

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. Dr. h.c. N. Roewer

**Endogene Lipide als neues Behandlungstarget im TRPA1-vermittelten
Entzündungsschmerz**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von

Jan Andreas Kloka
aus Frankfurt am Main

Würzburg, April 2018

Referentin: Prof. Dr. Heike Rittner
Koreferentin: Prof. Dr. Claudia Sommer
Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 26.04.2019

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Stand der Forschung	1
1.1.1	Allgemeine Einführung	1
1.1.2	Inflammatorische Hyperalgesie	2
1.1.3	Reaktive Sauerstoffspezies und Lipidperoxidation	2
1.1.4	TRPA1-abhängige Schmerzwahrnehmung	4
1.1.5	Monoklonaler Antikörper E06	4
1.1.6	Apolipoprotein ApoA-I D-4F	6
1.2	Fragestellungen der Dissertation	7
2	Material und Methoden	9
2.1	Zellkultur	9
2.1.1	Langzeitlagerung und Auftauvorgang von untransfizierten und stabil mit TRPA1-transfizierten HEK-293-Zellen	9
2.1.2	Kultivierung stabil mit TRPA1/V1-transfizierten und untransfizierten HEK-293-Zellen ...	10
2.2	Zellkultur von Spinalganglien	12
2.2.1	Spinalgangliengewinnung	12
2.2.2	Kultivierung der Spinalganglienzellen	12
2.3	Intrazelluläre Kalzium-Messungen	14
2.3.1	Grundlagen	14
2.3.2	Technischer Aufbau	17
2.4	Vorbereitung, Messung, Auswertung und Statistik	17
2.4.1	Überführung und Zelladhäsion auf den Messplättchen	17
2.4.2	Beladung der Zellen mit Fura-2/AM	17
2.4.3	Vorbereitung des Messvorganges	18
2.4.4	Messung	18
2.4.5	Auswertung	19
2.4.6	Statistik	19
2.5	Lipidextraktion als Vorbereitung für die MALDI-TOF Analyse	20
2.5.1	MALDI-TOF Analyse	20
2.5.2	Vorbereitung der Kontrollmessungen für die MALDI-TOF Analyse	21
2.5.3	Vorbereitung der Proben mit H ₂ O ₂ für die MALDI-TOF Analyse	22
2.6	Auflistung Materialien, Chemikalien, Puffer, Lösungen	23
2.6.1	Zellkultur	23
2.6.2	Spinalganglienpräparation und Kultivierung	24

2.6.3	Intrazelluläre Kalziummessung.....	25
2.6.4	Sonstige verwendete Messgeräte, Materialien und Software	27
3	Ergebnisse.....	28
3.1	Reduktion des 4-HNE bedingten Einstromes von Ca²⁺ durch E06 mAb und D-4F in HEK-293_{TRPA1} und DRGs.....	28
3.1.1	Blockade 4-HNE-induzierten Kalziumeinstromes durch E06 mAb in HEK _{TRPA1} -Zellen	28
3.1.2	Blockade des 4-HNE induzierten Kalziumeinstromes durch D-4F in HEK _{TRPA1} -Zellen	30
3.1.3	Blockade des 4-HNE induzierten Kalziumeinstromes durch HC-030031 in HEK _{TRPA1} -Zellen	32
3.1.4	Blockade des 4-HNE induzierten Kalziumeinstromes durch E06 mAb in sensiblen Spinalganglienzellen.....	34
3.1.5	Blockade des 4-HNE induzierten Kalziumeinstromes durch D-4F in sensiblen Spinalganglienzellen.....	36
3.2	Einfluss von E06 mAb und D-4F auf H₂O₂ in HEK-293_{TRPA1} und DRGs.....	38
3.2.1	Blockade des H ₂ O ₂ induzierten Kalziumeinstromes durch IgM und E06 mAb in HEK _{TRPA1} -Zellen	38
3.2.2	Blockade des H ₂ O ₂ induzierten Kalziumeinstromes durch D-4F in HEK _{TRPA1} -Zellen.....	40
3.2.3	Einfluss von HC-030031 auf den Effekt von H ₂ O ₂ in HEK _{TRPA1}	42
3.2.4	Blockade des durch H ₂ O ₂ verursachten Kalziumeinstromes durch E06 mAb in sensiblen Spinalganglienzellen.....	44
3.2.5	Blockade des durch H ₂ O ₂ verursachten Kalziumeinstromes durch D-4F in sensiblen Spinalganglienzellen.....	46
3.3	Kontrollmessungen an HEK-293_{TRPV1} und HEK-293-Zellen	48
3.3.1	Wirkung von Capsaicin + E06 mAb/D-4F auf TRPV1-Kanäle.....	48
3.3.2	Effekt von Lysophosphatidylcholin auf HEK-293-Zellen.....	50
3.4	Effekt von H₂O₂ auf Membranphospholipide der HEK-293-Zellen.....	52
4	Diskussion.....	53
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	53
4.2	Diskussion der Zellkulturen	54
4.2.1	Zellkultur HEK-293-Zelllinien	54
4.2.2	Zellkultur sensibler Spinalganglien.....	55
4.3	Diskussion des Calcium-Imaging	55
4.3.1	Absolute Kalziumkonzentration vs. Ratio	56
4.3.2	Lichteffekte auf die Fluoreszenzfarbstoffe	56
4.3.3	Selektionseffekt durch Auswahl der Zellen.....	57
4.3.4	Änderung der Zellmorphologie nach Agenszugabe.....	57
4.3.5	Temperatur als TRPA1-Aktivator.....	57

4.3.6	Agenszugabe mittels Eppendorf Pipette	57
4.4	Diskussion der MALDI-TOF Methode.....	58
4.5	Diskussion der Ergebnisse	59
4.5.1	Kalziumeinstrom durch LPC in HEK-293-Zellen	60
4.5.2	D-4F und E06 mAb blockieren den durch 4-HNE verursachten Kalziumeinstrom in HEK _{TRPA1} -293-Zellen.....	60
4.5.3	E06 mAb und D-4F blockieren den Kalziumeinstrom über die Interaktion mit OxPL und nicht spezifisch mit H ₂ O ₂	61
4.5.4	HC-030031 blockiert nur den durch 4-HNE bedingten Kalziumeinstrom	62
4.5.5	Keine nachweisbare Interaktion zwischen E06 mAb und D-4F mit dem TRPV1-Aktivator Capsaicin.....	63
4.5.6	D-4F und E06 mAb blockieren den durch 4-HNE hervorgerufenen Kalziumeinstrom in sensiblen Spinalganglienzellen	63
4.5.7	D-4F und E06 mAb blockieren den durch H ₂ O ₂ hervorgerufenen Kalziumeinstrom in DRGs nicht spezifisch.....	64
4.5.8	Kein Nachweis einer Lipidperoxidation der Zellmembran durch H ₂ O ₂	65
4.5.9	Schaubild der zusammenfassenden Einordnung der Ergebnisse im Bezug auf die aktuelle Literatur.....	66
4.5.10	Verifizierung der Hypothesen anhand der Ergebnisse.....	67
5	Zusammenfassung	69
6	Literatur- und Abbildungsverzeichnis	70
6.1	Abkürzungsverzeichnis	70
6.2	Abbildungsverzeichnis	72
6.3	Tabellenverzeichnis	73
6.4	Literaturverzeichnis	73

1 Einleitung

1.1 Stand der Forschung

1.1.1 Allgemeine Einführung

Schmerzen als Symptom oder Bestandteil von Entzündungsreaktionen wurden schon vor 2000 Jahren beschrieben (Celsus, „De Medicina“, ca. 25 – 35 n.Chr.). Die heute gültige und allgemein akzeptierte Definition des Schmerzes wurde von der Internationalen Gesellschaft zum Studium des Schmerzes (International Association for the Study of Pain, IASP) geprägt: „Schmerz ist ein unangenehmes Sinnes- oder Gefühlserlebnis, das mit tatsächlicher oder potenzieller Gewebeschädigung einhergeht oder von betroffenen Personen so beschrieben wird, als wäre eine solche Gewebeschädigung die Ursache.“ Des Weiteren definierte die IASP wichtige Begriffe für die Schmerzforschung und –medizin.

Anästhesie ist definiert als völlige Empfindungslosigkeit, die *Analgesie* als die Abwesenheit von Schmerz auf einen schmerzhaften Reiz. Empfindet man hingegen einen normalerweise nicht schmerzhaften Reiz (wie z.B. eine Berührung) als schmerzhaft so spricht man von einer *Allodynie*. Die *Hyperalgesie* bezeichnet eine gesteigerte Schmerzempfindung auf einen schmerzhaften Reiz bei herabgesetzter Schmerzschwelle. Die Schmerzaufnahme, -weiterleitung und -verarbeitung wird als Nozizeption bezeichnet. Die sensorischen Nervenendigungen, auch als Nozizeptor bezeichnet, können beispielsweise in inflammatorisch verändertem, hyperalgetischem Gewebe sensibilisiert werden, sodass die Erregungsschwelle der Nozizeptoren sinkt (www.dgss.de, www.iasp-pain.org, 26.11.2015).

In dieser Dissertation liegt der Fokus der Experimente auf der weiteren Erforschung der molekularen Prozesse zur Verringerung des Kalziumeinstromes in Nozizeptoren. Als Modell dient die Hyperalgesie im Rahmen des akuten nozizeptiven Schmerzes.

Eine akute Läsion geht mit einer inflammatorischen Veränderung des Gewebes einher (Foley, 2013). Diese Entzündungszeichen wurden schon von Celsus beschrieben („Klassische Entzündungszeichen nach Celsus“), dazu gehört:

1. Rubor (Rötung), als Folge der Hyperämie im betroffenen Gewebe
2. Calor (Überwärmung), als Folge der Hyperämie im betroffenen Gewebe
3. Tumor (Schwellung), durch Exsudation bedingt

4. Dolor (Schmerz), Hyperalgesie im betroffenen Gewebe

5. Functio laesa (eingeschränkte Funktion), eine gestörte Funktion durch Dolor und Tumor (Marchand et al., 2005; Rather, 1971)

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass es auch neuropathische Schmerzen nach neuronaler Schädigung, Schmerz ohne Zuordnung einer Schädigung oder einer kausalen Ursache möglich ist, wie es z.B. bei der Fibromyalgie vermutet wird (Woolf, 2010).

1.1.2 Inflammatorische Hyperalgesie

Die bei der Wundheilung, z.B. nach chirurgischen Eingriffen, auftretende Inflammation als Teil der Wundheilung gliedert sich in eine frühe und eine späte Phase. In der frühen Phase ist die Schmerzsensation vor allem durch die mechanische Schädigung und durch eine unspezifische Immunabwehr gekennzeichnet. Bei der unspezifischen Abwehr spielen vor allem neutrophile Granulozyten, als Vermittler der unspezifischen Immunreaktion, eine wichtige Rolle. Sie wandern aus dem Blutkreislauf in das geschädigte Gewebe ein und sind Teil der Wundheilung (Marchand et al., 2005). Rittner et al. konnten nachweisen, dass die neutrophilen Granulozyten nicht alleine für die entstehende Hyperalgesie verantwortlich sind (Rittner et al., 2006). Deshalb könnten die in der zweiten, späten Entzündungsphase in das Gewebe einwandernde Lymphozyten und Monozyten (welche sich später zu Makrophagen differenzieren) für die Entstehung einer Hyperalgesie mit verantwortlich sein (Brack et al., 2004). Marchand et al. konnten zumindest eine Beteiligung der von Lymphozyten sezernierten Entzündungsmediatoren bei der Entstehung bzw. Modulierung der Hyperalgesie beschreiben.

