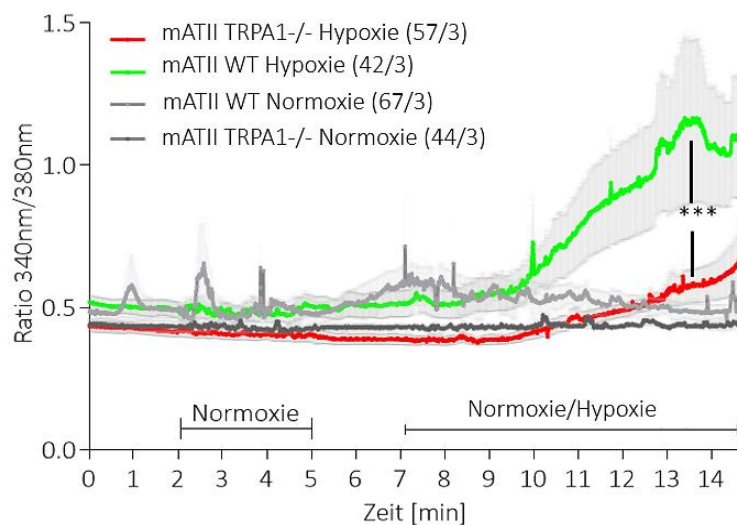


Abbildung 69: Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Applikation hypoxischer und normoxischer HBSS Lösung auf alveoläre Epithelzellen. Die grüne (WT) und rote (TRPA1-defizient) Kurve zeigt die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in alveolären Epithelzellen nach Applikation hypoxischer HBSS Lösung. In den grauen Kontrollkurven wird die Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Applikation normoxischer HBSS Lösung gezeigt. Darstellung der Messwerte als Quotienten der Fluoreszenzwerte nach Exzitation bei 340nm und 380nm (Ratio 340nm/380nm) als Mittelwerte (Linien) \pm Standardfehler des Mittelwerts (graue Bereiche). *** = $p < 0,001$ ($n=3$ unabhängige Experimente).

der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ blieb in den Kontrollen aus. Die Darstellung der Messwerte erfolgt als Mittelwerte der Ratios von 340nm/380nm (rote Linie) \pm Standardfehler des Mittelwerts (graue Bereiche).

Bei Betrachtung der Flächen unter der Kurve („area under the curves (AUCs)“) in Abbildung 70 wird der signifikante Unterschied im intrazellulären Ca^{2+} -Gehalt nach Applikation normoxischer und hypoxischer Lösungen deutlich. Im Vergleich zu den alveolären Wild-Typ Epithelzellen TypII wurde in den TRPA1-defizienten alveolären Epithelzellen TypII eine stark signifikante Verminderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ gezählt. Die statistische Analyse erfolgt mittels Mann-Whitney t-Test. Die Messungen werden als AUCs (+/- SEM) dargestellt.

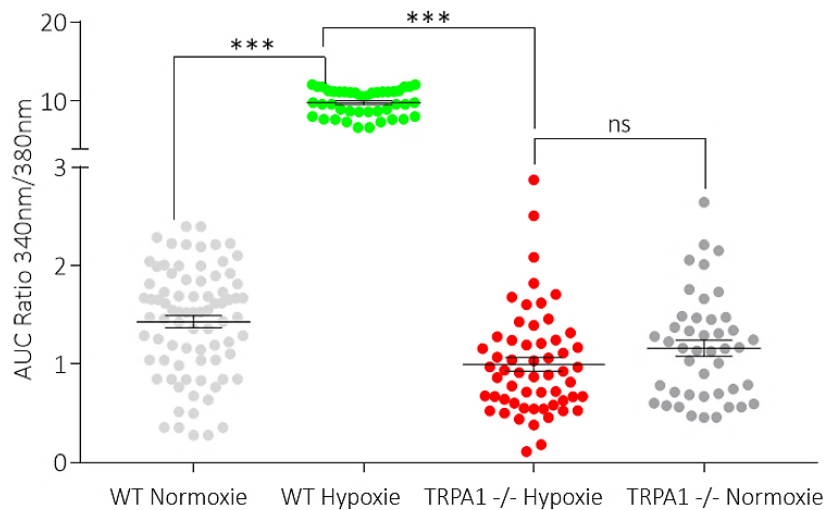


Abbildung 70: Zusammenfassung der berechneten Flächen der Hypoxie-induzierten Ca^{2+} -Einstromkurven von Wild-Typ (grüne Punkte) und TRPA1-defizienten (TRPA1^{-/-}, rote Punkte) alveolären Epithelzellen TypII unter Abwesenheit (graue Punkte) oder Anwesenheit (grüne und rote Punkte) von Hypoxie. Die statistische Analyse erfolgt mittels Welch's Test ($p < 0,001$) mit Angabe der Mittelwerte und der Standardfehler der Mittelwerte (+/- SEM) ($n=3$ unabhängige Experimente).

3.6 Quantifizierung der Ödembildung in der isolierten-perfundierten Lunge (IPL)

Im isolierten perfundierten und ventilerten Lungenmodell (siehe Punkt 2.2.10) wird nach Applikation einer toxischen Substanz oder einer 90 minütigen Ischämiephase (Perfusionsstopp) das Lungengewicht kontinuierlich gemessen. Eine Zunahme des Lungengewichts ist proportional zur Wassereinlagerung in das Gewebe durch die Ausbildung eines Lungenödems.

3.6.1 Messung der Toxin-induzierten Ödembildung in Wild-Typ und TRPA1-defizienten Lungen nach trachealer Applikation von Halb-Lost

Auf zellulärer Ebene konnte eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration $[Ca^{2+}]_i$ durch Halb-Lost (2-Chloroethylethylsulfid/CEES), ein Abkömmling des leichtflüchtigen ABC-Kampfstoffs Lost, in humanen HEK 293T Zellen, die den TRPA1-Kanal stabil exprimieren, gezeigt werden [50, 51]. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. Dirk Steinritz (Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr) wurde die Toxin-induzierte Ödembildung nach trachealer Halb-Lost Applikation in murinen Wild-Typ und TRPA1-defizienten Lungen mit Hilfe des isolierten-perfundierten Lungenmodells gemessen, um die Wirkung des Lost-Abkömmlings [94] zum ersten Mal auf Organ-Ebene zu untersuchen. Zunächst wurde das optimale Applikationsvolumen ermittelt. Mit einer trachealen Applikationsmenge von 10 μ l Gesamtvolumen war eine problemlose Messung innerhalb des isolierten-perfundierten Lungenmodells möglich, denn bei der Applikation größerer Volumina (20-50 μ l) kam es bereits vor Beginn der Messungen zu einer sehr starken Schaumbildung.

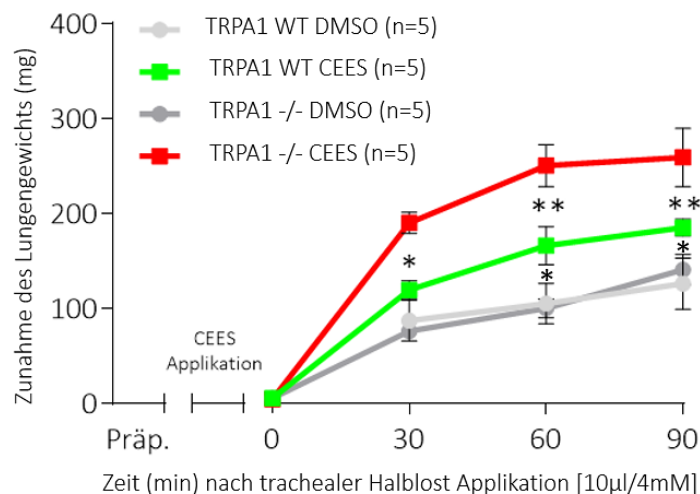


Abbildung 71: Zunahme des Lungengewichts nach Applikation von Halb-Lost (CEES, 10 μ l 4mM Lösung in DMSO) in die Tracheen von Wild-Typ (grüne Linie) und TRPA1-defizient (TRPA1-/-, rote Linie) isolierte perfundierte Lungen. Als Kontrolle wurde das Lösungsmittel DMSO (10 μ l) in WT (hellgraue Linie) und TRPA1-defizient (TRPA1 -/-, dunkelgraue Linie) Tracheen appliziert. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der „Two-way Anova“ (p-Wert < 0,005) der Mittelwerte. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (+/-SEM).

In Abbildung 71 wird die Gewichtszunahme nach trachealer Halb-Lost Applikation im Vergleich zur Applikation des Lösungsmittels (DMSO) über 90 Minuten dargestellt. Die DMSO Kontrollkurven (graue Kurven) von TRPA1-defizienten und Wild-Typ Lungen zeigen einen fast identischen Verlauf. Die rote Kurve entspricht den TRPA1-defizienten Lungen nach trachealer Halb-Lost Applikation. Entgegen der Erwartungen [52] wurden in TRPA1-defizienten Lungen insgesamt die stärkste Gewichtszunahme im isolierten-perfundierten Lungenmodell gemessen. In den ersten 30 Minuten der Gewichtsmessung nach Halb-Lost Applikation wird ein sehr steiler Anstieg der TRPA1-defizienten Lungen (rote Kurve) im Vergleich zum Verlauf der Wild-Typ Lunge (grüne Kurve) sichtbar. Die Messung bei 30 Minuten zeigt einen signifikanten Unterschied in der Toxin-induzierten Ödembildung zwischen TRPA1-defizienten Lungen (rot) mit einem Mittelwert von 190 mg (+/- 20 mg) zu 119 mg (+/- 10 mg) in Wild-Typ Lungen (grün). In Abbildung 72 werden die Einzelmessungen der Toxin-induzierten Ödembildung im perfundierten-isolierten Lungenmodell gezeigt. Die stärkste Gewichtszunahme mit 160 mg bis 250 mg wird im Zeitraum von 30 bis 60 Minuten nach trachealer Halb-Lost Applikation in Wild-Typ Lungen (grün) und in TRPA1-defizienten Lungen (rot) gemessen. Die statistische Auswertung erfolgt nach Durchführung der Varianzanalyse durch einen sog. „Two-way Anova“ ($p < 0,005$). Dargestellt sind die Mittelwerte ($n=5$) mit Angabe des Standardfehlers des Mittelwerts (+/- SEM).

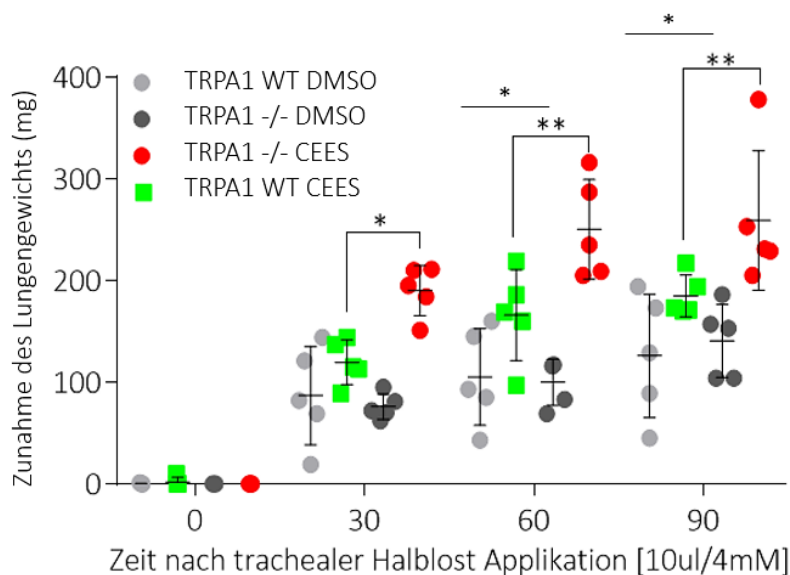


Abbildung 72: Darstellung der einzelnen Messwerte für die Zunahme des Lungengewichts nach Applikation von Halb-Lost (CEES, 10 µl 4mM Lösung in DMSO) in die Tracheen von Wild-Typ (grüne Punkte) und TRPA1-defiziente (TRPA1-/-, rote Punkte) isolierte perfundierte Lungen. Als Kontrolle wurde das Lösungsmittel DMSO (10 µl) in Wild-Typ (hellgraue Punkte) und TRPA1-defiziente (TRPA1-/-, dunkelgraue Punkte) Tracheen appliziert. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der „Two-way Anova“ (p -Wert $< 0,005$) der Mittelwerte. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (+/-SEM).

3.6.2 Messung der Ischämie-Reperfusion-induzierten Ödembildung in Wild-Typ und TRPA1 – defizienten Lungen

Zu Beginn der Ischämie-Reperfusionsexperimente wurden zunächst die Kontrollversuche (grau) mit einem konstanten Fluss von 2 ml/min ohne vorherige ischämische Phase durchgeführt, um Unterschiede im Gewichtsverlauf zwischen TRPA1-defizienten Lungen und Wild-Typ Lungen im isolierten-perfundierten Lungensystem ausschließen zu können. Die Einzelmessungen der Kontrollversuche in Abbildung 73 zeigen während der Perfusion mit einem Fluss von 2 ml/min in einem Zeitraum von 120 Minuten eine leichte Zunahme des Lungengewichts von durchschnittlich 75 bis 150 mg für Wild-Typ Lungen und TRPA1-defizienten Lungen. Nach statistischer Auswertung der nicht-parametrischen Daten mittels „Two-way Anova“ kann zwischen den beiden Genotypen kein signifikanter Unterschied im Lungengewicht nach 120-minütiger Perfusionsphase quantifiziert werden. Diese ersten Ergebnisse wurden an Hand der Kontrolldaten von Weismann et al. [45] auf Richtigkeit kontrolliert. Mit einem Durchschnitt von 100 bis 150 mg Endgewicht für die Wild-Typ Kontrollen entsprachen die Kontrollmessungen den bereits veröffentlichten Daten. Damit wurde die Funktionsfähigkeit des isolierten-perfundierten Lungenmodells bewiesen. Anschließend wurde mit den Ischämie-Reperfusion-Versuchen für TRPA1-defizienten Lungen und Wild-Typ Lungen begonnen.

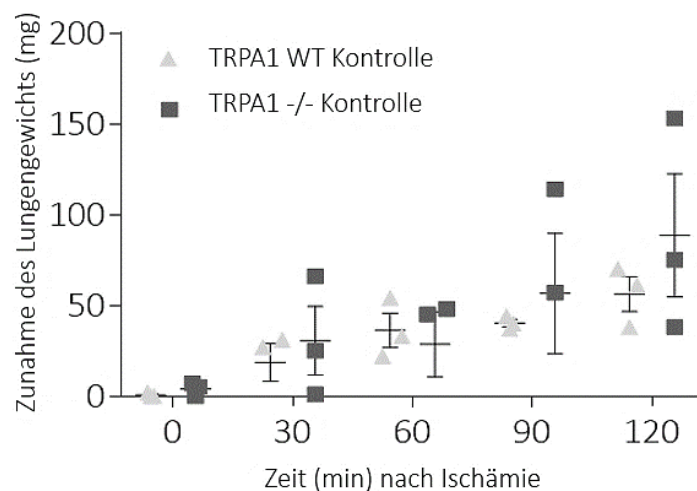


Abbildung 73: Darstellung der einzelnen Messungen für die Zunahme des Lungengewichts während der kontinuierlichen Perfusion isolierter Lungen aus Wild-Typ (WT) und TRPA1-defizienten Mäusen. Kontrollen der Ischämie-Reperfusionsexperimente von TRPA1-defizienten Lungen (hellgraue Punkte) versus Wild-Typ Lungen (dunkelgraue Punkte). Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der „Two-way Anova“ (p -Wert $< 0,005$) der Mittelwerte. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (\pm -SEM).

In Abbildung 74 wird die Ischämie-Reperfusion induzierte Ödembildung in Wild-Typ Lungen (grüne Kurve) und TRPA1-defizienten Lungen (rote Kurve) nach einer ischämischen Phase von 90 Minuten und einer anschließenden Reperfusion mit 2 ml/min über 120 Minuten gezeigt. TRPA1-defiziente Lungen zeigen während der Reperfusion einen gering höheren, aber nicht signifikant größeren Anstieg des

Lungengewichts im Vergleich zu den Wild-Typ Lungen. Die statistische Auswertung der nicht-parametrischen Daten erfolgt mittels der Varianzanalyse „Two-way Anova“ mit Angabe des Standardfehlers des Mittelwerts (+/-SEM).

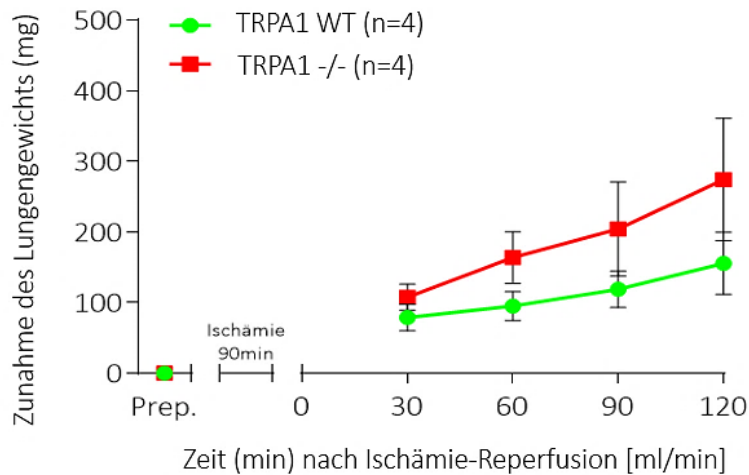


Abbildung 74: Zunahme des Lungengewichts nach während Ischämie-Reperfusion isolierter Lungen aus Wild-Typ (grüne Kurve) und TRPA1-defizienten Mäusen (TRPA1^{-/-}, rote Kurve). Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der „Two-way Anova“ (p-Wert < 0,005) der Mittelwerte. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (+/-SEM).

3.7 Vergleich von Wild-Typ und TRPA1-defizienten Mäusen in einem *in-vivo* Modell der Hyperoxie-assoziierten Lungenschädigung

Wild-Typ und TRPA1-defiziente Mäuse wurden in einer Klimakammer fünf Tage lang bei 80 % Sauerstoff und für weitere fünf Tage bei 50 % Sauerstoff gehalten (siehe Punkt 2.2.11 und [91]).

3.7.1 Darstellung der repräsentativen Lungenmorphologie nach hyperoxischer Behandlung mittels MIRAX Scan

3.7.1.1 Septales Gewebe

In Abbildung 75 werden repräsentative histologische Schnitte nach Masson-Trichrom Färbung (siehe Punkt 2.2.12.3) mittels MIRAX Scan der Firma Zeiss Mikroskopie gezeigt. Septales Gewebe normoxischer Wild-Typ Lungen (siehe Bild links) werden mit hyperoxischen Wildtyp (Bild in der Mitte) und TRPA1-defizienten (siehe rechtes Bild) Lungen verglichen. Man beobachtet eine deutliche Zunahme des septalen Gewebes nach Hyperoxie im Vergleich zur normoxischen Kontrolle. Eine genaue Quantifizierung der Verdickung der Septen (Dysplasie) erfolgt unter Punkt 3.7.2 durch die Quantifizierung des prozentualen Gewebeanteils sowie der Bestimmung der Gewebe-Volumen Ratio [%] von Wild-Typ und TRPA1-defizienten Lungenschnitte im Vergleich zu den Kontrollen.

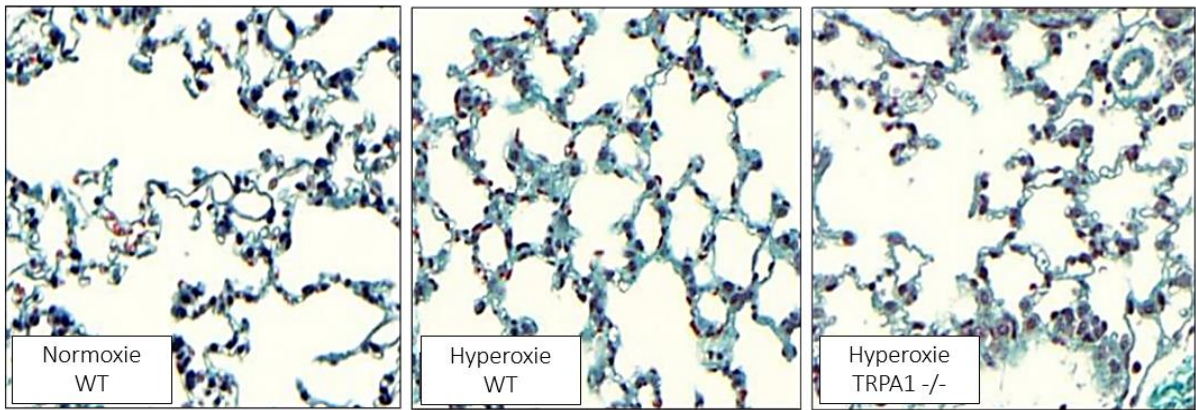


Abbildung 75: Repräsentative Lungenmorphologie nach hyperoxischer Behandlung mittels MIRAX Scan. Septales Gewebe nach Hyperoxie [O₂] versus Normoxie. Darstellung des septalen normoxischen Gewebes (Bild 1), hyperoxisch behandeltes septales Gewebe von Wild-Typ Lungen (Bild 2) und TRPA1-defizienten Lungen (Bild 3) nach Masson-Trichrom Färbung.

3.7.1.2 Lungengefäße und epitheliales Gewebe

In Abbildung 76 und Abbildung 77 werden repräsentative Schnitte normoxischer und hyperoxischer Lungen aus Wild-Typ und TRPA1-defizienten Mäusen gezeigt. Nach Quantifizierung mittels „Computer assisted sterology tollbox (CAST)“-Technologie zeigt sich kein signifikanter Unterschied in den nicht-septalen Bereichen wie Kollagen (Lungenepithel und Gefäße) (siehe „Septal fraction“ im Verhältnis zur nicht-septalen Region in Abbildung 78).

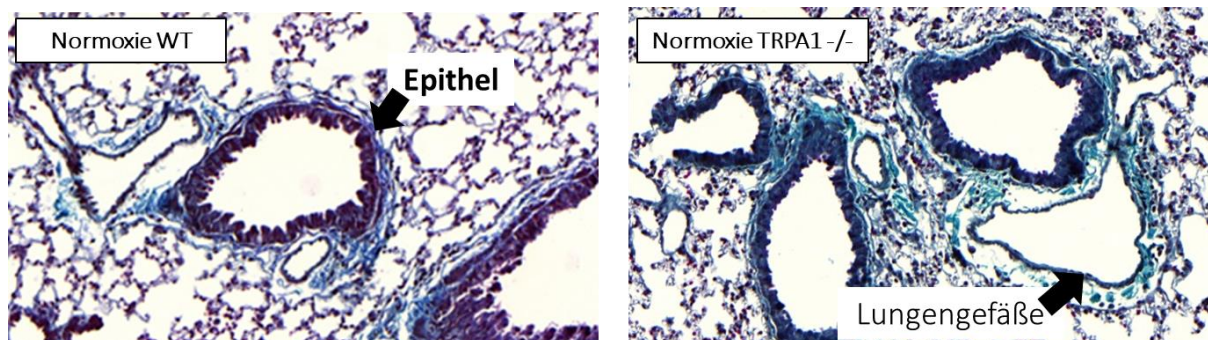


Abbildung 76: Lungengefäße und epitheliales Gewebe normoxischer Wild-Typ und TRPA1-defizienten Lungen. Histologische Lungenschnitte von normoxische gehaltene Wild-Typ und TRPA1-defizienten Lungen nach Färbung mit Trichrom-Masson. Darstellung des pulmonalen Epithels und der Blutgefäße. Die deutlichen Farbunterschiede der Lungenschnitte werden durch unterschiedlich alte Masson-Trichrom Färbelösungen verursacht.

Nach 21 Tagen hyperoxischer Behandlung (siehe Abbildung 77) werden keine auffälligen Verdickungen innerhalb der Blutgefäße und des Epithels sowie keine verstärkten Collageneinlagerungen im pulmonalen Gewebe festgestellt.