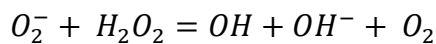
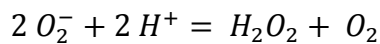
Makrophagen, Lymphozyten und neutrophile Granulozyten sind nicht nur an der Wundheilung beteiligt, sondern auch an der Phagozytose, der Antigenpräsentation und Infektionsabwehr. Vor allem für die Infektabwehr können diese zellulären Bestandteile sogenannte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) mittels NADPH-Oxidase generieren. Diese ROS sind für einen oxidativen „burst“ und die damit verbundene, effektive Abwehr von Bakterien und anderen pathogenen Organismen unerlässlich (de Oliveira-Junior et al., 2011). Der durch ROS und weitere Mediatoren ausgelöste oxidative Stress ist ein wichtiger Bestandteil der inflammatorischen Antwort (Binder et al., 2016).

1.1.3 Reaktive Sauerstoffspezies und Lipidperoxidation

Die reaktiven Sauerstoffspezies werden in den Lymphozyten mittels NADPH-Oxidase generiert, welche aus molekularem Sauerstoff Superoxidanionen (O_2^-) bildet. Im

inaktiven Zustand befindet sich die Untereinheiten von Cytochrom b558 (p22-phox, Rap1a und gp91-phox) membranständig und im Zytosol weitere notwendige Faktoren (Rac2, p40-phox, p47-phox, p67-phox). Auf einen entsprechenden Stimulus hin erfolgt eine Translozierung der zytosolischen Faktoren an die Membran zu den Untereinheiten von Cytochrom b558. Hierbei wird die Untereinheit p47 durch die Proteinkinase-C-phosphoryliert (McCann and Roulston, 2013). Anschließend erfolgt die Generierung mikrobiozider ROS aus molekularem Sauerstoff mittels NADPH-Oxidase.

Aus den entstehenden Superoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$) findet durch die Superoxid-Dismutase eine Reduktion zu H_2O_2 statt. Des Weiteren kann H_2O_2 mit anderen Wasserstoffperoxid-Molekülen zu hochreaktiven Hydroxylradikalen (OH^{\cdot}) reagieren. Die Reaktionen laufen nach folgenden Reaktionsgleichungen ab:



Die entstandenen ROS interagieren mit den mehrfach ungesättigten Lipiden in den Phospholipidmembranen der Zellen. Die Doppelbindungen sind prädestinierte Stellen für eine Interaktion der ROS mit den ungesättigten Lipiden. Nach der ersten Oxidation entsteht ein Lipidradikal. Dieses Lipidradikal kann mit dem ubiquitär vorkommenden molekularen Sauerstoff zu einem Lipidperoxidradikal reagieren. Nun können die umgebenden Phospholipide ein Wasserstoff an das Lipidperoxidradikal abgeben, es entsteht ein Lipidhydroperoxid. Bei dieser Reaktion wird ein weiteres Lipidradikal generiert. Lipidhydroperoxide zerfallen anschließend zu reaktiven Aldehyden, z.B. 4-Hydroxynonenal). Auf diese Weise entstehen u.a. die in dieser Dissertation verwendeten Substanzen Lysophosphatidylcholin (LPC) und als eines der Endprodukte der Lipidperoxidation das α,β -ungesättigter Aldehyd 4-Hydroxynonenal (4-HNE) (Ayala et al., 2014; Esterbauer et al., 1991).

Das Molekül LPC konnte regelhaft, nach Injektion von oxidierten 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (OxPAPC) in Rattenpfoten mit darauffolgender Hyperalgesie *in vivo*, in den MALDI-TOF Analysen von (Oehler et al., 2017) nachgewiesen werden. 4-HNE ist dafür bekannt *in vitro* einen Kalziueinstrom über den TRPA1-Kanal mit der daraus *in vivo* folgenden Hyperalgesie zu verursachen (Trevisani et al., 2007). Die Peroxidationsprodukte wirken konzentrationsabhängig zytotoxisch bzw. bakterizid. Menschliche Zellen können sich bis zu einem gewissen

Grad durch das Enzym Katalase, welches H₂O₂ Glutathion-abhängig abbaut (Pospisil, 2012), schützen. Trotzdem entsteht auch im menschlichen Körper durch oxidierte Phospholipide ein oxidativer Stress.

1.1.4 TRPA1-abhängige Schmerzwahrnehmung

TRPA1- und TRPV1-Kanäle gehören zur Familie der **Transient Receptor Potential Channel Ankyrin 1 / Vanilloid 1**. Es gibt 28 TRP-Kanäle, die strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen (Goswami and Islam, 2010). TRPA1-Kanäle besitzen sechs Transmembranhelices und jeweils intrazellulär liegende N- bzw. C-Terminalen. An der N-terminalen Domäne finden sich je nach Subtyp 14-18 Ankyrin Wiederholungen (Chen and Hackos, 2015). An dieser Domäne aktivieren elektrophilen TRPA1-Modulatoren den Kanal (Paulsen et al., 2015b). TRPA1-Kanäle finden sich auf Plasmamembranen der primär afferenten, nozizeptiven Neuronen (Ramsey et al., 2006). Sie werden in inflammatorisch verändertem Gewebe durch Entzündungsmediatoren aktiviert und sorgen durch einen unselektiven Ca²⁺-Einstrom für eine Hyperalgesie im betroffenen Gewebe (Andersson et al., 2008; Trevisani et al., 2007). Zu diesen Entzündungsmediatoren, die den TRPA1-Kanal aktivieren, gehören Lipidoxidationsprodukte wie 4-HNE (Trevisani et al., 2007) und ROS wie das in diesen Experimenten verwendete Wasserstoffperoxid (Trevisani et al., 2014). Darüber hinaus gibt es weitere, entzündungsunabhängige TRPA1-Mediatoren. In dieser Dissertation diente AITC (Allylthiocyanat) also Positivkontrolle für die mit TRPA1-transfizierten HEK-293-Zellen.

1.1.5 Monoklonaler Antikörper E06

E06 monoklonaler Antikörper ist ein aus der Arterioskleroseforschung bekannter Antikörper. Der Prozess der Arteriosklerose ist gekennzeichnet durch eine endotheliale Schädigung der arteriellen Intima mit dadurch hervorgerufener endothelialer Dysfunktion. Für die Pathogenese des Prozesses gibt es im wesentlichen zwei Erklärungsansätze:

1. Arteriosklerose ist bedingt durch oxidierte Lipoproteine (OxLDL siehe unten), welche sich in der Intima ablagern und von Makrophagen aufgenommen werden. Dadurch entstehen Schaumzellen, welche das arteriosklerotische Geschehen initiieren (Steinberg et al., 1989).

2. Arteriosklerose ist eine Reaktion auf eine stattgefundene Gewebsschädigung der Intima (z.B. durch arterielle Hypertonie). Im Rahmen der Wundheilung kommt es zu einer Einwanderung von Immunzellen, Bildung von Schaumzellen und einer entzündlichen Reaktion. (Ross and Glomset, 1976).

Neuere Veröffentlichungen weisen zunehmend auf eine enge Verzahnung der oben genannten Initiationsprozesse hin (Labos & Thanassoulis, 2018; Mallika et al., 2007).

Der weitere Verlauf ist unabhängig von der Entstehungshypothese jedoch identisch. Es kommt durch die Präsenz der Schaumzellen zu einer entzündlichen Reaktion, die einen herdförmigen Gewebsumbau (Plaques) mit der Einlagerung von Cholesterin, Fettsäuren und Calciumphosphat fördert (Tuttolomondo et al., 2012).

Low Density Lipoprotein (LDL) ist das Haupttransportvehikel des Cholesterins, welches sich als **Oxidiertes Low Density Lipoprotein (OxLDL)** in den arteriosklerotischen Läsionen und Plaques abgelagert. OxLDL fungiert als pro-inflammatorischer, chemotaktischer Faktor für Makrophagen und immunreaktive Zellen (Kobayashi et al., 2001).

Palinski et al. isolierten 1996 aus Apolipoprotein-E-defizienten Mäusen, die aufgrund der genetischen Änderung triglyzeridreiche Lipoproteinbestandteile nicht mehr verstoffwechseln konnten und deshalb bei entsprechender Ernährung Arteriosklerose entwickelten, eine Gruppe von Autoantikörpern, die gegen bestimmte Epitope von OxLDL gerichtet sind (sogenannte E0 Antikörper, wobei E0 mit E-defizient gleichzusetzen ist). Diese E0 Antikörper zeichneten sich durch eine antiinflammatorische Wirkung aus (Palinski et al., 1996). E06 monoklonaler Antikörper (E06 mAb) ist ein Autoantikörper der IgM Klasse der auch als T15 bezeichnet wird (Faria-Neto et al., 2006). Er rückte besonders in den Fokus der Forschung, da er an viele Metaboliten der oxidierten Phospholipide (OxPL) bindet, die Bestandteil von OxLDL sind. Hierbei zeigte sich besonders die Kopfgruppe des oxidierten Phosphatidylcholin als bevorzugte Bindungsstelle, jedoch nicht im unoxidierten Zustand (Yeang et al., 2018). E06 mAb wird zur Diagnostik der Arteriosklerose eingesetzt und ist auch als potentielles Therapeutikum interessant (Binder et al., 2003). Die diagnostischen Möglichkeiten von E06 mAb sind Bestandteil aktueller Forschungen, so kann der Antikörper im Rahmen von Forschungsarbeiten zur Diagnostik von entzündlichen

Erkrankungen wie der bakteriellen Peritonitis (Matt et al., 2013), Multipler Sklerose (Haider et al., 2011), entzündlicher Nephritiden (Buga et al., 2008) und der altersbedingten Makuladegeneration (Handa et al., 2015) eingesetzt werden. Vor diesem Hintergrund konnten Oehler et al. zeigen, dass E06 mAb den durch OxPAPC bedingten Kalziumeinstrom über den TRPA1-Kanal *in vitro* durch E06 mAb vermindert und auch *in vivo* die OxPAPC-bedingte Hyperalgesie in Rattenpfoten abschwächt (Oehler et al., 2017).