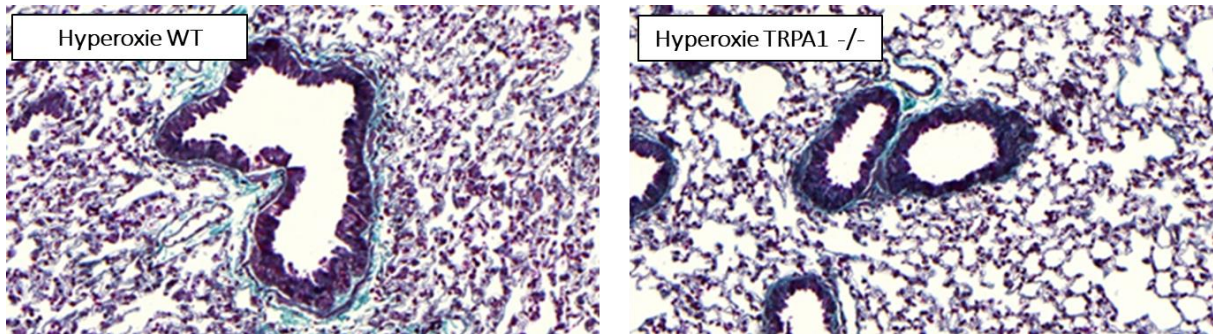


Abbildung 77: Lungengefäße und epitheliales Gewebe hyperoxisch gehaltenen Wild-Typ und TRPA1-defizienten Lungen. Histologische Längsschnitte von Hyperoxie [O₂] behandelte Wild-Typ und TRPA1-defizienten Lungen nach Färbung mit Trichrom-Masson. Darstellung des pulmonalen Epithels und der Blutgefäße. Die deutlichen Farbunterschiede der Längsschnitte werden durch unterschiedlich alte Masson-Trichrom Färbelösungen verursacht.

3.7.2 Quantifizierung Hyperoxie-induzierter pathologischer Veränderungen der Lungenmorphologie mit Hilfe von stereologischen Parametern

Die Quantifizierung der pathologischen Veränderungen der Lungenmorphologie nach hyperoxischen Exposition über 21 Tage in Wild-Typ versus TRPA1-defizienten Lungen wurde gemäß Punkt 2.2.12.6 durchgeführt. Folgende Parameter wurden untersucht: Gewebeanteil (%), septaler Anteil (%) und Oberflächenvolumen Sv (%).

Prozentualer septaler Anteil % („Septal fraction“):

Der septale Anteil spiegelt das Verhältnis von septalen (Alveolärraum) zu nicht-septalen Bereichen (Kollagen, Knorpel-, Epithel- und Endothelgewebe) wider. Starke Schwankungen in den Werten für diesen Parameter deuten auf mögliche Unterschiede in der Struktur von Wild-Typ und TRPA1-defizienten Lungen hin. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Anteil von septalen und nicht-septalen Geweben bei beiden Genotypen (siehe Abbildung 78)

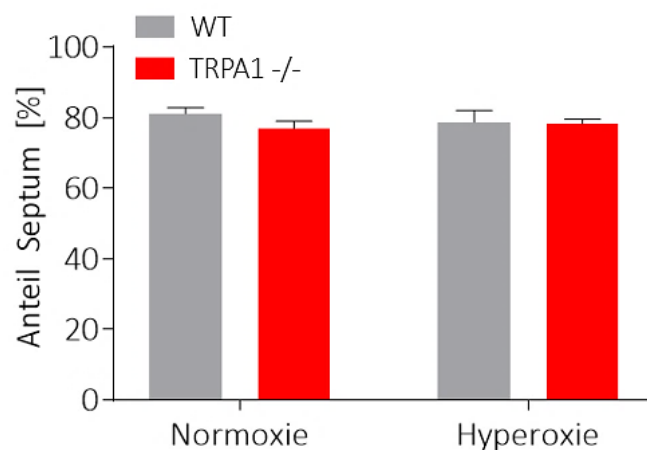


Abbildung 78: Septaler Anteil muriner Wild-Typ (graue Balken) und TRPA1-defizienter (rote Balken) Lungen nach normoxischer (Normoxie) oder hyperoxischer (Hyperoxie) Haltung für 21 Tage. Die Werte wurden aus histologischen Schnitten mit Hilfe der „Computer assisted stereology toolbox (CAST)-Technologie ermittelt. Die statistische Auswertung erfolgt mittels „Two-way Anova“ mit Angabe des prozentualen Mittelwertes und Standardfehler des Mittelwertes (+/-SEM).

nach normoxischer und hyperoxischer Haltung. Wie in den repräsentativen Bildern in Abbildung 76 und

Abbildung 77 zeigt, wurden keine Veränderungen in der Struktur der Lungengefäße und in epithelialen Geweben sowie der Kollagenmatrix beobachtet.

Anteil Gewebe in % („Tissue fraction“):

Der Gewebeanteil („Tissue fraction“) wird hier im Verhältnis zum alveolären Luftbereich ermittelt. In Abbildung 79 kann eine klare Zunahme des septalen Gewebeanteils hyperoxisch exponierten Wild-Typ und TRPA1-defizienten Tieren im Vergleich zu den normoxischen Kontrollen quantifiziert werden. Hyperoxische Wild-Typ Lungen zeigen mit einem prozentualen Anteil von 58 % (+/-2,4) Gewebeanteil

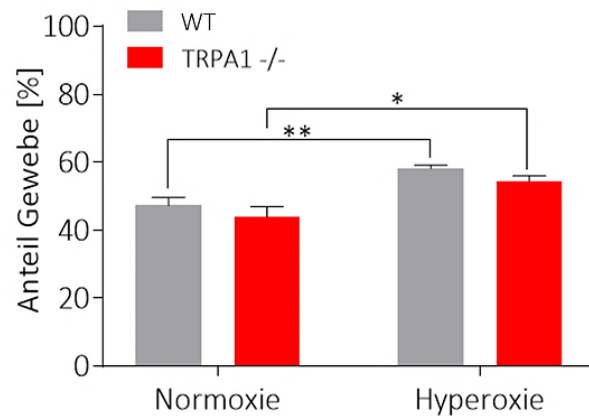


Abbildung 79: Septaler Gewebeanteil muriner Wild-Typ (graue Balken) und TRPA1-defizienter (rote Balken) Lungen nach normoxischer (Normoxie) oder hyperoxischer (Hyperoxie) Haltung für 21 Tage. Die Werte wurden aus histologischen Schnitten mit Hilfe der „Computer assisted stereology toolbox (CAST)-Technologie ermittelt. Die statistische Auswertung erfolgt mittels „Two-way Anova“ mit Angabe des prozentualen Mittelwertes und Standardfehler des Mittelwerts (+/-SEM).

11 % mehr septales Gewebe als die normoxischen Wild-Typ Kontrollen von 47 % (+/- 3,1). Für TRPA1-defizienten Lungen ergaben sich mit 54% (+/- 1,5) Gewebeanteil unter Hyperoxie und 44% (+/- 1,7) Gewebeanteil unter Normoxie ähnliche Werte. Die Zunahme an septalen Geweben zeigt sich auch in den repräsentativen Bildern unter Punkt 3.7.1.1. Nach Durchführung der Varianzanalyse „Two-way Anova“ (p< 0,025/ 0,005) ergibt sich bei beiden Genotypen (Wild-Typ und TRPA1-defizient) ein klar signifikanter Unterschied zwischen Normoxie und Hyperoxie, jedoch nicht zwischen den beiden Genotypen.

Oberflächenvolumen („Surface volume“, S_v):

Das Oberflächenvolumen (S_v) entspricht dem Volumen der Alveolen pulmonaler Gewebe. Das Oberflächenvolumen kann sich bei pathologischen fibrotischen Geschehen vergrößern und bei emphysematösen Erkrankungen verringern. Toxische Substanzen können durch eine Schädigung alveolärer Gewebe zur Verringerung des Oberflächenvolumens führen.

Abbildung 80 zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Werten beider Genotypen bezogen auf das mittlere Oberflächenvolumen der normoxischen Kontrollen von 0,03 (+/- 0,0025) für Wild-Typ Lungen zu 0,029 (+/- 0,0028) für TRPA1-defiziente Lungen.

Nach hyperoxischer Haltung wird sowohl bei Wild-Typ Lungen als auch bei TRPA1-defizienten Lungen ein Mittelwert von 0,024 (+/-

0,0015) bis 0,026 (+/- 0,0019) berechnet. Damit ergaben sich beim Vergleich aller Werte keine signifikante Unterschiede im Oberflächenvolumen.

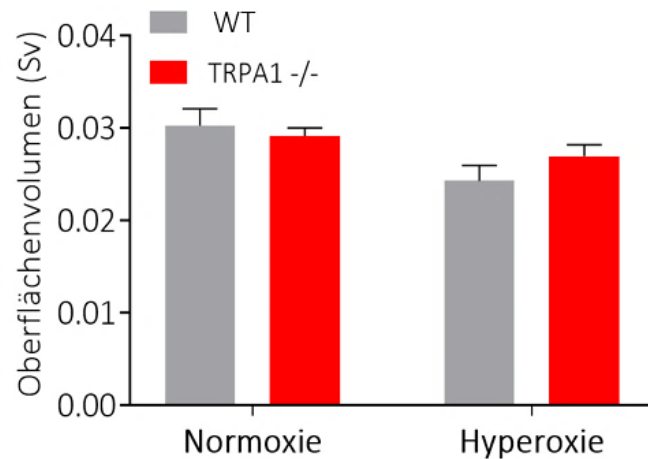


Abbildung 80: Oberflächenvolumen muriner Wild-Typ (graue Balken) und TRPA1-defizienter (rote Balken) Lungen nach normoxischer (Normoxie) oder hyperoxischer (Hyperoxie) Haltung für 21 Tage. Die Werte wurden aus histologischen Schnitten mit Hilfe der „Computer assisted stereology toolbox (CAST)-Technologie ermittelt. Die statistische Auswertung erfolgt mittels „Two-way Anova“ mit Angabe des prozentualen Mittelwertes und Standardfehler des Mittelwerts (+/-SEM).

4 Diskussion

Im physiologischen System wird der Sauerstoffgehalt [O₂] durchgängig von zahlreichen Zellsystemen gemessen. Neben neuro-epithelialen Körperchen der Lunge regulieren Typ1 Zellen des *Glomerus caroticum* die Atemfrequenz [126]. In Neugeborenen sorgt eine normoxische Vasokonstriktion des *Ductus arteriosus* für den Beginn der eigenen Lungenatmung (zusammengefasst in [127]).

Es gibt zahlreiche Ionenkanäle, die sich sehr gut eignen, akute Umweltveränderungen durch Modifikationen ihrer Mercaptogruppen (R-S-H), wie die der Aminosäuren Prolin und Cystein, auf direktem Weg oder indirekt durch Ionenkanal regulierende komplexe Signalwege zu detektieren [128]. Während TRPA1-Kanäle durch eine ganze Reihe verschiedener Chemikalien, wie toxische industrielle Isothiocyanate, Tränengas [89], reaktive Sauerstoffspezies [69], Senföle [52], aber auch durch hohen und niedrigen Sauerstoffgehalt (Hyperoxie und Hypoxie) [81] aktiviert werden können, ist ihre funktionelle Rolle *in-vivo* derzeit noch nicht vollständig geklärt [129].

Bisher ist nicht nur die Untersuchung der TRPA1-Kanal Expression in neuronalen Geweben erfolgt, in welchen der Kanal ursprünglich charakterisiert worden ist, sondern auch in wenigen nicht-neuronalen pulmonalen Epithelzellen [53-54]. Diese Resultate weisen darauf hin, dass TRPA1 als wichtiger Sauerstoffsensoren in lebensbedrohlichen Situationen involviert sein könnte. Während solcher kritischer Zustände ist die Langzeit-Beatmung mit reinem Sauerstoff [130] ein wesentliches Element der klinischen Therapie bei Frühgeborenen mit neonataler chronischer Lungenerkrankung (ILD) und bei Erwachsenen mit interstitieller ILD. Damit ist eine durchgängige Sauerstoffversorgung des Organismus sichergestellt. Einige Studien deuten darauf hin, dass oxidative Schäden zur Pathogenese und Progression interstitieller Lungenerkrankungen beitragen könnten [131]. Einige aktuell laufende Diskussionen halten es für möglich, dass toxische Effekte der Sauerstofftherapie eine Zu- oder Abnahme des Fortschreitens pulmonaler Erkrankungen zur Folge haben. Die Charakterisierung von potentiellen Sauerstoff-Sensoren ist im physiologischen System von sehr großer Bedeutung. Deshalb könnten TRPA1-Kanäle sehr interessante und attraktive Zielsubstanzen für neue pharmakologische Therapieoptionen darstellen.