1.1.6 Apolipoprotein ApoA-I D-4F

Apolipoproteine (ApoA) sind als Proteinanteile von Lipoproteinen essentielle Bestandteile der Fettstoffwechselung im Körper, sie werden insbesondere im Dünndarm und der Leber produziert. 1985 wurde bei Bewohnern des Ortes Limone sul Garda, Italien, eine Mutation des Apolipoprotein A-I nachgewiesen (Gualandri et al., 1985). Die Bewohner wiesen trotz niedriger HDL- und hoher LDL-Werte weniger kardiovaskuläre Ereignisse und weniger strukturelle Umbauten der Arterien auf als vergleichbare Gruppen. Als Grund hierfür wurde eine Mutation des Apolipoprotein A-I nachgewiesen (Subtyp: Milano), welche eine schnellere, katabole Stoffwechselung der aufgenommenen Fette ermöglicht (Gualandri et al., 1985; Klikovits et al., 2017). Der protektive Effekt der Mutation rückte die Apolipoproteine in den Fokus der kardiovaskulären Forschung.

ApoA-I ist ein Strukturprotein von **High Density Lipoprotein (HDL)**, das in der Lage ist im Rahmen der Arteriosklerose antiinflammatorisch zu wirken und das Fortschreiten zu verlangsamen (Taylor et al., 2004) oder teilweise eine Regression einzuleiten (Nicholls et al., 2007). Da ApoA-I ein sehr großes, teuer herzustellendes Protein ist, wurden verschiedene kleinere Proteine aus den Sequenzen von ApoA-I synthetisiert, die nach Möglichkeit die gleichen positiven Eigenschaften wie humanes ApoA-I aufweisen sollten (Anantharamaiah et al., 1985). Als erstes synthetisiertes Protein wurde 2F untersucht. 2F steht für 2 Phenylalaninreste an der hydrophoben Seite des Proteins; engl. Face). Das Peptid zeigte *in vivo* und *in vitro* Versuchen weder eine Aktivität in der Arterienwand noch eine präventive Wirkung auf Läsionen der Arterienwand (Navab et al., 2005). Im Verlauf der weiteren Forschung zeigte im Vergleich zu humanem ApoA-I besonders das aus D-Aminosäuren synthetisierte Protein D-4F (4 Phenylalaninreste an der hydrophoben Seite des Proteins) bereits in nanomolaren Konzentrationen eine sehr

hohe Bindungsaffinität zu OxPL (Van Lenten et al., 2008). Daraus resultierte eine effektive, protektive und regenerative Wirkung auf die Arterieninnenwand (Navab et al., 2005) Apo-mimetische Peptide binden nicht ausschließlich an OxPL, sondern auch an nichtoxidierte Lipide und Cholesterol, jedoch ist die Affinität für eine Bindung an OxPL sehr viel höher (Van Lenten et al., 2008)

ApoA-I-mimetische Peptide sind aufgrund ihrer *in vivo* beschriebenen antiinflammatorischen und antiarteriosklerotischen Wirkungen in der Arterioskleroseforschung gut untersucht (Getz and Reardon, 2014). Darüber hinaus gewinnen die ApoA-mimetischen Peptide auch in der Autoimmun-, Krebs-, und Endotoxämieforschung zunehmend an Bedeutung (Getz & Reardon, 2014).

Das in dieser Dissertation verwendete, synthetisierte D-4F zeichnet sich durch eine besonders gute Humanverträglichkeit aus (Bloedon et al., 2008). Aufgrund dieser Eigenschaften ließ sich D-4F im Rahmen der Arterioskleroseforschung auch in Phase-II Studien an Patienten untersuchen (Nissen et al., 2003; Tardif et al., 2007).

Ähnlich wie E06 mAb untersuchten Oehler et al. die Wirkung von Apolipoprotein A-I (ApoA-I) mimetischem Peptid D-4F auf den durch OxPAPC induzierten Kalziumeinstrom *in vitro* und die Hyperalgesie *in vivo*. Hierbei wurde gezeigt, dass sowohl der Kalziumeinstrom *in vitro* als auch die Hyperalgesie im Rattenmodell *in vivo* vermindert werden konnte (Oehler et al., 2017).

Aufgrund der guten Wirkung von D-4F *in vitro* und *in vivo* ist D-4F nicht nur eine vielversprechende Alternative in der Reduktion der chronischen, arteriosklerotischen Entzündung, sondern auch in der akuten, hyperalgetischen Entzündung mit einhergehender Schmerzreduktion.

1.2 Fragestellungen der Dissertation

E06 mAb und ApoA-I-mimetisches Peptid D-4F erscheinen als vielversprechende Alternativen in der Schmerzreduktion des akuten inflammatorischen Schmerzes (Oehler et al., 2017). Nichts desto trotz blieben sowohl in der Literatur als auch in den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe einige Fragen zum genaueren Verständnis der mechanistischen Wirkweise ungeklärt. Die folgenden Hypothesen sollen im Rahmen dieser Dissertation untersucht werden:

1. E06 mAb und D-4F blockieren nicht nur die Funktion TRPA1-aktivierender oxidierte Phospholipide wie OxPAPC, sondern auch deren Lipidoxidations-downstreamprodukte wie 4-HNE.
2. Die von Oehler et al. und Mohammadi et al. *in vivo* gezeigte Reduktion der entzündlichen Hyperalgesie durch D-4F und E06 mAb findet über eine Interaktion mit OxPL statt und nicht über eine direkte Interaktion mit TRPA1-aktivierenden ROS.
3. E06 mAb und D-4F haben keinen Einfluss auf die Capsaicin-evozierte Aktivierung von TRPV1.
4. Die TRPA1-Aktivierung durch H_2O_2 findet *in vitro* auch durch oxidierte Membranphospholipide statt.

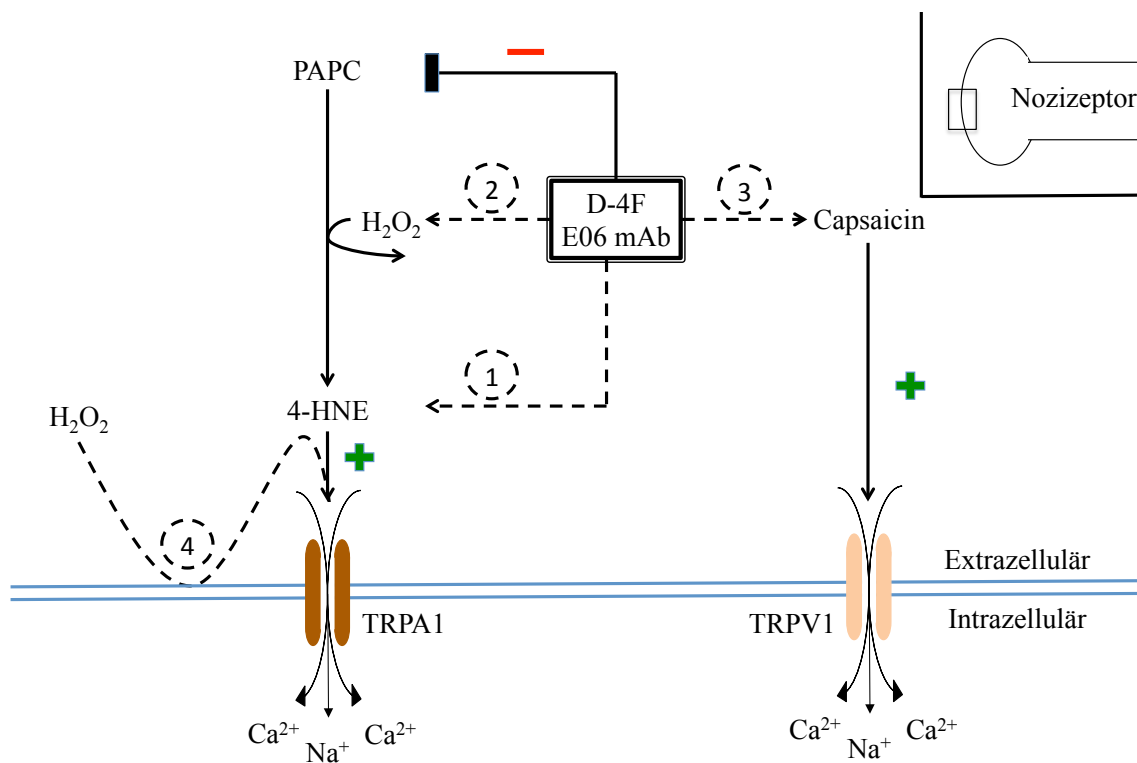


Abbildung 1: **Illustration der Hypothesen. Vergrößerung der Nozizeptoroberfläche mit Lipiddoppelschicht und TRPA1/TRPV1-Kanal.** Die zu erforschenden Reaktionswege sind gestrichelt dargestellt. Blockieren D-4F und E06 mAb *in vitro* den durch 4-HNE ausgelösten Kalziumeinstrom (Hypothese 1)? Findet eine spezifische Interaktion zwischen D-4F und E06 mAb mit H_2O_2 als ROS-Vertreter statt (Hypothese 2)? Interagieren D-4F und E06 mAb mit dem TRPV1-Aktivator Capsaicin (Hypothese 3). Werden *in vitro* TRPA1-Aktivatoren durch H_2O_2 bedingte Peroxidation der Membranlipide generiert (Hypothese 4)?

1. Da OxPAPC aus mehreren OxPL und deren Oxidationsprodukten besteht, ist in den Versuchen von Oehler et al. unklar geblieben, gegen welches OxPL oder Oxidationsprodukt sich E06 mAb und D-4F richten. Deshalb wurde in dieser Dissertation die Wirkung von E06 mAb und D-4F auf 4-HNE untersucht, welches als Downstreamprodukt der ROS bedingten Lipidoxidation in der akuten inflammatorischen Reaktion vorkommt und als TRPA1-Aktivator bekannt ist (Trevisani et al., 2007).

2. Bei Oehler et al. blieb die Frage unbeantwortet, ob die Reduktion der Hyperalgesie im Tierversuch ausschließlich über eine Interaktion von E06 mAb und D-4F mit OxPAPC stattfindet. Da in entzündlich verändertem Gewebe stets ROS zu finden sind, könnte die Reduktion der Hyperalgesie auch auf eine zusätzliche Interaktion der Substanzen mit den ROS zurückzuführen sein, worauf hin die Möglichkeit bestünde, dass sowohl weniger TRPA1-aktivierenden ROS, als auch weniger Oxidationsprodukte im Gewebe vorhanden sind.

3. Um die Ergebnisse von den mit TRPA1-transfizierten HEK-293-Modellzellen auf die nativ TRPA1, TRPV1 und weitere Kanäle exprimierenden spinalen Hinterwurzelganglienzellen übertragen zu können, sollte eine Interaktion von E06 mAb und D-4F mit den TRPV1-Agonisten Capsaicin ausgeschlossen werden.

4. H₂O₂ oxidiert möglicherweise die Membranlipide der verwendeten Modellzellen und generiert dadurch reaktive OxPL. Diese OxPL können den TRPA1-Kanal aktivieren und einen Kalziumeinstrom bedingen. Um die Wirkweise von H₂O₂ auf den TRPA1-Kanal *in vitro* besser nachvollziehen zu können, gilt es diesen möglichen Reaktionsweg zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Langzeitlagerung und Auftauvorgang von untransfizierten und stabil mit TRPA1-transfizierten HEK-293-Zellen

Die untransfizierten HEK-Zelllinien von Prof. M. Korte (Institut für Zoologie, Abteilung für Zelluläre Neurobiologie, Braunschweig, Deutschland) und die eigens stabil mit TRPA1-transfizierten HEK-293-Zellen wurden in der flüssigen Phase eines Flüssigstickstofftanks in Kryoröhrchen bei -155° C gelagert. Bei Bedarf wurden die

konservierten Zellen bei 37° C aufgetaut. Die aufgetaute Zellsuspension aus Zellen und Dimethylsulfoxid (DMSO, zum Zellschutz beim Einfriervorgang) wurde unter der Sterilbank in ein 15 ml Falcon überführt und mit 5 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) versetzt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 700 rpm für 4 min. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellsediment erneut mit 5 ml DMEM (+1 % Penicillin/Streptomycin, + 10 % Fetal Bovine Serum) resuspendiert. Dieser Waschvorgang erfolgte insgesamt zwei Mal. Im letzten Schritt wurden die gewaschenen Zellen mit frischen 5 ml DMEM (+1 % P/S, + 10 % FBS) resuspendiert und in eine mit 10 ml DMEM (+1 % P/S, + 10 % FBS) gefüllte Zellkulturflasche überführt (Tissue culture flask, 75 cm² Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland). Die Zellen wurden 2 Wochen in den genannten Zellkulturflaschen kultiviert, bevor sie für Messungen verwendet wurden. In der zweiten Woche, nach fünf Passagen, wurde für die TRPA1-transfizierten Zellen das Selektionsantibiotikum Hygromycin B (100 µg/ml) hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Zellkultivierung wie unter 2.1.2 beschrieben.

2.1.2 Kultivierung stabil mit TRPA1/V1-transfizierten und untransfizierten HEK-293-Zellen

HEK-293 und stabil mit TRPA1-transfizierte HEK-293 Zellen wurden für die Dauer der Experimente in Zellkulturflaschen kultiviert. Als Nährmedium diente für beide Zelllinien DMEM, das mit 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) und 10 % Fetal Bovine Serum (FBS) versetzt war. Als Selektionsantibiotikum erhielten die stabil mit TRPA1-transfizierten Zellen zusätzlich 100 µg/ml Hygromycin B. Ab einer Konfluenz von $\geq 80\%$ wurden die Zellen unter der Sterilbank gesplittet und in eine neue Zellkulturflasche überführt.

Dazu wurde zunächst wurde das Nährmedium abgesaugt und der Flaschenboden mit 5 ml Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) gewaschen, um das in dem Nährmedium vorhandene Ca²⁺, welches als Trypsin-Neutralisator dient, zu entfernen. Um die Zellen von der Zellkulturflasche abzulösen, wurde der Flaschenboden anschließend mit 500 µL Trypsin 0,05 % benetzt. Unter Durchlichtmikroskopkontrolle wurde sichergestellt, dass die Zellen sich vom Boden lösen und separieren. Sobald die Zellen abgelöst und separiert waren, konnte der Trypsinierungsprozess durch die

Zugabe von 4,5 ml DMEM (+1 % P/S, + 10 % FBS) abgestoppt werden. Für das Umsetzen der Zellen in die neue, mit 4 ml DMEM (+1 % P/S, + 10 % FBS) gefüllte Zellkulturflasche bedurfte es einer Verdünnung, um den Zellen erneut Platz zum Wachsen bieten zu können. Für eine Wachstumsdauer von 2 Tagen hat sich eine Verdünnung von 1 ml Zellsuspension auf 4 ml DMEM (+1 % P/S, + 10 % FBS) bewährt (Abweichungen im Verdünnungsgrad je nach Bedarf). Nach der Überführung in die neue Zellkulturflasche wurden die Zellen wieder in den Brutschrank verbracht, um bei 37° C, 5 % CO₂ und gesättigter Atmosphäre erneut wachsen zu können.

2.2 Zellkultur von Spinalganglien

2.2.1 Spinalgangliengewinnung

Die für die DRG-Entnahme verwendeten adulten (8-10Wochen) C57BL/6 Mäuse wurden von der Tierhaltung des Institutes für klinische Neurobiologie, Universitätsklinikum Würzburg, zur Verfügung gestellt. Es wurden beide Geschlechter, mit ca. 20-25 g verwendet. 6 Geschwister wurden in einem Käfig gehalten, der Tag/Nacht-Rhythmus betrug je 12 Stunden. Die Euthanasie zur Zellentnahme wurde mit CO₂ vollzogen. Die verwendeten Tiere wurden entsprechend der EU Richtlinie für Tierversuche (2010/63/EU) behandelt. Die Tierversuche wurden von der Regierung von Unterfranken genehmigt (Protokoll Nr. 2-339 und 61/11).

Nach erfolgter Euthanasie, wurde das Fell großzügig mit Desinfektionsmittel befeuchtet. Die Präparation erfolgte von dorsal, beginnend mit einem transversalen Hautschnitt von circa 2 cm Länge auf Höhe der Crista iliaca. Anschließend wurde die Haut von der Fascia thoracolumbalis durch cranial gerichteten Zug getrennt. Die durch Fascia thoracolumbalis und Muskulatur bedeckte Wirbelsäule wurde anschließend durch einen subcapitalen und einen lumbalen Schnitt auf Höhe der Crista iliaca durchtrennt. Nach erfolgreichem Durchschneiden der Rippen war die Wirbelsäule vollständig vom restlichen Tier separiert. Die anschließende Entfernung der Rückenmuskulatur ermöglichte einen freien Blick auf die Wirbelsäule. Der Spinalkanal wurde mittels zweier, kaudal gerichteter Schnitte zwischen Wirbelkörper und Procc. transversi eröffnet. Nach Mobilisierung durch leichten Zug am Ligamentum denticulatum ließen sich die Spinalganglien in den Foramina intervertebralia darstellen. Mit zwei Feinpinzetten erfolgte die jeweilige Durchtrennung des N. spinalis und der Radix anterior et posterior. Jedes herausgelösten Ganglion spinale wurde in eine mit DMEM/F-12 (Zusammensetzung: DMEM mit Glutamax, F-12, Phenol Rot, HEPES 15 mM, Glucose 0.03 %, FBS 20 %, und NaOH bis pH-neutral) + Gentamycin (50 µg/ml) gefüllte Petrischale überführt.

2.2.2 Kultivierung der Spinalganglienzellen

Nach Herauslösung aller darstellbaren Ganglia erfolgte in der Petrischale eine ganglionnahe Entfernung der Bindegewebs- und N. spinalis-Reste. Anschließend kamen

die Ganglia in ein mit DMEM/F-12 (Zusammensetzung: 75 ml DMEM mit Glutamax, F-12, Phenol Rot, 2 ml HEPES 750 mM, 3 ml Glucose 10 %, 20 ml FBS, und NaOH bis pH-neutral) + Gentamycin (50 mg/ml) gefülltes 15 ml Falcon. Die gesammelten Ganglia wurden 3 min bei 600 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Nun erfolgte die Zugabe von 2 ml Kollagenase (1 mg/ml) und Protease (0,5 mg/ml) in DMEM. Daran schloss sich, unter gelegentlichen Schwenken, eine 30 min Inkubation im 37° C warmen Wasserbad an. Nach Verdauung der Wurzel tasche und des restlichen Bindegewebes wurden die Zellen erneut zentrifugiert und die 2 ml Kollagenase und Protease abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 4 ml DMEM versetzt und 3 min bei 600 rpm zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde zwei Mal wiederholt. Nach dem letzten Waschvorgang erfolgte eine Trituierung mit Hilfe einer durch Hitze abgerundeten Glaspipette. Daran anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation (5 min, 1000 rpm). Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 1 ml DMEM/F-12 + 10 µl ITS (1 mg/ml bovines Insulin, 0.55 mg/ml Transferrin, 0,5 µg/ml Selenit) + 1 µl NGF (100 ng/ml) resuspendiert. Nun wurde jeweils ein 50 µl Tropfen auf ein mit Poly-D-Lysin (0,1 mg/ml, 30 min im Brutschrank bei 37° C beschichtet, anschließend mit DPBS und destillierten Wasser gespült) beschichtetes Plättchen gegeben. Nach Durchlichtmikroskopkontrolle wurden die Kulturschälchen mit den Plättchen für ca. 30 min in den Brutschrank (37° C, 5 % CO₂) verbracht. Nach erfolgter Adhäsion der Spinalganglienzellen wurden die Zellkulturschälchen vorsichtig mit 2 ml DMEM/F-12 + 20 µl ITS (1 mg/ml bovines Insulin, 0.55 mg/ml Transferrin, 0,5 µg/ml Selenit) + 2 µl NGF (100 ng/ml) geflutet und über Nacht im Brutschrank belassen. Die Messungen erfolgten am darauf folgenden Tag.

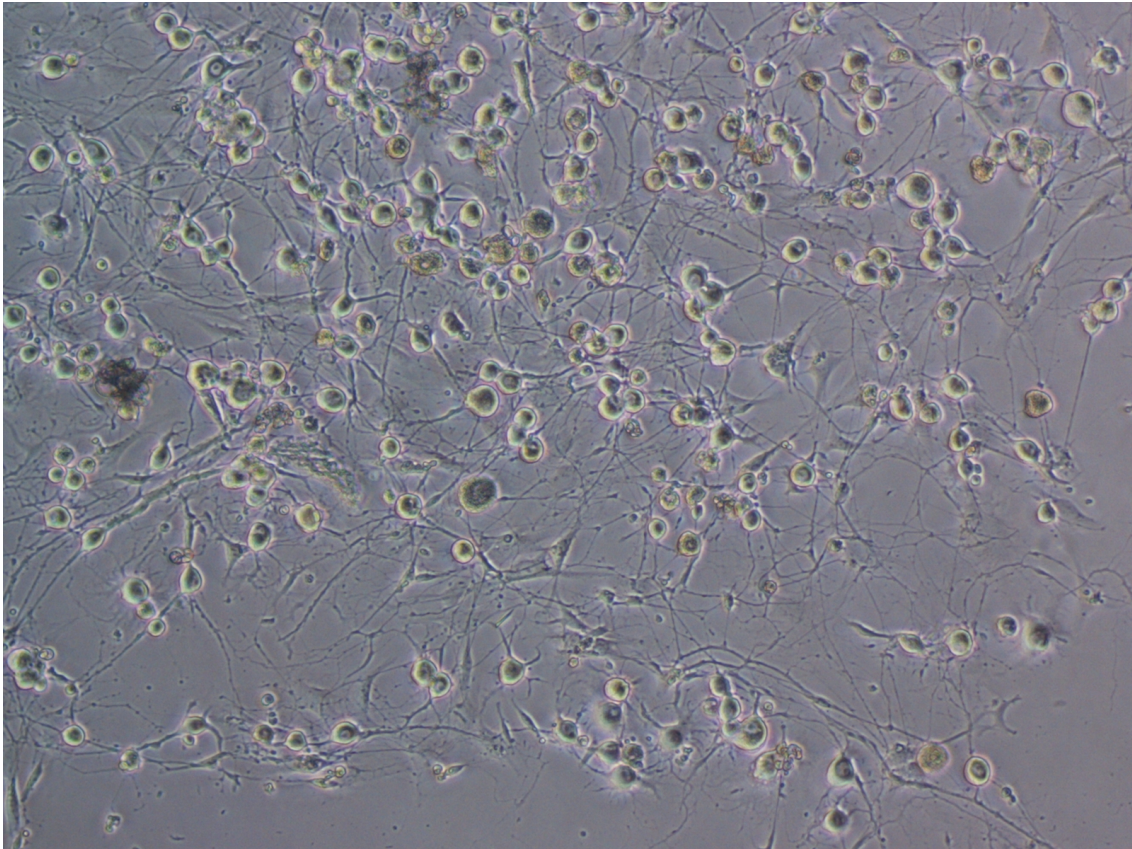


Abbildung 2: Exemplarisch dargestellte DRGs nach Anzuchtung auf Coverslip in Nährmedium.