Aus diesem Grund wurde die Expression und Funktion des TRPA1-Kanals in den unterschiedlichen pulmonalen murinen Geweben untersucht. Endothelzellen, Fibroblasten, glatte pulmonale präkapilläre arterielle Muskelzellen sowie primäre Epithelzellen der Trachea, Bronchien und des alveolären Kompartiments wurden isoliert. Neben ausgewählter TRP-, STIM- und ORAI-mRNA (siehe Punkt 3.3) konnten für TRPA1 relativ geringe, aber dennoch nachweisbare Mengen an mRNA (siehe Abbildung 46) durch die Nanostring® Technologie direkt und ohne Verwendung der klassischen quantitativen

Polymerase Kettenreaktion (qPCR) detektiert werden. Aufgrund von derzeit nicht verfügbaren spezifischen Antikörpern konnten die evaluierten Daten auf RNA Ebene nicht in allen isolierten primären Zelltypen auf Proteinebene bestätigt werden. In den ersten Experimenten wurde das TRPA1-Kanalprotein mittels „Western Blot“ Analysen in primären murinen Fibroblasten, Endothelzellen und alveolären-epithelialen Zellen TypII nachgewiesen (siehe Abbildung 31).

4.1 Isolation und Charakterisierung trachealer und bronchialer Epithelzellen

Die Isolation trachealer, bronchialer [107] und alveolärer Epithelzellen war ein essentieller Bestandteil dieser Arbeit, um die Rolle des TRPA1-Kanals als möglichen Hypoxie- und Hyperoxie-Sensor in primären murinen epithelialen Zellen des respiratorischen Systems untersuchen zu können [81, 84]. Im respiratorischen Trakt befinden sich tracheale und auch bronchiale Stammzellen (Basal- und Clubzellen), die sich nach Zellschädigung zu den unterschiedlichen epithelialen Zellen ausdifferenzieren können (siehe Abbildung 2). Diese Fähigkeit ist sehr wichtig, um eine durch potentielle Noxen (Giftstoffe, freie Radikale, Arzneistoffe, Entzündungen und Toxine), aber auch durch pathophysiologische Zustände, wie Hypoxie und Hyperoxie, geschädigte epitheliale Barriere aufrecht zu erhalten, bzw. zügig wiederherzustellen, so dass die Homöostase im pulmonalen System wieder gewährleistet ist [4].

Neben der Etablierung der Zellisolation bronchialer Epithelzellen stellte auch die Optimierung der Isolation, um die Ausbeute dieser Zellen deutlich zu erhöhen, eine große Herausforderung dar. So gelang es, nicht alveoläre TypI (ATI) Zellen direkt mit Hilfe von Podoplanin Antikörpern, wie für die Ratte beschrieben [107], zu isolieren. Aus diesem Grund wurden ATII-Zellen in ATI-Zellen in Zellkulturschalen aus Plastik wie beschrieben differenziert [103]. Die konfluenten ATI-Zellen exprimierten im Gegensatz zu den isolierten ATII-Zellen eindeutig die ATI-spezifischen Marker Podoplanin und Aquaporin-5. Diese Zellen waren jedoch zu dicht, um in Ca^{2+} -Imaging Experimenten eingesetzt werden zu können. Alle Zellen mussten frisch kultiviert ohne Zellpassagierung verwendet werden, da sie kaum mehr proliferieren und schnell ihre typischen Zelleigenschaften verlieren. Insbesondere aus humanen Lungengewebe, das nur sehr limitiert zur Verfügung stand, konnten keine Lungenzellen isoliert und kultiviert, sondern nur initiale Experimente zu den mRNA-Expressionsmustern durchgeführt werden. Hier sollten in Zukunft z.B. Einzelzell-RNA-Sequenzierungen, die weniger Zellmaterial benötigen, etabliert werden.

Pan-Zytokeratine als spezifische Epithelzellmarker in bronchialen und trachealen Epithelzellen (siehe Abbildung 25 und 26) konnten mittels Immunocytochemie mit spezifischen Antikörpern identifiziert werden [122]. Auffällig war die unterschiedlich starke Färbung der trachealen Epithelzellen, so dass auf

ein stärkeres und schwächeres Vorhandensein an Zytokeratinen geschlossen werden konnte. Nach einer Besprechung mit Frau PD Dr. Claudia Staab-Weinitz vom Helmholtz Zentrum München konzentrierte sich die Frage darauf, ob die kultivierten Epithelzellen aus spezifischen Stammzellen, wie Basal- und Clubzellen (siehe Abbildung 2), ausdifferenzieren oder aus den isolierten epithelialen Gewebestücken nach Zerkleinerung auswachsen. Eine weitere Untersuchung der Epithelzellen mittels spezifischer Marker-Proteine, wie CC10 („Clara cell 10kD protein) und CD63 (Transkriptionsfaktor p63) [5-6], führte in ersten Pilotversuchen auf Grund der Unspezifität der verwendeten Antikörper zu keinem eindeutigen Ergebnis [4]. Deshalb konnte eine genauere Differenzierung der verschiedenen Lungeneithelzellen in dieser Arbeit nicht vorgenommen werden und sollte in Zukunft mit spezifischeren Antikörpern erfolgen.

4.2 mRNA-Expressionsprofile von TRPA1-, anderen TRP sowie ORAI- und STIM-Proteinen mit Hilfe der Nanostring® Technologie und Nachweis der TRPA1-Expression mit spezifischen Antiseren in Zellen des Respirationstrakts

Ein großer Vorteil der verwendeten Nanostring® Technologie ist die direkte eindeutige Detektion von mRNA-Molekülen mit zwei verschiedenen Oligonukleotiden [96]. Durch eine Farbkodierung ist die direkte Quantifizierung verschiedener mRNAs in nur einem Experiment möglich, so dass mRNAs vieler verschiedener Proteine in einem Schritt nachgewiesen werden. In meinen Untersuchungen wurden sowohl mRNA-Expressionsprofile für TRP-Kanäle, für die Hinweise auf eine Expression und Funktion in der Lunge bereits vorhanden waren, als auch STIM1/2 Proteine und Orai-Kanäle, die verantwortlich für das Auffüllen interner Ca^{2+} -Speicher sind, generiert .

STIM1/2-Proteine und Orai1-3-Kanäle werden in allen untersuchten Lungenzellen gleichmäßig hoch (++ >100-500 „Counts“) exprimiert, so dass sich hier keine Zell-spezifischen Expressionsmuster erkennen lassen. Ausnahmen sind hier eine verminderte Expression von Orai2-Kanälen im murinen (Abbildung 35) und von Orai1-3 Kanälen im menschlichen Gesamt-Lungengewebe (Abbildung 43). Unter den TRP-Kanälen finden sich wie erwartet die höchste mRNA-Expression für den ubiquitär exprimierten TRPM7-Kanal. Dieser Kanal spielt eine Schlüsselrolle in der Embryonalentwicklung, so dass TRPM7-defiziente Mäuse bereits als Embryos (Tag 6,5 – 7,5 der Embryonalentwicklung) sterben (zusammengefasst in [132]). Da der TRPM7-Kanal recht gleichmäßig in allen Lungengeweben zwischen 500-1500 „Counts“ exprimiert wird, kann er auch zur Normalisierung der TRPA1-Expressionsprofile verwendet werden (siehe Abbildung 46). Auffällig ist auch hier die geringe TRPM7-Expression in humanen Lungengeweben, die aber wahrscheinlich auf die sehr schlechte Qualität des Ausgangsmaterials zurückzuführen ist. Alle übrigen mRNAs der TRP-Kanäle werden recht unterschiedlich zellspezifisch exprimiert und im Folgenden für jeden Zelltyp einzeln beschrieben.

In der humanen HEK 293T-Zelllinie fällt eine starke mRNA Expression für die Kanäle TRPC1, TRPC3 und TRPV1 auf (Abbildung 33). Die hohe TRPC3 mRNA-Expression tritt wiederum deutlich hervor, denn TRPC3 wurde erstmals in dieser Zelllinie identifiziert und kloniert [133]. Dagegen ist die mRNA Expression für den vorwiegend neuronal exprimierten TRPV1-Kanal eher unerwartet. TRPA1 mRNA wird in der HEK 293T-Zelllinie mit der stabil integrierten TRPA1-Expressionskassette (HEK 293T hTRPA1) wie erwartet sehr stark exprimiert (≈ 20.000 „Counts“). Interessant ist eine deutliche Hochregulation der TRPC1-mRNA in dieser Zelllinie, die weiter untersucht werden sollte.

Die immortalisierte A549 Zelllinie aus dem explantierten Adenomkarzinom der Lunge eines 58-jährigen US-Amerikaners (ATCC Nummer CCL 185) besitzt zwar nicht mehr die typischen Charakteristika einer Lungenepithelzelle, wird aber in vielen Veröffentlichungen zum Beispiel auch in *in-vitro* Lungen-Chip-Modellen [134] wegen der unkomplizierten Kultivierung verwendet. Hier fällt das Fehlen von TRPC6- und TRPV4-mRNA auf (Abbildung 34), die in allen frisch isolierten murinen Epithelzellen exprimiert werden (siehe unten), was die mangelnde Eignung dieser Zelllinie als Ersatz für primäre Epithelzellen zusätzlich unterstreicht.

In murinen Gesamtlungen (Abbildung 35) fällt die starke Expression der TRPC6-mRNA auf, die in den genauer untersuchten, frisch isolierten Zellen (siehe unten) in diesem Umfang nicht mehr auftaucht. Ein Grund könnte die starke Expression in alveolären Makrophagen sein [135], die in meiner Arbeit nicht untersucht wurden.

In alveolären TypII Zellen (ATII) wird vermehrt TRPV4-mRNA synthetisiert (Abbildung 36). Nach einer Ausdifferenzierung durch Kultivierung der Zellen in Plastik-Kulturschalen für sechs Tage fällt eine deutlich reduzierte mRNA-Expressionsrate für den TRPV4-Kanal auf, während mRNA für den TRPC6-Kanal vermehrt nachgewiesen werden konnte (Abbildung 37 und direkter Vergleich in Abbildung 38).

In primären Lungenendothelzellen (Abbildung 39) zeigt sich eine moderate Expression (>100 „Counts“) von TRPC3-, TRPC6-, TRPV4-mRNA. Auffallend ist das Fehlen von TRPC4-mRNA, da zahlreiche Berichte über wichtige Funktionen dieses Kanals für die Endothelzellpermeabilität veröffentlicht wurden (zusammengefasst in [136]).

Die primär isolierten Lungenfibroblasten (Abbildung 40) exprimieren – wie beschrieben - vor allem TRPC1- [49] und TRPV4-mRNA [137], während die Expression von TRPC6-mRNA gering ist [49]. In präkapillären glatten Muskelzellen der murinen Lunge (Abbildung 41) konnte die moderate Expressionsrate von TRPC6-mRNA bestätigt werden [44], während TRPV4-mRNA wenig synthetisiert wird.

Tracheale Epithelzellen (Abbildung 42) exprimieren wie ATII-Zellen vor allem TRPV4-mRNA, was seine Rolle für die Epithelbarriere im Respirationstrakt bestätigt [138]. Aufgrund des begrenzten, qualitativ schlechten Materials müssen die m-RNA-Expressionsprofile in humanem Lungengewebe (Abbildung 43) mit Vorsicht interpretiert werden. Hier konnte vor allem TRPV4-mRNA nachgewiesen werden. Die

mRNAs vieler neuronal exprimierter TRP-Kanäle (TRPC1, TRPC3, TRPC6, TRPM2, TRPM3, TRPM7 und TRPV1) habe ich in dorsalen Spinalganglien identifizieren können (Abbildung 44). Diese Nanostring® - Analysen dienten als Positivkontrolle für die Spezifität und Qualität der verwendeten Oligonukleotide.