2.3 Intrazelluläre Kalzium-Messungen

2.3.1 Grundlagen

Grundlegend gibt es zwei Möglichkeiten, das intrazelluläre Kalzium optisch darzustellen:

1. Die für diese Experimente nicht praktikable Möglichkeit der genetisch kodierten Kalziumsensoren, die in der Zelle vorhandenes Kalzium binden und dadurch Licht aussendet. Als Beispiel für diesen Typ sei das Protein Aequorin einiger Quallenarten aufgeführt.

2. Chemische kalziumsensitive Farbstoffe die auf bzw. in die Zelle appliziert werden.

Hierbei kann weiter in Einzellwellenlängen-kalziumsensitive Farbstoffe und ratiometrische-kalziumsensitive Farbstoffe unterteilt werden. Der hier verwendete ratiometrische-kalziumsensitive Farbstoff zeichnet sich nicht durch eine Veränderung der Fluoreszenzintensität, sondern durch eine Verschiebung der Anregungs- und

Floureszenzwellenlänge in Abhängigkeit der Konzentration des intrazellulären Kalziums aus (Paredes et al., 2008).

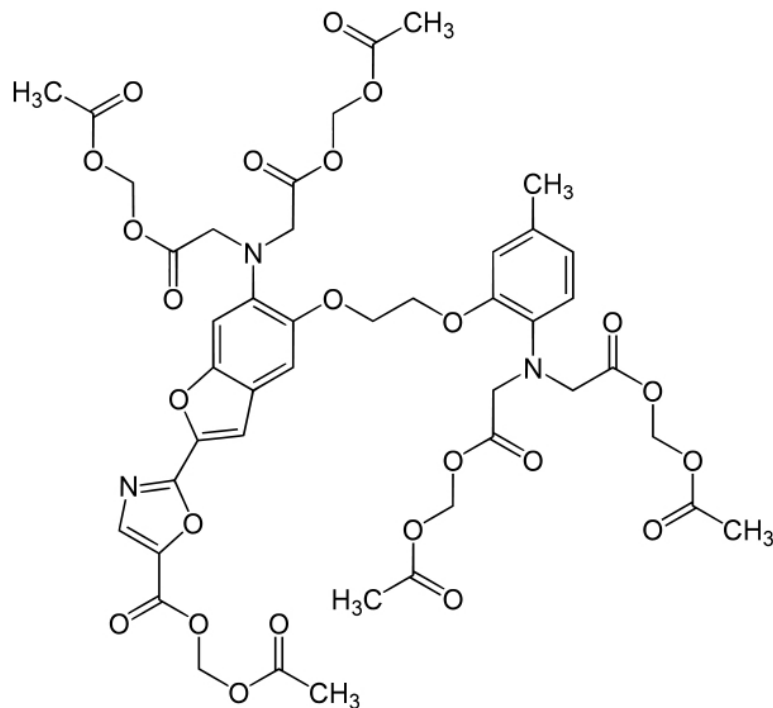


Abbildung 3: Ratiometrisch-kalziumsensitiver Farbstoff FURA-2/AM (aus: The Molecular Probes Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologie, 11. Ed, Life Technologies, 2010)

Da es bei den durchgeführten Experimenten um das Darstellen von schnellen Änderungen der Kalziumkonzentration ging, wurde ein ratiometrisch-kalziumsensitiver Farbstoff der „neuen Generation“ verwendet: Fura-2/AM.

Ältere kalziumsensitive Farbstoffe wie z.B. quin2 besitzt eine 4-fach höhere Affinität zu Mg^{2+} , 12-fach erhöhte Affinität zu Mn^{2+} und eine 40-fach erhöhte Affinität zu Fe^{2+} im Vergleich zu Fura-2. Durch diese Entwicklung konnte die Selektivität der Fura-2 Bindung an Ca^{2+} gegenüber anderen Kationen gesteigert werden (Grynkiewicz et al., 1985). Um eine bessere Membranpermeabilität zu gewährleisten, wird heute üblicherweise Fura-2 als Fura-2-Acetoxymethyl-(AM)-Ester verwendet. Der Acetoxymethyl-Rest verleiht dem Farbstoff eine apolare, lipophile Struktur. Hierdurch kann das Fura-2 leichter die Zellmembran überwinden. In den Zellen wird der Acetoxymethyl-Rest von zelleigenen Esterasen vom Molekülkomplex abgespalten. Auf diese Weise kann der eigentliche Farbstoff die Zelle nicht mehr verlassen und reichert sich intrazellulär an. Fura-2 wirkt als Chelator und bildet einen Komplex mit dem

intrazellulären Ca^{2+} . In Abhängigkeit des intrazellulären Zustandes reflektiert das Molekül das Licht nach Exzitation mit einer Wellenlänge von 340 nm (Fura-2- Ca^{2+} Komplex) oder 380 nm (keine Bindung von Ca^{2+} an Fura-2). Das Emissionsmaximum bei 510 nm bleibt davon unbeeinflusst. Strömt Ca^{2+} in die Zelle ein, so nimmt die Emissionsintensität bei der Anregung mit Licht der Wellenlänge von 380 nm ab. Parallel dazu steigt, aufgrund der steigenden Anzahl von Fura-2- Ca^{2+} -Komplexen, die Emissionsintensität bei einer Anregung mit Licht der Wellenlänge von 340 nm. Durch Bildung des Quotienten (340/380) lässt sich die Verschiebung der Exzitationswellenlänge und somit der Kalziumeinstrom semi-quantitativ darstellen (Grynkiewicz et al., 1985). Aufgrund dieser Eigenschaften eignet sich die Methode sehr gut zur Untersuchung einer TRPA1-bedingten, intrazellulären Kalziumänderung.

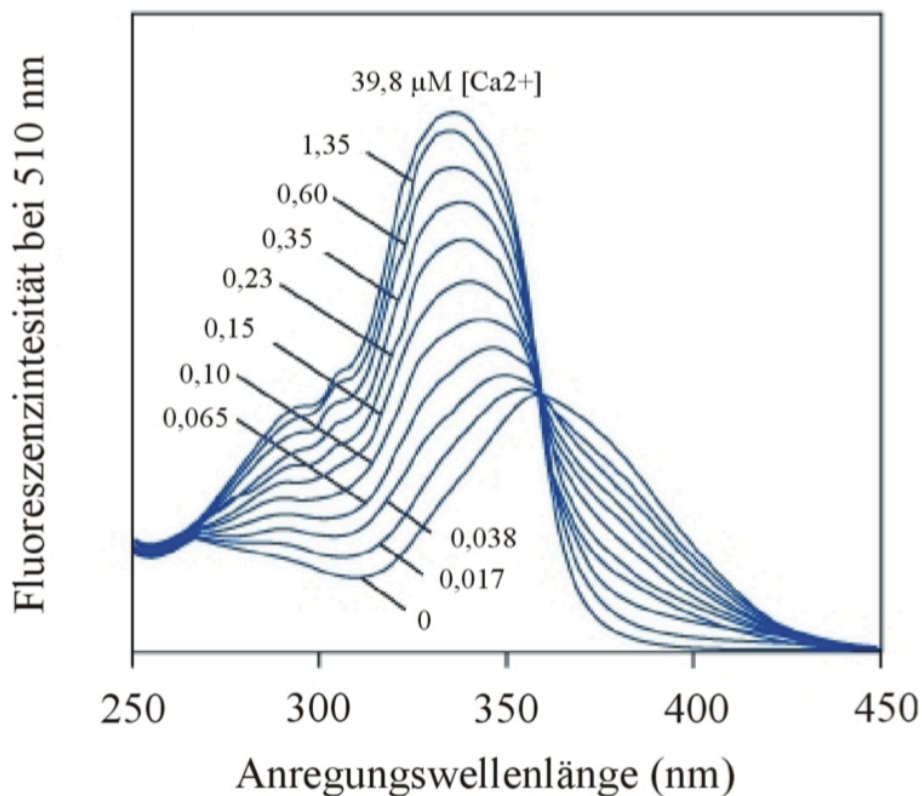


Abbildung 4: Abhängigkeit der Fluoreszenz von Fura-2 von der Anregungswellenlänge. Die Zahlen zu den Kurven geben die jeweilige freie Kalziumkonzentration an (aus: The Molecular Probes Handbook—A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologie, 11. Ed, Life Technologies, 2010)

2.3.2 Technischer Aufbau

Sämtliche Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Als Mikroskop diente das Nikon TE2000-E, ausgestattet mit einem CFI S-Fluor 10x/0,5 Objektiv (Nikon, Düsseldorf, Deutschland). Als Lichtquelle diente ein Lambda DG4/17 wavelength switch (Sutter Instruments, Novato, CA, USA), welcher die zu untersuchenden, mit Fura-2/AM beladenen Zellen jeweils mit Licht der Wellenlänge von 340 nm bzw. 380 nm alle 2 s für 40 ms bis 80 ms anregte. Das emittierte Licht wurde nach Passieren eines 510 nm Bandbreitenfilters von einer gekühlten Andor iXon Kamera (Andor Technology Ltd. Belfast, Vereinigtes Königreich) detektiert. Am angeschlossenen Computer erfolgte mit Hilfe der Kontrollsoftware für das Mikroskop (NIS Elements Software) eine bildliche Darstellung des von den Zellen emittierten Lichtes.

2.4 Vorbereitung, Messung, Auswertung und Statistik

2.4.1 Überführung und Zelladhäsion auf den Messplättchen

Die Vorbereitung der Zellen für die Messung begann mit einem 4-well Schälchen, welches mit Poly-L-Lysin beschichteten Messplättchen versehen wurde. Das 4-well Schälchen wurde vorsichtig mit 2 ml DMEM (+1 % P/S, + 10 % FBS) geflutet. Die DRG-Zellen wurden, wie unter Punkt 2.2.2 beschrieben, kultiviert und auf die Messplättchen aufgebracht. Die mit TRPA1-transfizierten und die untransfizierten HEK-Zellen wurden nach erfolgter, unter Punkt 2.1.2 beschriebenen Ablösung auf die Messplättchen ausgesetzt. Hierzu wurden 180 µl, entspricht ca. 2×10^5 Zellen, der in der Zellkulturflasche verbliebenen Zellsuspension vorsichtig in das 4-well Schälchen pipettiert. Anschließend wurde das Schälchen wieder in den Inkubator verbracht. Die Messungen konnten nach erfolgter Adhäsion der Zellen stattfinden (frühestens 4 h nach Aufbringung, bis zu 24 h nach Aussetzen).