Besonders wichtig für meine Arbeit war die Expression von TRPA1-mRNA in den verschiedenen murinen Zellen des Respirationstrakts. Hier kann ich eine sehr niedrige Expression (20-70 „Counts“) von TRPA1-mRNA in allen primär isolierten Zellen (tracheale Epithelzellen, Lungenfibroblasten, ATI-, AII-Zellen, präkapillären glatten Muskelzellen (PASMC)) und Endothelzellen nachweisen, wobei die meiste mRNA in den PASMC synthetisiert wird. Die Analyse von mRNA in dorsalen Spinalganglien diente als Positivkontrolle für die Spezifität und Qualität der TRPA1-spezifischen Oligonukleotide, da bekannt ist, dass TRPA1-Kanäle besonders in diesem Zelltyp exprimiert werden [139]. Eine niedrige mRNA-Expressionsrate kann zwar, muss aber nicht, mit einer niedrigeren Proteinexpressionsrate korrelieren. Insbesondere wenn das Protein eine lange Halbwertszeit hat, muss nur wenig mRNA für eine niedrige Syntheserate produziert werden, obwohl das Protein zellulär in hoher Konzentration vorliegt. Aus diesem Grund ist eine Detektion des Proteins mit spezifischen Antikörpern im Western-Blot sicher die beste Methode zur Quantifizierung. Wegen der geringen Verfügbarkeit eines spezifischen TRPA1-Antikörpers ist dieser Nachweis nur in AII-Zellen und im Lungenlysat gelungen (Abbildung 31).

4.3 Quantifizierung von Lungenödemen im *ex-vivo* Modell der isolierten perfundierten Mauslunge

Die Methode der isolierten perfundierten Lunge wurde von mir im Labor etabliert. Bisher waren entsprechende Experimente immer in Kooperation mit dem Labor von Prof. Dr. Weissmann an der Universität Gießen durchgeführt worden. Durch den Erwerb eines Modells der Firma Hugo-Sachs Elektronik/Harvard-Instruments konnte ich erstmals Lungenödeme nach Applikation eines Schadenreizes *ex-vivo* an TRPA1-defizienten und Wild-Typ (WT)-Lungen quantifizieren. Wegen der niedrigen Luftfeuchtigkeit im Labor musste eine geeignete Methoden zur Verhinderung einer Austrocknung der Lungen etablieren.

4.3.1 Rolle von TRPA1-Kanälen für das Halb-LOST-induzierte Lungenödem

2017 wurde durch die europäische Gesellschaft ECHA („European Chemical Agency“) mittels des REACH Programms („Registration, evaluation authorization and restriction of chemicals“) mit der Auflistung möglicher Gesundheitsrisiken toxischer Substanzen begonnen. Etwa 169 chemische Substanzen wurden als sehr bedenkliche Substanzen „Substances of very high concern“ (SVHC) eingestuft. Die Identifikation zellulärer Sensoren und Effektorproteine ist von großer Bedeutung, um die schädigende Wirkung [138]

toxischer Substanzen zu verstehen und damit neue wirksame therapeutische Optionen zu entwickeln, da eine potentielle Gewebeschädigung durch toxische Substanzen jederzeit sowohl über die Luftwege als auch über das vaskuläre pulmonale System erfolgen kann [52-54].

Mitglieder der TRP-Kanalfamilie (TRPA1, TRPC4, TRPC6, TRPM2, TRPM8, TRPV1 und TRPV4) werden als potentielle Chemosensoren und damit als Detektor- und Effektorproteine für toxische Substanzen sehr intensiv diskutiert. So zeigt das TRPA1-Kanalprotein eine hohe Anzahl an „Ankyrin repeat“ (AR) Domänen, die mit anderen Proteinen interagieren können [63]. Darüber hinaus konnten im TRPA1-Kanal Cystein-Aminosäuren identifiziert werden, die mit Isothiocyanat, Cinnamaldehyd und Akrolein durch kovalente Bindungen reagieren und so zur Aktivierung des TRPA1-Kanals führen können. Unser Kollaborationspartner konnte *in-vitro* nachweisen, dass HEK 293T-Zellen, die TRPA1 rekombinant exprimieren, nach CEES (Halb-LOST) -Applikation einen TRPA1-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom zeigen, der durch den TRPA1 spezifischen Inhibitor AP18 gehemmt werden konnte. Diese CEES-induzierte TRPA1-Aktivität korrelierte auch mit einer höheren Zelltoxizität [51]. Diese Daten konnten auch mit der reaktiven S-Lost Verbindung reproduziert werden. Durch die Applikation von N-Acetylcystein (NAC) konnte bereits ein therapeutischer Effekt *in-vitro* erreicht werden [71]. Diese Ergebnisse ermutigten uns initiale Experimente mit einer niedrigen CEES-Dosis im isolierten Lungenmodell (siehe Punkt 3.6.1) durchzuführen, um die toxische Wirkung auf das pulmonale System nach trachealer Halb-LOST Applikation in TRPA1-defizienten und Wild-Typ (WT)- Mäusen zu untersuchen und erste experimentelle *ex-vivo* Daten zu erhalten. Die Ergebnisse in Abbildung 71 zeigen jedoch eine stärkere CEES-induzierte Ödembildung in TRPA1-defizienten Lungen als in WT-Kontroll-Lungen. Dafür gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten.

Zum einen kann nicht ausgeschlossen werden, dass die TRPA1-Kanalaktivität auch eine schützende Funktion auf das Lungengewebe zumindest bei bestimmten niedrigen CEES-Konzentrationen ausübt. Eine genaue Dosis-Wirkungsanalyse könnte einen hormetischen Effekt (siehe Abbildung 81) oder eine generelle Schutzfunktion des TRPA1-Kanals vor dem CEES-induzierten Lungenödem identifizieren. In beiden Fällen könnten die gefundenen *in-vitro* Daten *in-vivo* nicht bestätigt werden, da es sich um ein anderes zelluläres Milieu (HEK 293T-Zellen versus primäre Lungenzellen) handelt.

Eine weitere Erklärung für die widersprüchlichen Daten wäre eine kompensatorische Regulation anderer Proteine durch das Fehlen des TRPA1-Kanals schon während der Embryonalentwicklung in allen Geweben, in denen das Protein normalerweise exprimiert wird. Um größere Unterschiede zwischen den Wild-Typ- und TRPA1-defizienten Lungen ausschließen zu können, wurde in Zusammenarbeit mit Robin Lühling vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr Neuherberg und PD Dr. Dirk Steinritz eine Proteomanalysen durchgeführt. Hier konnten nach zweidimensionaler quantitativer Gel-

Analyse keine größeren Unterschiede in der Gesamtheit aller exprimierten Proteine in WT- und TRPA1-defizienten Lungen festgestellt werden [131], sodass diese Möglichkeit eher unwahrscheinlich ist.

Es ist geplant, dass umfassende Dosis-Wirkungsstudien mit (Halb)-LOST in geeigneten Hochsicherheitsbereichen unseres Kooperationspartners im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr durchgeführt werden, um die *in-vivo* Funktion des TRPA1-Kanals für die toxische Wirkung dieser Substanzen aufzuklären. Dabei können auch spezifische TRPA1-Kanal-Modulatoren eingesetzt werden, um mögliche therapeutische Optionen aufzuzeigen (zusammengefasst in [138]).

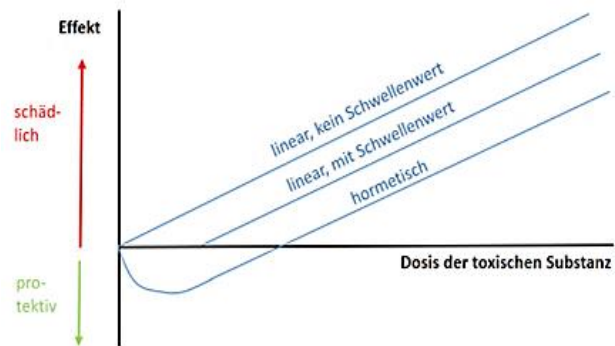


Abbildung 81: Lineare und hormetische Effekte von toxischen Substanzen auf Gewebe. Toxische Substanzen können in einer linearen Beziehung mit oder ohne Schwellenwert schädlich auf ein Gewebe wirken oder in niedrigen Konzentrationen sogar einen protektiven Effekt entfalten, der dann bei einer höheren Dosis erst toxisch wird. Modifizierte Abbildung aus [1].

4.3.2 Die Rolle von TRPA1 beim Ischämie-Reperfusion-induzierten Lungenödem

Die Durchführung von Ischämie-Reperfusionsexperimenten im isolierten-perfundierten Lungenmodell (siehe Punkt 2.2.10) als *ex-vivo* Modell des Ischämie-Reperfusion (IR)-induzierten Lungenschadens (siehe Punkt 3.6.1) zeigte keine protektive oder fördernde Wirkung des TRPA1-Proteins auf die Ausbildung eines Lungenödems (siehe Abbildung 74). Die Zunahme des Lungenödems war ähnlich und nicht signifikant unterschiedlich in *ex-vivo* Lungen von Wild-Typ und TRPA1-defizienten Mäusen. Meine Daten sprechen deswegen gegen eine Rolle von TRPA1 beim IR-induzierten Lungenödem, das ausschließlich über eine Aktivierung des TRPC6-Kanals vermittelt wird [44-45].

In Kooperation mit Stephanie Häfner und Prof. Dr. Michael Schäfer des Rudolf-Boehm-Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Leipzig wurde in dieser Arbeit die Wirkung von Larixylmethylcarbammat als potenter TRPC6-Kanal-Inhibitor auf die Ischämie-Reperfusion-induzierte Ödembildung im isolierten-perfundierten Lungenmodell getestet [45]. Nach Applikation des TRPC6-Inhibitors war die Ödembildung der *ex-vivo* Lunge nach Ischämie und Reperfusion im Vergleich zu Lungen, die nur das Lösungsmittel erhalten hatten, deutlich um ca. 50% reduziert. Die protektive Wirkung des Larixylmethylcarbamatts wurde in einer gemeinsamen Publikation (siehe [140]) veröffentlicht und sollte mit Hilfe von Dosis-Wirkungskurven noch weiter optimiert werden.

4.4 TRPA1 als möglicher Hypoxie- oder Hyperoxie-Sensor in der Lunge

Zur funktionellen Analyse der Funktion des TRPA1-Kanals als Hyperoxie-Sensor wurden „Ca²⁺-Imaging“-Experimente mit den primär isolierten Epithelzellen durchgeführt. *In-vitro* konnte ich vorerst die Funktion des TRPA1-Kanals als Hyperoxie-Sensor in den TRPA1-Kanal stabil exprimierenden HEK 293T Zellen in „Ca²⁺-Imaging“- Experimenten bestätigen (Abbildung 52). Nach Perfusion hyperoxischer Lösungen im geschlossenen System zeigte sich bei allen epithelialen Wild-Typ (WT) Zellen im Vergleich zur normoxischen Kontrolle eine Hyperoxie-induzierte Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration (siehe Punkt 3.5.3). Für TRPA1-defiziente Zellen wurde unter identischen hyperoxischen Bedingungen kein signifikanter Unterschied in der Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration im Vergleich zu WT-Zellen quantifiziert (siehe Punkt 3.5.3). Die gezeigten Daten lassen keine Belege für eine Rolle von TRPA1 als Hyperoxie-Sensor in Epithelzellen des Respirationstrakts zu.

Um die *in-vivo* Langzeit-Kanalfunktion TRPA1-defizienter Stämme während chronischer Hyperoxie zu untersuchen, wurde das Modell der Hyperoxie-induzierten alveolären Hyperplasie durchgeführt. Nach Haltung von TRPA1-defizienten und WT-Mäusen in hyperoxischer Atmosphäre wurden jedoch auch hier keine Unterschiede zwischen TRPA1-defizienten und Wild-Typ Mäusen in der Ausbildung einer Hyperoxie-induzierten epithelialen Hyperplasie festgestellt (siehe Punkt 3.7.2).

Bisher war es nicht klar, ob TRPA1 als Hyperoxie-Sensor in nicht-neuronalen Lungenepithelzellen eine kritische Rolle bei akuten und langfristigen adaptiven Reaktionen während einer Hyperoxie-Exposition spielt. Obwohl eine Beteiligung des TRPA1-Kanals als Sauerstoffsensor in anderen Geweben nicht auszuschließen ist, scheint das TRPA1-Kanalprotein keine Schlüsselrolle in pulmonalen Epithelzellen während hyperoxischer Zustände einzunehmen.