2.4.2 Beladung der Zellen mit Fura-2/AM

Bevor die Messungen erfolgen konnten, wurden die Zellen mit dem Farbstoff Fura-2/AM beladen. Zu diesem Zweck wurden 6 µM Fura-2/AM (2 mM Fura-2 in DMSO + 20 % Pluronic) in 997 µl Messpuffer + 0.2 % BSA gelöst und auf einer 4-well Platte in zwei Vertiefungen zu je 500 µl aufgeteilt. Daraufhin wurde das 4-well Schälchen mit

den adhären Zellen aus dem Inkubator unter die Sterilbank verbracht. Nun erfolgte unter sterilen Bedingungen ein Transfer von zwei Messplättchen mit adhären Zellen in die mit Fura-2/AM und Messpuffer gefüllten Vertiefungen. Während der 30-minütigen Inkubationszeit wurde die 4-well Platte in den Inkubator gelagert.

2.4.3 Vorbereitung des Messvorganges

Die mit Fura-2 beladenen Zellen auf dem Messplättchen wurden nach der 30-minütigen Inkubationszeit aus dem mit Messpuffer und Fura-2/AM gefüllten Vertiefung genommen und in eine mit reinen, isotonen Messpuffer gefüllte Vertiefung gelegt.

Parallel dazu erfolgte eine gründliche Reinigung der Messkammer mit Seife. Nach dem Abspülen mit destilliertem Wasser wurde die Messkammer auf ein Papiertuch gelegt, um überschüssiges destilliertes Wasser aufzusaugen. Nun wurde das Plättchen in die Messkammer eingespannt und mit 450 µl Messpuffer geflutet. Die so vorbereitete Messkammer konnte in das Mikroskop gelegt werden.

Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten unter größtmöglichem Schutz der Zellen vor Licht, um ein Ausbleichen des Farbstoffes zu verhindern.

2.4.4 Messung

Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur (19–21° C) und unter größtmöglicher Lichtabschirmung. Die in das Mikroskop eingelegte Messkammer wurde mit Durchlicht beleuchtet, um einen Ausschnitt auf dem Messplättchen mit circa 120 bis 145 gut separierten Zellen zu finden. Anschließend erfolgt eine Prüfung der Belichtungszeit und der gleichmäßigen Beladung der Zellen durch eine Beleuchtung mit Licht der Wellenlänge von 380 nm. Der Coverslip mit den Zellen wurde nun alle 2 s, abwechselnd mit Licht der Wellenlänge von 380 nm und 340 nm, belichtet. Nach 120 s erfolgte die Zugabe der Agenzien und bei 600 s endete die Messung.

Das Messprotokoll unterschied sich in Abhängigkeit der verwendeten Zellen.

TRPA1-transfizierte HEK-293-Zellen:

#120 s	Zugabe Agens
#600 s	Stopp der Messung

DRG-Zellen

#120 s	Zugabe Agens
#540 s	AITC 10 μ M
#720 s	Capsaicin 1 μ M
#900 s	KCl 50 mM
#1080 s	Stopp der Messung

2.4.5 Auswertung

Die beiden Filme mit den unterschiedlichen Anregungswellenlängen wurden mit Hilfe von ImageJ und des Plugins Time Series Analyzer (Balaji J, Dept. of Neurobiology, UCLA) ausgewertet. Hierzu wurden die 120 bis 145 gut separierten Zellen mit je einem ROI (Region of Interest) versehen. Im zeitlichen Verlauf der Messung quantifiziert das Programm die Intensität des emittierten Lichtes der mit Fura-2 beladenen Zellen zu jedem Messzeitpunkt. Hierbei macht man sich die Änderung der Intensität in Abhängigkeit des intrazellulären Ca^{2+} -Gehaltes zu Nutze (siehe 2.3.1). Mittels Microsoft Excel wurde nun zu jedem Messzeitpunkt der Quotient der einzelnen ROIs des 340 nm und 380 nm Films gebildet. Hieraus ergab sich für jedes ROI (und somit Zelle) eine Beschreibung des quantitativen Ca^{2+} -Einstromes über die Messdauer.

2.4.6 Statistik

Der statistischen Auswertung liegen die Exceltabellen (siehe 2.4.5) zugrunde. Die Auswertung stützt sich auf zwei Säulen: die Anzahl der reagierenden Zellen in Prozent und die Änderung der Fläche unter der Kurve (Area under curve, AUC) des Mittelwertes aller Zellen.

Eine Zelle wurde als positiv betrachtet, wenn sich die Ca^{2+} Konzentration der Zelle im Bezug zum Basalwert um mehr als das 1,5-fache gesteigert hat. Auf diese Weise kann erfasst werden, wie viele Zellen prozentual auf die Zugabe eines Agens reagieren.

Um den quantitativen Ca^{2+} -Einstrom zu beschreiben wurde zusätzlich die Fläche unter der Kurve (AUC) des Mittelwertes aller Zellen bestimmt. Hieraus lassen sich Rückschlüsse über den Ca^{2+} -Einstrom aller Zellen ziehen.

Mit Hilfe von OriginPro 9.2 (2015) erfolgten auch die statistischen Signifikanztests. Die Testung auf Signifikanz erfolgte bei den D-4F Messungen, sowohl für die Anzahl der

reagierenden Zellen als auch für die Fläche unter der Kurve, mittels Students t-test. Da bei den E06 Messungen mehr als zwei Stichproben miteinander verglichen wurden, wurde bei der Auswertung eine Einfaktorielle-ANOVA, post hoc Holm-Sidak durchgeführt (siehe Legenden der Abbildungen).

2.5 Lipidextraktion als Vorbereitung für die MALDI-TOF Analyse

2.5.1 MALDI-TOF Analyse

Alle MALDI-TOF Experimente wurden von Herrn Priv.-Doz. J. Schiller (Universität Leipzig, Deutschland) durchgeführt. Mit der MALDI-TOF Analyse lassen sich Massen von chemischen Verbindungen bestimmen. Die Methode ist zusammengesetzt aus einer Matrix-assistierten Laser Desorption/Ionisation (Veitenhansl et al.) und einer Massenspektrometrie mit Flugzeitanalyse (time of flight, TOF).

Die zu messenden Substanzen oder Moleküle werden in die Probenmatrix eingebracht und in dem Vakuum der Messkammer fixiert. Bei der nun folgenden Anregung mit hochenergetischen Laserimpulsen mit der für die Matrix spezifischen Anregungswellenlänge werden die zu analysierenden Moleküle und die MALDI-Matrix ionisiert und erhitzt, was zu einem partiellen abplatzen von der restlichen Matrix führt. Die Matrixreste, welche die Testmoleküle umgeben, verdampfen vollständig und man erhält die reinen, ionisierten und zur Analyse bestimmten Moleküle. Diese Moleküle werden mittels elektromagnetischem Feld beschleunigt. Nach Passieren des Gitters bewegen sich die Moleküle in Abhängigkeit ihrer Masse und Ladung mit einer bestimmten Geschwindigkeit auf den Ionendetektor zu (siehe **Abbildung 5**). Die Zeit bis zum Auftreffen auf den Ionendetektor wird gemessen. In Abhängigkeit der Flugzeit und damit Geschwindigkeit können die Moleküle entsprechend ihrem Masse zu Ladungsverhältnisses aufgetragen werden. Als physikalische Grundlage der Experimente dient die Gleichsetzung der durch Spannung in einem Feld herrschende Energie und die Formel für die kinetische Energie:

$$E_{\text{Spannung}} = U * e$$

$$E_{\text{kin}} = \frac{1}{2} m * v^2$$

$$U * e = \frac{1}{2} m * v^2$$

Mit dieser Methode wollten wir die Frage beantworten, ob es zu einer Interaktion zwischen den H_2O_2 Molekülen und den Zellmembranen der HEK-293-Zellen kommt. Auch das Entstehen von oxidierten Lipiden und deren Downstreamprodukte, welche mit den TRPA1-Kanälen interagieren können, war für uns von großem Interesse.

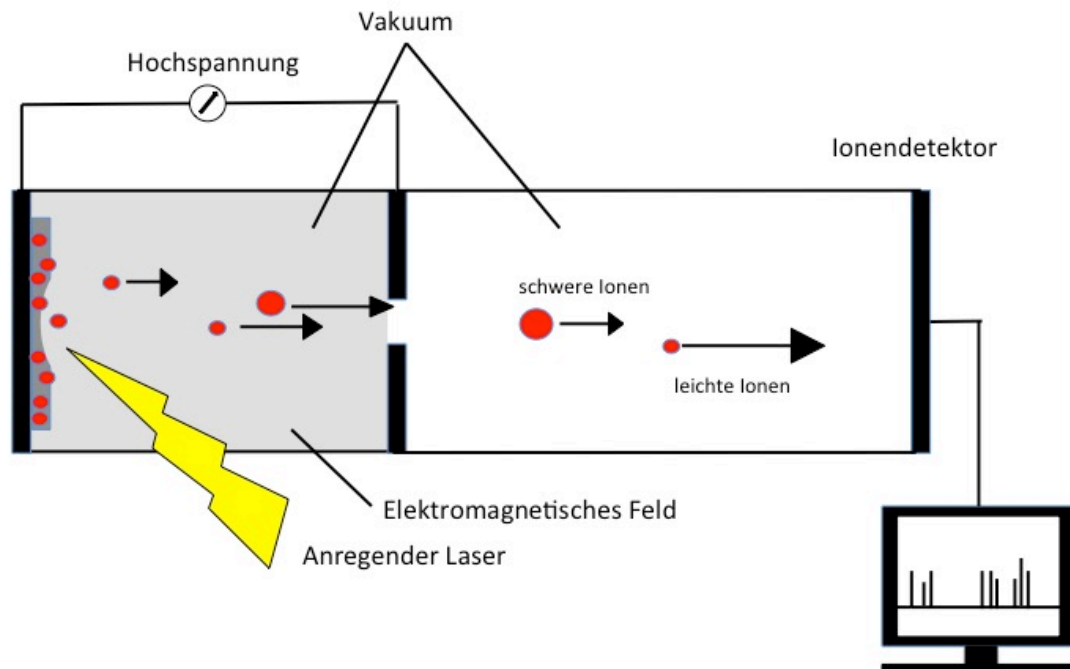


Abbildung 5: Stark vereinfachter Versuchsaufbau der MALDI-TOF Analyse. Der Laser regt mit der matrixspezifischen Wellenlänge die Matrix und die in ihr enthaltenen, zu untersuchende Moleküle an. Das bewirkt eine Erhitzung und Freisetzung der Moleküle. Diese werden im elektromagnetischen Feld auf eine ihrem Gewicht entsprechende Geschwindigkeit beschleunigt. Die Zeit bis zum Auftreffen auf den Ionendetektor wird erfasst und die daraus errechneten Molekulargewichte aufgetragen.