Die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Yasuo Mori konnte erhöhte Aktionspotentiale in humanen zervikalen Wild-Typ-, nicht aber in TRPA1-defizienten Stämmen als Reaktion auf Hyperoxie und Hypoxie demonstrieren, indem die Regulation der Atemfrequenz während hyperoxischer und hypoxischer Exposition in trachealen Nervenendigungen detektiert wurde [81]. TRPA1-Kanäle sind also essentiell für die neuronale Detektion von Sauerstoffspiegeln und die Regulierung der Atemfrequenz. Mit den gewonnenen Daten in nicht-neuronalen murinen pulmonalen Geweben soll auf keinen Fall die Funktion des TRPA1-Kanals als Sauerstoff-Sensor in neuronalen Geweben ausgeschlossen werden. Allerdings zeigten auch die *in-vivo* Experimente zur Haltung der Mäuse in hyperoxischer Atmosphäre keine Unterschiede in der Ausprägung einer Epithelzellhyperplasie in TRPA1-defizienten im Vergleich zu WT-Mäusen, obwohl hier auch neuronale Gewebe beteiligt waren. TRPA1 Kanäle sind also in neuronalen

und nicht-neuronalen Geweben für die Hyperoxie-induzierte Gewebeschädigung sowie für die Hyperplasie alveolärer Epithelzellen und wahrscheinlich auch für die Entstehung der hyperoxischen Lungenfibrose kaum von Relevanz.

Im deutlichen Kontrast zu den Ergebnissen mit hyperoxischer Lösung zeigte die Applikation von hypoxischer Lösung auf nicht-neuronale Epithelzellen des Respirationstrakts, isoliert aus Trachea, Bronchien und Alveolen, Unterschiede in der Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zwischen TRPA1-defizienten und WT-Zellen. Am deutlichsten waren diese Unterschiede in ATII-Zellen (siehe Abbildung 69 und 70) und weniger offensichtlich in bronchealen Epithelzellen (siehe Abbildung 67 und 68), während in trachealen Epithelzellen die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration eher verzögert war (siehe Abbildungen 65 und 66). Weiterführende Experimente zur Haltung von TRPA1-defizienten und WT-Mäusen in hypoxischer Atmosphäre werden momentan durchgeführt, um diese interessanten Daten *in-vivo* zu bestätigen.

Zusammenfassend konnte ich in meiner Arbeit also erstmals TRPA1 mRNAs in nicht neuronalen Epithelzellen des Respirationstrakts direkt mit Hilfe der Nanostring®-Technologie quantifizieren, sowie das TRPA1-Protein in ATII-Zellen nachweisen. Nach Applikation hypoxischer und hyperoxischer Lösung, konnten in Ca^{2+} -Einstrom-Experimenten Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in primären trachealen, bronchialen Epithelzellen und ATII-Zellen von WT und TRPA1-defizienten Mäusen quantifiziert werden. Mit Hypoxie behandelte TRPA1-defiziente Zellen zeigten aber einen signifikant schwächeren intrazellulären Ca^{2+} -Einstrom im Vergleich zu den WT-Zellen. Es konnten ebenfalls keine Unterschiede in den charakteristischen Verdickungen der alveolären Septen zwischen den Genotypen nach der Haltung in sauerstoffreicher Atmosphäre beobachtet werden. Im Modell der isolierten perfundierten Lunge wurden ebenfalls keine Unterschiede in der Ödembildung nach Applikation von Ischämie festgestellt, während TRPA1-defiziente Lungen eine deutlich stärkere Ödembildung nach Applikation von Halb-Lost (2-Chloroethylethylsulfid (CEES)) als Kontrolllungen zeigten. Weitere Experimente zur Rolle von TRPA1 als Sauerstoffsensoren und für die Detektion von chemischen Kampfstoffen in nicht-neuronalen Geweben sollten folgen, um den Kanal eindeutig als pharmakologische Zielsubstanz für die Therapie toxischer Schäden identifizieren zu können.

➤ Eidesstattliche Versicherung

Ich, Martina Margarete Kannler, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema: „TRPA1-Kationenkanäle: Expression und Funktion als Sauerstoff-Sensoren in Epithelzellen des respiratorischen Systems" selbstständig 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.

Neusäß, 07.02.2020

Ort, Datum

Unterschrift Martina Kannler

➤ Danksagung

Allen voran bedanke ich mich bei Prof. Dr. Thomas Gudermann, der mir ermöglichte an seinem Institut meine Doktorarbeit durchzuführen.

An meinen Doktorvater Prof. Dr. Alexander Dietrich. VIELEN DANK für deine Unterstützung und Hilfestellung in allen Phasen meiner Doktorarbeit und für die Möglichkeit wissenschaftlich zu arbeiten. Während meiner Zeit als Ph.D.-Studentin konnte ich sehr, sehr viele Dinge lernen und meinen Horizont erweitern. DANKE für alles.

Danke für die sehr schöne und sehr kollegiale Zeit liebe AG Dietrich. Ich hatte immer sehr viel Freude mit euch zu arbeiten, zu diskutieren und den ein und anderen sehr lustigen Abend zu verbringen. Liebe Jana und liebe Kathi mit euch hat alles begonnen. Vielen Dank für die wissenschaftliche und auch moralische Unterstützung während unserer gemeinsamen Zeit am WSI. Ihr seid toll! Ein großes Dankeschön auch an Susanne, Bettina, Larissa und auch Jonas. Danke für eure sehr gute Zusammenarbeit, Unterstützung und vieles mehr. Natürlich auch in die Einführung der Jugendsprache. #Swagger

Liebes Tierstall-Team. DANKE für eure immer sehr gute und verlässliche Zusammenarbeit. Der ein oder andere Versuch hätte ohne eure Mithilfe nicht stattfinden können.

Vielen Dank an das gesamte WSI und an alle AGs für die kollegiale und schöne Zeit.

Liebe Marion und Hildegard. DANKE euch für die langen Abende der Diskussion bei einem Gläschen Wein und Kerzenschein. Noch größeren Dank für die langen Stunden des Korrekturlesens.

Meine liebe Familie bei euch möchte ich besonders für die moralische Unterstützung und die motivierenden lieben Worte während meiner Doktorarbeit danken. In schwierigen Phasen habt Ihr mir Mut zugesprochen und mich ermutigt nicht aufzugeben. DANKE an meine lieben Eltern Marija und Manfred Kannler. DANKE auch an meine himmlischen Schwestern Tanja und Claudia.

Lieber Oli. Danke, dass du mich die letzten 5 Jahre begleitet, mich ermutigt und auch kritisch hinterfragt hast. DANKE für deine Unterstützung und für dein Vertrauen in meine Arbeit.

➤ Literaturverzeichnis

- [1] E. Siasou, D. Johnson, and N.J. Willey, *An Extended Dose–Response Model for Microbial Responses to Ionizing Radiation*. *Frontiers in Environmental Science*, 2017. **5**(6).
- [2] R.G. Lottes, D.A. Newton, D.D. Spyropoulos, and J.E. Baatz, *Alveolar type II cells maintain bioenergetic homeostasis in hypoxia through metabolic and molecular adaptation*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2014. **306**(10): p. L947-55.
- [3] M. McElroy and M. Kasper, *The use of alveolar epithelial type I cell-selective markers to investigate lung injury and repair*. *European Respiratory Journal*, 2004. **24**(4): p. 664-673.
- [4] T. Volckaert and S. De Langhe, *Lung epithelial stem cells and their niches: Fgf10 takes center stage*. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2014. **7**: p. 8.
- [5] W. Rokicki, M. Rokicki, J. Wojtacha, and A. Dzeljijli, *The role and importance of club cells (Clara cells) in the pathogenesis of some respiratory diseases*. *Kardiochir Torakochirurgia Pol*, 2016. **13**(1): p. 26-30.
- [6] J.R. Rock, M.W. Onaitis, E.L. Rawlins, Y. Lu, et al., *Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009. **106**(31): p. 12771-12775.
- [7] S.D. Reynolds and A.M. Malkinson, *Clara cell: progenitor for the bronchiolar epithelium*. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2010. **42**(1): p. 1-4.
- [8] B.L. Hogan, C.E. Barkauskas, H.A. Chapman, J.A. Epstein, et al., *Repair and regeneration of the respiratory system: complexity, plasticity, and mechanisms of lung stem cell function*. *Cell stem cell*, 2014. **15**(2): p. 123-138.
- [9] M. Kasper and G. Haroske, *Alterations in the alveolar epithelium after injury leading to pulmonary fibrosis*. *Histology and histopathology*, 1996. **11**(2): p. 463-483.
- [10] S. Wang and R.D. Hubmayr, *Type I alveolar epithelial phenotype in primary culture*. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 2011. **44**(5): p. 692-699.
- [11] J. Chen, Z. Chen, T. Narasaraju, N. Jin, et al., *Isolation of highly pure alveolar epithelial type I and type II cells from rat lungs*. *Laboratory Investigation*, 2004. **84**(6): p. 727.
- [12] M.C. Ghosh, V. Gorantla, P.S. Makena, C. Luellen, et al., *Insulin-like growth factor-I stimulates differentiation of AII cells to ATI-like cells through activation of Wnt5a*. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2013. **305**(3): p. L222-L228.
- [13] R. Kalluri and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. *The Journal of clinical investigation*, 2010. **120**(5): p. 1786-1786.
- [14] K.K. Kim, M.C. Kugler, P.J. Wolters, L. Robillard, et al., *Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006. **103**(35): p. 13180-13185.
- [15] J.M. Lee, S. Dedhar, R. Kalluri, and E.W. Thompson, *The epithelial–mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease*. *J Cell Biol*, 2006. **172**(7): p. 973-981.
- [16] L.M. Davidson and S.K. Berkelhamer, *Bronchopulmonary dysplasia: chronic lung disease of infancy and long-term pulmonary outcomes*. *Journal of clinical medicine*, 2017. **6**(1): p. 4.
- [17] A. Burges, A.-M. Allmeling, C. Hammer, and F. Krombach. *Hyperoxie-induzierte Veränderungen der Alveolarmakrophagenfunktion*. in *Chirurgisches Forum'91 für experimentelle und klinische Forschung*. 1991. Springer.
- [18] F. Chabot, J. Mitchell, J. Gutteridge, and T. Evans, *Reactive oxygen species in acute lung injury*. *European Respiratory Journal*, 1998. **11**(3): p. 745-757.
- [19] B.M. Babior, *NADPH oxidase*. *Current opinion in immunology*, 2004. **16**(1): p. 42-47.
- [20] F. Filip-Ciubotaru, C. Manciu, G. Stoleru, and F. Liliana, *Nadph oxidase: structure and activation mechanisms (review)*. *Note I. The Medical-Surgical Journal*, 2016. **120**(1): p. 29-33.
- [21] W.J. Mach, A.R. Thimmesch, J.T. Pierce, and J.D. Pierce, *Consequences of hyperoxia and the toxicity of oxygen in the lung*. *Nursing research and practice*, 2011. **2011**.