2.5.2 Vorbereitung der Kontrollmessungen für die MALDI-TOF Analyse

Die HEK-293 Zellen wurden in einer Zellkulturflasche mit 500 μl Trypsin abgelöst und die Trypsinierung mit 4,5 ml DMEM abgestoppt und die Zellsuspension mit 2400 Zellen/ μl in ein Falcon überführt. Anschließend erfolgte für 5 min eine Zentrifugation bei 600 rpm. Der Überstand an DMEM + Trypsin wurde abgenommen und die Zellen in DPBS resuspendiert. Die so entstandene Zellsuspension wurde zu je 200 μl auf die Glasprobenfläschchen verteilt. Da mit dem DPBS die wässrige Phase bereits in dem

Fläschchen ist, erfolgte die Zugabe von 400 µl Chloroform und 200 µl Methanol. Nach der Zugabe wurden die Flüssigkeiten mit der Zellsuspension mittels Ultraschallprozessor homogenisiert. Nach diesem Schritt wurde die Probe auf Eis gelagert. Als nächster Schritt erfolgte eine Zentrifugation der Proben für 10 min bei 1000 rpm. Die apolaren Lipide lösten sich in der apolaren, organischen Chloroformphase, während sich polare Moleküle in der wässrigen Phase sammelten. Die Chloroformphase und die darin enthaltenen Lipide sammelten sich aufgrund der höheren Dichte von Chloroform im Vergleich zu Wasser am Boden und wurden abgenommen. Das Chloroform der jeweiligen Proben mit den darin enthaltenen Lipiden wurde in je einer neuen Glasflasche mit Stickstoff begast, bis sich das Chloroform verflüchtigt hatte.

Die nun in den Glasflaschen enthaltenen Lipide wurden zur MALDI-TOF Analyse nach Leipzig an Priv.-Doz. Schiller zur weiteren Analyse geschickt.

2.5.3 Vorbereitung der Proben mit H₂O₂ für die MALDI-TOF Analyse

Der grundlegende Ablauf ist bereits unter 2.5.2 beschreiben. Nach Überführung der 200 µl Zellsuspension in die Glasfläschchen wurde die Probe mit 10 µM H₂O₂ versetzt. Nun erfolgte eine Inkubationszeit von 3 bzw. 15 min, bevor wieder 400 µl Chloroform und 200 µl Methanol hinzugegeben wurde. Nach der Homogenisierung wurden die Proben wieder zentrifugiert und anschließend die Chloroformphase mit den darin enthaltenen Lipiden abgenommen (siehe oben).

2.6 Auflistung Materialien, Chemikalien, Puffer, Lösungen

2.6.1 Zellkultur

Tabelle 1: Materialien Zellkultur

Verwendete Materialien

Tissue culture flask, 25 cm ³	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
--	---

Verwendete Chemikalien, Puffer, Lösungen

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Deutschland
Fetal Bovine Serum, qualified, E.U.-approved	Lifetechnologies, Grand Island, N.Y., USA
Hygromycin B from Streptomyces hygroscopicus	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Deutschland
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	Lifetechnologies, Grand Island, N.Y., USA
Trypsin-EDTA (0.25 %), phenol red	Lifetechnologies, Grand Island, N.Y., USA

Verwendete Zelllinien

TRPA1 stabil transfizierte HEK-293 Zelllinie	Dr. B. Oehler, Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Würzburg, Deutschland
HEK-293 Zelllinie	Prof. M. Korte, Institut für Zoologie Abteilung für Zelluläre Neurobiologie, Universität Braunschweig, Deutschland
TRPV1 stabil transfizierte HEK-293 Zelllinie	Prof. M. Schäfer, Rudolf-Boehm-Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Leipzig, Deutschland
Spinale Hinterwurzelganglien (DRGs) Präparat von C57BL/6 Mäusen	Tierhaltung, Institut für klinische Neurobiologie, Universität Würzburg, Deutschland

2.6.2 Spinalganglienpräparation und Kultivierung

Tabelle 2: Materialien Spinalganglienpräparation und -kultivierung

Verwendete Chemikalien, Puffer, Lösungen

Collagenase from <i>Clostridium histolyticum</i>	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Deutschland
D-(+)-Glucose solution	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Deutschland
Gentamicin solution	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Deutschland
Ham's F12 Nutrient Mixture + L-Glutamine	Lifetechnologies, Grand Island, N.Y., USA
Hanks' Balanced Salt solution	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Deutschland
ITS Liquid Media Supplement (100×)	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Deutschland
Nerve Growth Factor-7S from murine submaxillary gland	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Deutschland
Protease from <i>Streptomyces griseus</i>	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Deutschland
Sodium hydroxide	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Deutschland

Verwendete Tiere

Genehmigung durch die Regierung von Unterfranken	Protokoll Nr. 2-339 und 61/11
C57BL/6	Tierhaltung, Institut für klinische Neurobiologie, Würzburg, Deutschland
C57BL/6 NaV1.9 Knockout	Tierhaltung, Institut für klinische Neurobiologie, Würzburg, Deutschland

2.6.3 Intrazelluläre Kalziummessung

Tabelle 3: Materialien Kalzium Imaging

Verwendete Materialien

4-well cellstar cell culture dishes	Greinerbio one GmbH, Frickenhausen Deutschland
Glass Coverslips, 10 mm	A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland

Verwendete Chemikalien, Puffer, Lösungen

Bovines Serum Albumin	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Deutschland
CaCl ₂	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Deutschland
D(+)-Glucose monohydrate	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol absolute	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Deutschland
Fetal Bovine Serum, qualified, E.U.- approved	Lifetechnologies, Grand Island, N.Y., USA
Fura-2/AM	Lifetechnologies, Eugene, OR., USA
HEPES Pufferan [®] ≥99,5 %, cellpure [®]	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Deutschland
Magnesium chloride hexahydrate (MgCl ₂)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaCl	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, D.
Pluronic [®] F-127	Lifetechnologies, Eugene, OR., USA
Poly-D-lysine hydrobromide	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Deutschland
Potassium chloride (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Verwendete Messsubstanzen

Hydrogen peroxide solution ≥30%, TraceSELECT®	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Deutschland
E06 Mouse Monoclonal Antibody (IgM) Anti-(Oxidized Phospholipid)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA
Mouse IgM Isotype Control (TEPC 183)	Ancell, Bayport, MN., USA
Oxidized PAPC	Hycult Biotech, Uden, Niederlanden
HC-030031	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Deutschland
Capsaicin ≥95 %, from <i>Capsicum</i> sp.	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Deutschland
Allyl isothiocyanate	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Deutschland
Carvacrol	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Deutschland
Apo-AI-mimetisches Peptid D-4F	Peptide Specialty Laboratories GmbH, Heidelberg, Deutschland
L-α-Lysophosphatidylcholine (LPC)	Sigma-Aldrich Co. LLC., Steinheim, Deutschland
(E)-4-Hydroxynonenal	Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY, USA

2.6.4 Sonstige verwendete Messgeräte, Materialien und Software

Tabelle 4: Sonstige verwendete Messgeräte, Materialien und Software

Verwendete Geräte

Nikon TE2000-E	Nikon, Chiyoda, Tokio, Japan
----------------	------------------------------

Sonstige verwendete Materialien

Cell culture dish, PS, 35/10 MM, vents, CELLSTAR® TC, sterile	Greinerbio one GmbH, Frickenhausen Deutschland
SensiCare Ice Blue Nitrile Exam Gloves	Medline International GmbH, Kleve, Deutschland
Terralin® liquid	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
S&M Waschlotion	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
Tube, 15 ml/50 ml, conical bottom, CELLSTAR®, blue screw cap	Greinerbio one GmbH, Frickenhausen Deutschland

Verwendete Software

Excel 2010	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Word 2011	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
OriginPro 9.2 (2015)	OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA
EndNote X7	Thomson Reuters, New York City, NY, USA
ImageJ	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA

3 Ergebnisse

3.1 Reduktion des 4-HNE bedingten Einstromes von Ca^{2+} durch E06 mAb und D-4F in HEK-293_{TRPA1} und DRGs

3.1.1 Blockade 4-HNE-induzierten Kalziueinstromes durch E06 mAb in HEK_{TRPA1}-Zellen

Um die von Oehler et al. *in vivo* beschriebene Verringerung der Hyperalgesie durch E06 mAb mechanistisch *in vitro* nachvollziehen zu können, wurde 4-HNE mit E06 mAb präinkubiert und auf die Zellen gegeben. Um auszuschließen, dass eine unspezifische Bindung des Antikörpers mit 4-HNE erfolgte, wurden Messungen mit IgM als Kontrolle angefertigt.

Die Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wurde mittels der Fura-2/AM basierten intrazellulären Kalziummessung erfasst. Für alle Messungen, die an mit TRPA1-transfizierten HEK-293-Zellen durchgeführt wurden, diente AITC (10 μM) als Positivkontrolle (Abbildung 6A). Ein vergleichbarer Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration erfolgte nach Zugabe von 4-HNE (10 μM ; Abbildung 6B). Als Kontrolle diente eine Mischung aus 4-HNE und IgM, die ebenfalls vor der Applikation für 30 min präinkubiert wurden (Abbildung 6C). Hierbei war weder eine signifikante Änderung der Fläche unter der Kurve (Abbildung 6E), noch eine signifikante Änderung der reagierenden Zellen (Abbildung 6F) im Vergleich zu 4-HNE festzustellen. Nach Zugabe von 4-HNE, präinkubiert für 30 min mit E06 mAb, (Abbildung 6D), wurde eine Reduktion des Ca^{2+} -Einstromes beobachtet. Die Fläche unter der Kurve war im Vergleich zu 4-HNE signifikant reduziert (Abbildung 6E). Die Anzahl der reagierenden Zellen wurde durch E06 mAb ebenfalls signifikant reduziert (Abbildung 6F).