- [22] E. Roan, K. Wilhelm, A. Bada, P.S. Makena, *et al.*, *Hyperoxia alters the mechanical properties of alveolar epithelial cells*. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 2012. **302**(12): p. L1235-L1241.
- [23] C. Barazzone, S. Horowitz, Y.R. Donati, I. Rodriguez, *et al.*, *Oxygen toxicity in mouse lung: pathways to cell death*. American journal of respiratory cell and molecular biology, 1998. **19**(4): p. 573-581.
- [24] T.E. Zaher, E.J. Miller, D.M. Morrow, M. Javdan, *et al.*, *Hyperoxia-induced signal transduction pathways in pulmonary epithelial cells*. Free Radical Biology and Medicine, 2007. **42**(7): p. 897-908.
- [25] Z.-W. Ye, J. Zhang, D.M. Townsend, and K.D. Tew, *Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2015. **1850**(8): p. 1607-1621.
- [26] V. Bhandari, *Molecular mechanisms of hyperoxia-induced acute lung injury*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 6653-6661.
- [27] M. De Perrot, M. Liu, T.K. Waddell, and S. Keshavjee, *Ischemia-reperfusion-induced lung injury*. American journal of respiratory and critical care medicine, 2003. **167**(4): p. 490-511.
- [28] H.K. Eltzschig and T. Eckle, *Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation*. Nature medicine, 2011. **17**(11): p. 1391.
- [29] L.B. Ware and M.A. Matthay, *Acute pulmonary edema*. New England Journal of Medicine, 2005. **353**(26): p. 2788-2796.
- [30] D. Garden and D. Granger, *Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury*. J Pathol, 2000. **190**(3): p. 255-266.
- [31] W.A. Den Hengst, J.F. Gielis, J.Y. Lin, P.E. Van Schil, *et al.*, *Lung ischemia-reperfusion injury: a molecular and clinical view on a complex pathophysiological process*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2010. **299**(5): p. H1283-H1299.
- [32] C. Montell and G.M. Rubin, *Molecular characterization of the Drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction*. Neuron, 1989. **2**(4): p. 1313-1323.
- [33] X. Zhu, P.B. Chu, M. Peyton, and L. Birnbaumer, *Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the Drosophila trp gene*. FEBS letters, 1995. **373**(3): p. 193-198.
- [34] D.E. Clapham, *TRP channels as cellular sensors*. Nature, 2003. **426**(6966): p. 517.
- [35] C. Montell, L. Birnbaumer, V. Flockerzi, R.J. Bindels, *et al.*, *A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels*. Molecular cell, 2002. **9**(2): p. 229-231.
- [36] B. Nilius and V. Flockerzi, *Mammalian transient receptor potential (TRP) cation channels*. TRPA1, ed. Zygmunt and Högestätt. 2014, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin.
- [37] S. Benemei, R. Patacchini, M. Trevisani, and P. Geppetti, *TRP channels*. Current opinion in pharmacology, 2015. **22**: p. 18-23.
- [38] A.P. Christensen and D.P. Corey, *TRP channels in mechanosensation: direct or indirect activation?* Nature Reviews Neuroscience, 2007. **8**(7): p. 510.
- [39] I.S. Ramsey, M. Delling, and D.E. Clapham, *An introduction to TRP channels*. Annu. Rev. Physiol., 2006. **68**: p. 619-647.
- [40] K. Venkatachalam and C. Montell, *TRP channels*. Annu. Rev. Biochem., 2007. **76**: p. 387-417.
- [41] A. Dietrich, M.M. Y Schnitzler, M. Gollasch, V. Gross, *et al.*, *Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6^{-/-} mice*. Molecular and cellular biology, 2005. **25**(16): p. 6980-6989.
- [42] A. Dietrich, H. Kalwa, B. Fuchs, F. Grimminger, *et al.*, *In vivo TRPC functions in the cardiopulmonary vasculature*. Cell calcium, 2007. **42**(2): p. 233-244.
- [43] A. Dietrich, H. Kalwa, and T. Gudermann, *TRPC channels in vascular cell function*. Thrombosis and haemostasis, 2010. **103**(02): p. 262-270.
- [44] N. Weissmann, A. Dietrich, B. Fuchs, H. Kalwa, *et al.*, *Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(50): p. 19093-8.
- [45] N. Weissmann, A. Sydykov, H. Kalwa, U. Storch, *et al.*, *Activation of TRPC6 channels is essential for lung ischaemia-reperfusion induced oedema in mice*. Nat Commun, 2012. **3**: p. 649.

- [46] A. Patapoutian, S. Tate, and C.J. Woolf, *Transient receptor potential channels: targeting pain at the source*. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2009. **8**(1): p. 55.
- [47] C. Moore, R. Gupta, S.-E. Jordt, Y. Chen, *et al.*, *Regulation of pain and itch by TRP channels*. *Neuroscience bulletin*, 2018: p. 1-23.
- [48] F. De Logu, R. Patacchini, G. Fontana, and P. Geppetti. *TRP functions in the broncho-pulmonary system*. in *Seminars in immunopathology*. 2016. Springer.
- [49] K. Hofmann, S. Fiedler, S. Vierkotten, J. Weber, *et al.*, *Classical transient receptor potential 6 (TRPC6) channels support myofibroblast differentiation and development of experimental pulmonary fibrosis*. *Biochim Biophys Acta*, 2017. **1863**(2): p. 560-568.
- [50] S. Shimizu, N. Takahashi, and Y. Mori, *TRPs as chemosensors (ROS, RNS, RCS, gasotransmitters)*, in *Mammalian transient receptor potential (TRP) cation channels*. 2014, Springer. p. 767-794.
- [51] T.R.H. Büch, E.a.M. Schäfer, M.-T. Demmel, I. Boekhoff, *et al.*, *Functional expression of the transient receptor potential channel TRPA1, a sensor for toxic lung inhalants, in pulmonary epithelial cells*. *Chemico-biological interactions*, 2013. **206**(3): p. 462-471.
- [52] B. Stenger, F. Zehfuss, H. Muckter, A. Schmidt, *et al.*, *Activation of the chemosensing transient receptor potential channel A1 (TRPA1) by alkylating agents*. *Arch Toxicol*, 2015. **89**(9): p. 1631-43.
- [53] T. Büch, E. Schäfer, D. Steinritz, A. Dietrich, *et al.*, *Chemosensory TRP channels in the respiratory tract: role in toxic lung injury and potential as "sweet spots" for targeted therapies*, in *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Vol. 165*. 2013, Springer. p. 31-65.
- [54] A. Dietrich, D. Steinritz, and T. Gudermann, *Transient receptor potential (TRP) channels as molecular targets in lung toxicology and associated diseases*. *Cell calcium*, 2017.
- [55] D. Stickel, *Cytosolic and mitochondrial Ca²⁺ handling in pulmonary arterial smooth muscle and endothelial cells*. 2017, Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Ludwigs-Maximilians-Universität München: München.
- [56] T.R. Martin, N. Hagimoto, M. Nakamura, and G. Matute-Bello, *Apoptosis and epithelial injury in the lungs*. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2005. **2**(3): p. 214-220.
- [57] L.B. Ware and M.A. Matthay, *Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome*. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2001. **163**(6): p. 1376-1383.
- [58] Y. Gwack, S. Srikanth, S. Feske, F. Cruz-Guilloty, *et al.*, *Biochemical and functional characterization of Orai proteins*. *Journal of Biological Chemistry*, 2007. **282**(22): p. 16232-16243.
- [59] Y. Wang, X. Deng, and D.L. Gill, *Calcium signaling by STIM and Orai: intimate coupling details revealed*. *Sci. Signal.*, 2010. **3**(148): p. pe42-pe42.
- [60] C.E. Paulsen, J.-P. Armache, Y. Gao, Y. Cheng, *et al.*, *Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms*. *Nature*, 2015. **520**(7548): p. 511.
- [61] D. Jaquemar, T. Schenker, and B. Trueb, *An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts*. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. **274**(11): p. 7325-7333.
- [62] B. Nilius, G. Appendino, and G. Owsianik, *The transient receptor potential channel TRPA1: from gene to pathophysiology*. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 2012. **464**(5): p. 425-458.
- [63] K. Kang, V.C. Panzano, E.C. Chang, L. Ni, *et al.*, *Modulation of TRPA1 thermal sensitivity enables sensory discrimination in Drosophila*. *Nature*, 2012. **481**(7379): p. 76.
- [64] D.M. Bautista, M. Pellegrino, and M. Tsunozaki, *TRPA1: A gatekeeper for inflammation*. *Annual review of physiology*, 2013. **75**.
- [65] W.Y. Cheung, *Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation*. *Science*, 1980. **207**(4426): p. 19-27.
- [66] Y. Kureishi, S. Kobayashi, M. Amano, K. Kimura, *et al.*, *Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation*. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. **272**(19): p. 12257-12260.

- [67] A. Horowitz, C.B. Menice, R. Laporte, and K.G. Morgan, *Mechanisms of smooth muscle contraction*. *Physiological reviews*, 1996. **76**(4): p. 967-1003.
- [68] Z. Zhang, J. Tang, S. Tikunova, J.D. Johnson, *et al.*, *Activation of Trp3 by inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptors through displacement of inhibitory calmodulin from a common binding domain*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001. **98**(6): p. 3168-3173.
- [69] B.F. Bessac, M. Sivula, C.A. Von Hehn, J. Escalera, *et al.*, *TRPA1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons*. *The Journal of clinical investigation*, 2008. **118**(5): p. 1899-1910.
- [70] I. Mukhopadhyay, P. Gomes, S. Aranake, M. Shetty, *et al.*, *Expression of functional TRPA1 receptor on human lung fibroblast and epithelial cells*. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 2011. **31**(5): p. 350-358.
- [71] M. Sekiguchi, Y. Futei, Y. Fujii, T. Iwasaki, *et al.*, *Non-neuronal expression of transient receptor potential type A1 (TRPA1) in human skin*. *Journal of Investigative Dermatology*, 2009. **129**: p. 2312-2315.
- [72] B. Stenger, T. Popp, H. John, M. Siegert, *et al.*, *N-Acetyl-L-cysteine inhibits sulfur mustard-induced and TRPA1-dependent calcium influx*. *Arch Toxicol*, 2017. **91**(5): p. 2179-2189.
- [73] J. Chen and D.H. Hackos, *TRPA1 as a drug target—promise and challenges*. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 2015. **388**(4): p. 451-463.
- [74] A. Hinman, H.-H. Chuang, D.M. Bautista, and D. Julius, *TRP channel activation by reversible covalent modification*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006. **103**(51): p. 19564-19568.
- [75] A.A. Aubdool, R. Graepel, X. Kodji, K.M. Alawi, *et al.*, *TRPA1 is essential for the vascular response to environmental cold exposure*. *Nature Communications*, 2014. **5**: p. 5732.
- [76] S. Jabba, R. Goyal, J.O. Sosa-Pagán, H. Moldenhauer, *et al.*, *Directionality of temperature activation in mouse TRPA1 ion channel can be inverted by single-point mutations in ankyrin repeat six*. *Neuron*, 2014. **82**(5): p. 1017-1031.
- [77] Y. Karashima, K. Talavera, W. Everaerts, A. Janssens, *et al.*, *TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009. **106**(4): p. 1273-1278.
- [78] J. Chen, D. Kang, J. Xu, M. Lake, *et al.*, *Species differences and molecular determinant of TRPA1 cold sensitivity*. *Nature communications*, 2013. **4**: p. 2501.
- [79] O. Caspani and P.A. Heppenstall, *TRPA1 and cold transduction: an unresolved issue?* *The Journal of general physiology*, 2009. **133**(3): p. 245-249.
- [80] D.D. Mckemy, *How cold is it? TRPM8 and TRPA1 in the molecular logic of cold sensation*. *Molecular pain*, 2005. **1**(1): p. 16.
- [81] Y. Mori, N. Takahashi, T. Kurokawa, and S. Kiyonaka, *TRP channels in oxygen physiology: distinctive functional properties and roles of TRPA1 in O₂ sensing*. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 2017. **93**(7): p. 464-482.
- [82] Y. Mori, N. Takahashi, O.K. Polat, T. Kurokawa, *et al.*, *Redox-sensitive transient receptor potential channels in oxygen sensing and adaptation*. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 2016. **468**(1): p. 85-97.
- [83] N. Takahashi, T. Kuwaki, S. Kiyonaka, T. Numata, *et al.*, *TRPA1 underlies a sensing mechanism for O₂*. *Nature chemical biology*, 2011. **7**(10): p. 701-711.
- [84] N. Takahashi, D. Kozai, and Y. Mori, *TRP channels: sensors and transducers of gasotransmitter signals*. *Frontiers in physiology*, 2012. **3**: p. 324.
- [85] N. Takahashi, T. Kuwaki, S. Kiyonaka, T. Numata, *et al.*, *TRPA1 underlies a sensing mechanism for O₂*. *Nature chemical biology*, 2011. **7**(10): p. 701.
- [86] B. Kremeyer, F. Lopera, J.J. Cox, A. Momin, *et al.*, *A gain-of-function mutation in TRPA1 causes familial episodic pain syndrome*. *Neuron*, 2010. **66**(5): p. 671-680.
- [87] R. Gupta, S. Saito, Y. Mori, S.G. Itoh, *et al.*, *Structural basis of TRPA1 inhibition by HC-030031 utilizing species-specific differences*. *Scientific Reports*, 2016. **6**: p. 37460.
- [88] S.M. Brooks, M.A. Weiss, and I. Bernstein, *Reactive airways dysfunction syndrome (RADS): persistent asthma syndrome after high level irritant exposures*. *Chest*, 1985. **88**(3): p. 376-384.

- [89] B.F. Bessac, M. Sivula, C.A. Von Hehn, A.I. Caceres, *et al.*, *Transient receptor potential ankyrin 1 antagonists block the noxious effects of toxic industrial isocyanates and tear gases*. *FASEB J*, 2009. **23**(4): p. 1102-14.
- [90] L. Frank, *Developmental aspects of experimental pulmonary oxygen toxicity*. *Free Radic Biol Med*, 1991. **11**(5): p. 463-94.
- [91] D. Kondrikov, R.B. Caldwell, Z. Dong, and Y. Su, *Reactive oxygen species-dependent RhoA activation mediates collagen synthesis in hyperoxic lung fibrosis*. *Free Radic Biol Med*, 2011. **50**(11): p. 1689-98.
- [92] E. Schäfer, *Non-neuronale Expression und Funktion des sensorischen Kationenkanals TRPA1 in Tumorzellen*. 2014, lmu.
- [93] E. Schaefer, *Non-neuronale Expression und Funktion des sensorischen Kationenkanals TRPA1 in Tumorzellen*. 2013, Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Ludwig-Maximilians-Universität München: München.
- [94] A. Gautam, R. Vijayaraghavan, M. Sharma, and G. Kumaran, *Comparative Toxicity Studies Of Sulfur Mustard (2,2'-Dichloro Diethyl Sulfide) And Monofunctional Sulfur Mustard (2-Chloroethyl Ethyl Sulfide), Administered Through Various Routes In Mice*. Vol. 4. 2006.
- [95] Nanostring Technologies, *nCounter Elements™ General purpose Reagents* 2013.
- [96] G.K. Geiss, R.E. Bumgarner, B. Birditt, T. Dahl, *et al.*, *Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs*. *Nature biotechnology*, 2008. **26**(3): p. 317.
- [97] J. Demleitner, *Molekulare Analyse der Funktion des TRPC6-Kanals in primären Podozyten der Maus* 2015, Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Ludwig-Maximilians-Universität München: München.
- [98] C.C. Hsia, D.M. Hyde, M. Ochs, and E.R. Weibel, *An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: standards for quantitative assessment of lung structure*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010. **181**(4): p. 394-418.
- [99] Nanostring®. *nSolver™ 4.0 Analysis Software User Manual*. 2017 22.01.2018]; Available from: https://www.nanostring.com/application/files/2915/1060/0919/nSolver_4.0_User_Manual.pdf.
- [100] H.S. Elektronik. *HA-HSE HSE PULMODYN SOFTWARE FOR RESPIRATORY STUDIES FOR WINDOWS XP, WINDOWS 7 AND HIGHER (32 AND 64 BIT)*. 29.01.2018]; Available from: <https://www.hugo-sachs.de/index.php/respiratory-research/software/pulmodyn-software/hse-ha-pulmodyn-w-software-for-respiratory-studies.html>.
- [101] V. Chubanov, S. Ferioli, A. Wisnowsky, D.G. Simmons, *et al.*, *Epithelial magnesium transport by TRPM6 is essential for prenatal development and adult survival*. *Elife*, 2016. **5**.
- [102] Thermo Fisher Scientific. *Lipofectamine® 2000 Reagent - Thermo Fisher Scientific*. 29.01.2018]; Available from: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Lipofectamine_2000_Reag_protocol.pdf.
- [103] K. Mutze, S. Vierkotten, J. Milosevic, O. Eickelberg, *et al.*, *Enolase 1 (ENO1) and protein disulfide-isomerase associated 3 (PDIA3) regulate Wnt/beta-catenin-driven trans-differentiation of murine alveolar epithelial cells*. *Dis Model Mech*, 2015. **8**(8): p. 877-90.
- [104] M. Corti, A.R. Brody, and J.H. Harrison, *Isolation and primary culture of murine alveolar type II cells*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1996. **14**(4): p. 309-15.
- [105] L.G. Dobbs, *Isolation and culture of alveolar type II cells*. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 1990. **258**(4): p. L134-L147.
- [106] L. Zhao, M. Yee, and M.A. O'reilly, *Transdifferentiation of alveolar epithelial type II to type I cells is controlled by opposing TGF-beta and BMP signaling*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013. **305**(6): p. L409-18.
- [107] D.J. Davidson, F.M. Kilanowski, S.H. Randell, D.N. Sheppard, *et al.*, *A primary culture model of differentiated murine tracheal epithelium*. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2000. **279**(4): p. L766-L778.

- [108] C.A. Staab-Weijnitz, I.E. Fernandez, L. Knuppel, J. Maul, *et al.*, *FK506-Binding Protein 10, a Potential Novel Drug Target for Idiopathic Pulmonary Fibrosis*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2015. **192**(4): p. 455-67.
- [109] G.B. Waypa, J.D. Marks, M.M. Mack, C. Boriboun, *et al.*, *Mitochondrial reactive oxygen species trigger calcium increases during hypoxia in pulmonary arterial myocytes*. *Circulation research*, 2002. **91**(8): p. 719-726.
- [110] Zeiss. *Laser-Mikrodissektion*. 2006 22.01.2018]; Available from: <https://www.zeiss.de/mikroskopie/produkte/laser-mikrodissektion.html>.
- [111] Carl Zeiss Microscopy, *LCM Protocols-Protein Handling for LC/MS*. 2011: Jena.
- [112] Nanostring®. *nCounter Elements™ XT Reagents USER MANUAL*. 29.01.2018]; Available from: https://www.nanostring.com/application/files/9814/8978/2393/LBL-10241_nCounter_Elements_XT_User_Manual_EX-US.pdf.
- [113] B. Adam, B. Afzali, K.M. Dominy, E. Chapman, *et al.*, *Multiplexed color-coded probe-based gene expression assessment for clinical molecular diagnostics in formalin-fixed paraffin-embedded human renal allograft tissue*. *Clin Transplant*, 2016. **30**(3): p. 295-305.
- [114] Quiagen. *RNeasy Lipid Tissue Handbook*. 22.01.2018]; Available from: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=bcff828a-b4f0-4de0-9cc5-36331a5dc95f&lang=en>.
- [115] J.N. Sleigh, G.A. Weir, and G. Schiavo, *A simple, step-by-step dissection protocol for the rapid isolation of mouse dorsal root ganglia*. *BMC Res Notes*, 2016. **9**: p. 82.
- [116] Thermo Fisher Scientific. *Thermo Scientific Pierce Protein Assay Technical Handbook*. 28.02.2018]; Available from: www.nugi-zentrum.de/fileadmin/website_uni_ulm/nugi/Experimente/Biochemie/Protein-Bestimmung/Protein_Bestimmung_Handbuch_Kopie.pdf.
- [117] S. Kawakishi and M. Namiki, *Decomposition of allyl isothiocyanate in aqueous solution*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1969. **33**(3): p. 452-459.
- [118] B. Fuchs, H. Kalwa, N. Weissmann, T. Gudermann, *et al.*, *Hypoxia-dependent TRP channel function in pulmonary arterial smooth muscle cells*, in *TRP Channels in Drug Discovery*. 2012, Springer. p. 283-300.
- [119] Hugo Sachs Elektronik. *IPL-2 Rat/Guinea Pig Lung*. 29.01.2018]; Available from: <https://www.hugo-sachs.de/index.php/perfusion-systems-organ-baths/organ-perfusion/isolated-perfused-lung-systems/rat-guinea-pig-lung.html>.
- [120] S. Leibl, M. Gogg-Kammerer, A. Sommersacher, H. Denk, *et al.*, *Metaplastic breast carcinomas: are they of myoepithelial differentiation?: immunohistochemical profile of the sarcomatoid subtype using novel myoepithelial markers*. *The American journal of surgical pathology*, 2005. **29**(3): p. 347-353.
- [121] J.S. Lewis Jr, J.H. Ritter, and S. El-Mofty, *Alternative epithelial markers in sarcomatoid carcinomas of the head and neck, lung, and bladder—p63, MOC-31, and TTF-1*. *Modern Pathology*, 2005. **18**(11): p. 1471.
- [122] K. Aoshiba, N. Yokohori, and A. Nagai, *Alveolar wall apoptosis causes lung destruction and emphysematous changes*. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 2003. **28**(5): p. 555-562.
- [123] W.W. Franke, D.L. Schiller, R. Moll, S. Winter, *et al.*, *Diversity of cytokeratins: differentiation specific expression of cytokeratin polypeptides in epithelial cells and tissues*. *Journal of molecular biology*, 1981. **153**(4): p. 933-959.
- [124] M. Ugorski, P. Dziegiel, and J. Suchanski, *Podoplanin-a small glycoprotein with many faces*. *American journal of cancer research*, 2016. **6**(2): p. 370.
- [125] L. Dobbs, M. Johnson, J. Vanderbilt, L. Allen, *et al.*, *The great big alveolar TI cell: evolving concepts and paradigms*. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2010. **25**(1): p. 55-62.
- [126] L. Gao, P. Gonzalez-Rodriguez, P. Ortega-Saenz, and J. Lopez-Barneo, *Redox signaling in acute oxygen sensing*. *Redox Biol*, 2017. **12**: p. 908-915.

- [127] E.K. Weir, J. Lopez-Barneo, K.J. Buckler, and S.L. Archer, *Acute oxygen-sensing mechanisms*. N Engl J Med, 2005. **353**(19): p. 2042-55.
- [128] T. Numata, N. Ogawa, N. Takahashi, and Y. Mori, *TRP channels as sensors of oxygen availability*. Pflugers Arch, 2013. **465**(8): p. 1075-85.
- [129] P.M. Zygmunt and E.D. Hogestatt, *TRPA1*. Handb Exp Pharmacol, 2014. **222**: p. 583-630.
- [130] T.S. Hallstrand, L.J. Boitano, W.C. Johnson, C.A. Spada, *et al.*, *The timed walk test as a measure of severity and survival in idiopathic pulmonary fibrosis*. Eur Respir J, 2005. **25**(1): p. 96-103.
- [131] Q. Ding, T. Luckhardt, L. Hecker, Y. Zhou, *et al.*, *New insights into the pathogenesis and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis*. Drugs, 2011. **71**(8): p. 981-1001.
- [132] A. Fleig and V. Chubanov, *Andrea Fleig and Vladimir Chubanov*. Handbook of experimental pharmacology, 2014. **222**: p. 521.
- [133] X. Zhu, M. Jiang, M. Peyton, G. Boulay, *et al.*, *trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca²⁺ entry*. Cell, 1996. **85**(5): p. 661-671.
- [134] M. Nikolic, T. Sustersic, and N. Filipovic, *In vitro models and on-chip systems: Biomaterial interaction studies with tissues generated using lung epithelial and liver metabolic cell lines*. Frontiers in bioengineering and biotechnology, 2018. **6**: p. 120.
- [135] T.K. Finney-Hayward, M.O. Popa, P. Bahra, S. Li, *et al.*, *Expression of transient receptor potential C6 channels in human lung macrophages*. American journal of respiratory cell and molecular biology, 2010. **43**(3): p. 296-304.
- [136] M. Freichel, V. Tsvilovskyy, and J. Camacho Londoño, *TRPC4- and TRPC4-containing channels*. Vol. 222. 2014. 85-128.
- [137] S.O. Rahaman, L.M. Grove, S. Paruchuri, B.D. Southern, *et al.*, *TRPV4 mediates myofibroblast differentiation and pulmonary fibrosis in mice*. The Journal of clinical investigation, 2014. **124**(12): p. 5225-5238.
- [138] A. Dietrich, *Modulators of Transient Receptor Potential (TRP) Channels as Therapeutic Options in Lung Disease*. Pharmaceuticals, 2019. **12**(1): p. 23.
- [139] Y.S. Kim, J.Y. Son, T.H. Kim, S.K. Paik, *et al.*, *Expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in the rat trigeminal sensory afferents and spinal dorsal horn*. J Comp Neurol, 2010. **518**(5): p. 687-98.
- [140] S. Häfner, F. Burg, M. Kannler, N. Urban, *et al.*, *A (+)-larixol congener with high affinity and subtype selectivity towards TRPC6*. ChemMedChem, 2018.