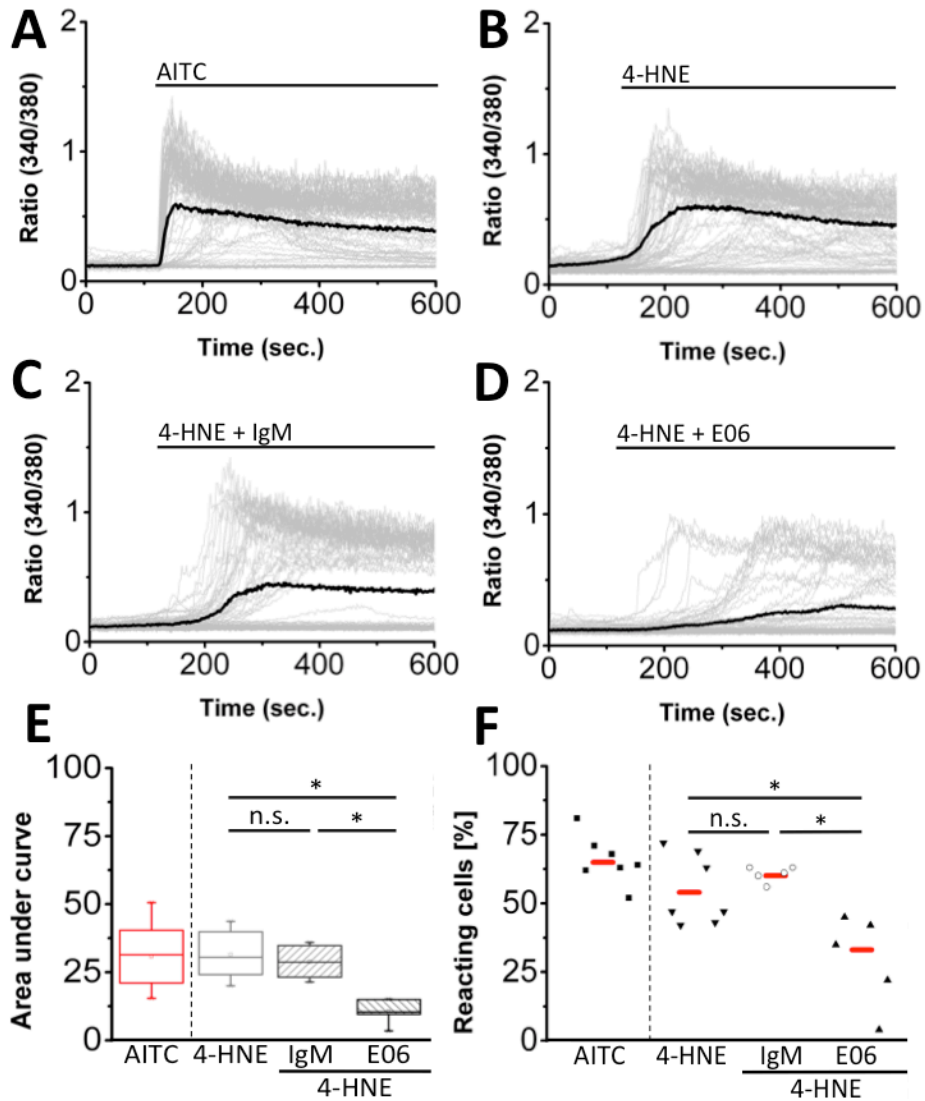


Abbildung 6: E06 mAb verringert den durch 4-HNE bedingten Kalziumeinstrom in HEK-293_{TRPA1}-Zellen. Die repräsentativen Abbildungen der intrazellulären Kalziummessungen zeigen in grau den Ca²⁺-Einstrom jeder einzelnen Zelle und in schwarz den durchschnittlichen Ca²⁺-Influx aller 110-120 Zellen. (A) Als Positivkontrolle dient der TRPA1-Aktivator AITC 10 µM. (B) Zeigt den Kalziumeinstrom in HEK-293_{TRPA1}-Zellen die mit 4-HNE versetzt wurden. In (D) findet sich der Effekt von 4-HNE nach einer 30-minütigen Inkubation mit E06 mAb und anschließender Zugabe zu den Zellen, (C) als Kontrolle diente 4-HNE + IgM (30 min präinkubiert). In (E, F) spiegelt sich die Zusammenfassung aller angefertigten Messungen in der statistischen Auswertung wieder. Hier wurde die Positivkontrolle AITC 10 µM, 4-HNE 30 µM, 4-HNE 30 µM + IgM/E06 mAb in Bezug auf die Fläche unter der Kurve (E) und die Anzahl der reagierenden Zellen (F) miteinander verglichen (E, F: n = 5-6, Einfaktorielle-ANOVA, post hoc Holm-Sidak, * p ≤ 0.05).

3.1.2 Blockade des 4-HNE induzierten Kalziumeinstromes durch D-4F in HEK_{TRPA1}-Zellen

Da Oehler et al. auch für D-4F eine Verringerung der Hyperalgesie *in vivo* zeigen konnten, erfolgten zum mechanistischen Verständnis der molekularen Prozesse die Messungen mit D-4F analog zu den Versuchen mit E06 mAb.

Die Positivkontrolle der HEK_{TRPA1}-Zellen erfolgte erneut mit dem TRPA1-Aktivator AITC (vgl. Abbildung 7A), welcher einen hohen Kalziumeinstrom verursachte. Als Referenz für die weiteren Messungen diente der durch 4-HNE hervorgerufene Kalziumeinstrom in den mit TRPA1-transfizierten HEK-293-Zellen (vgl. Abbildung 7B). Eine Blockade des Kalziumeinstromes war nach der Zugabe von mit D-4F inkubierten 4-HNE festzustellen (Abbildung 7C). Erfolgte eine 5-minütige Inkubation der HEK_{TRPA1}-Zellen mit D-4F, gefolgt von der Zugabe von 4-HNE, konnte eine Blockierung des Effektes von 4-HNE beobachtet werden (Abbildung 7D). Die Fläche unter der Kurve für 4-HNE + D-4F und die Anzahl der reagierenden Zellen wurde im Vergleich zu 4-HNE unabhängig von der verwendeten Applikationsart signifikant reduziert. (Abbildung 7E, F).

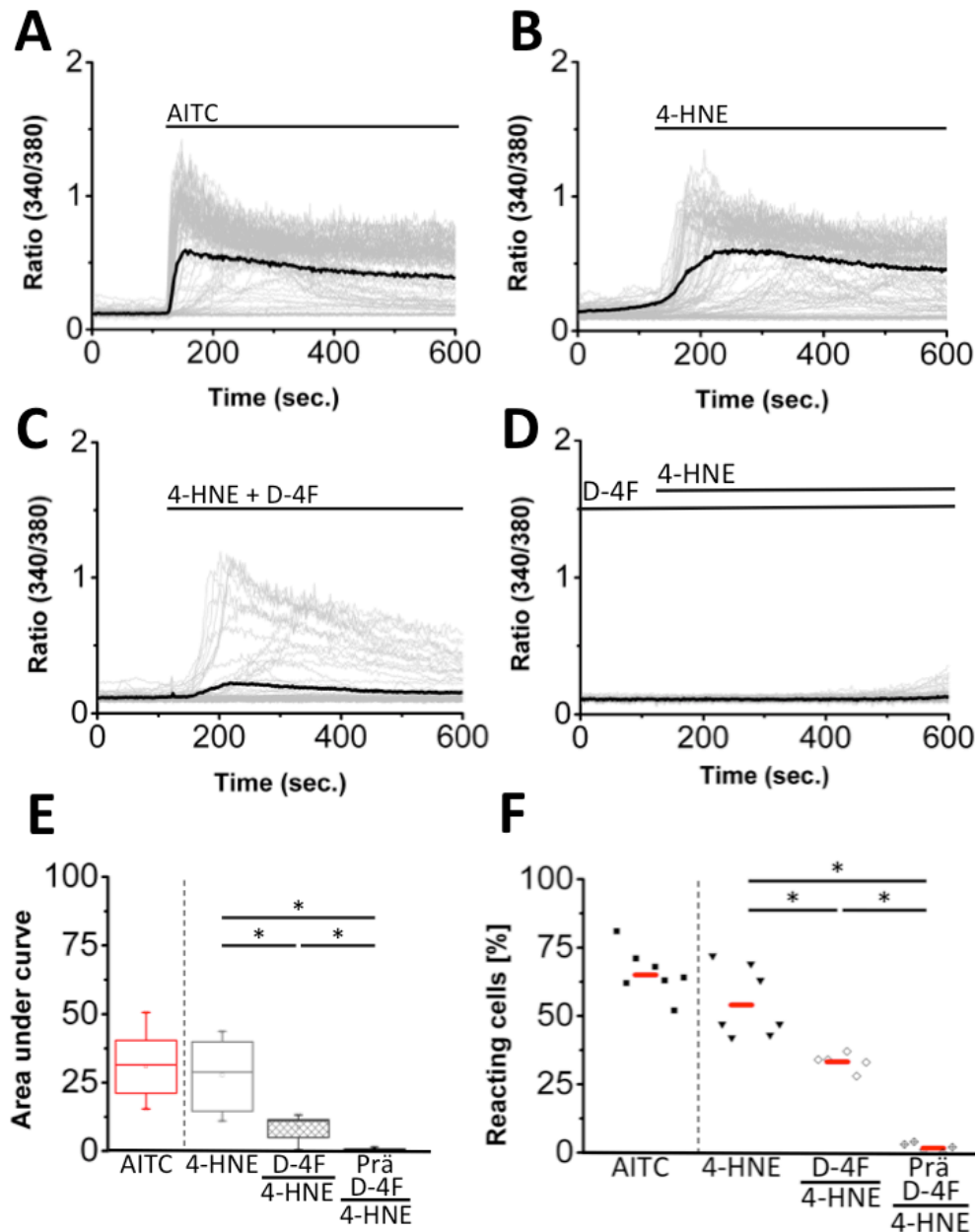


Abbildung 7: Der durch 4-HNE verursachte Kalziumeinstrom in HEK-293_{TRPA1}-Zellen lässt sich durch D-4F verringern. (A) Die mit TRPA1-transfizierten HEK-293-Zellen nach der Zugabe von AITC 10 μ M, (B) 4-HNE 30 μ M und (C) 4-HNE 30 μ M + D-4F 10 μ g/ml (30 min präinkubiert) in den Fura-2/AM basierten intrazellulären Kalziummessungen. (D) veranschaulicht den Effekt von 4-HNE 30 μ M auf die für 5 min mit D-4F präinkubierten HEK-293_{TRPA1}-Zellen. Die statistische Auswertung vergleicht die Fläche unter der Kurve (E) für AITC, 4-HNE, D-4F + 4-HNE (30 min Inkubation) und die mit D-4F vorinkubierten TRPA1-transfizierten HEK-293-Zellen mit anschließender 4-HNE Applikation. Die Anzahl der reagierenden Zellen in Prozent pro Messung (F) wird verglichen (E, F: n = 4, Einfaktorielle-ANOVA, post hoc Holm-Sidak, * p ≤ 0.05).

3.1.3 Blockade des 4-HNE induzierten Kalziumeinstromes durch HC-030031 in HEK_{TRPA1}-Zellen

Um zu klären, ob die beobachteten Effekte eine Interaktion mit dem TRPA1-Kanal bedingen, wurde im Folgenden der TRPA1-Kanal durch HC-030031 blockiert und die dadurch entstehenden Auswirkungen auf den Kalziumeinstrom nach 4-HNE Zugabe aufgezeichnet. Die Darstellung beinhaltet die Kalziumeinströme in HEK_{TRPA1}-Zellen der Positivkontrolle mit AITC (Abbildung 8A) und der Referenzmessungen mit 4-HNE (Abbildung 8B), welche beide einen ähnlich starken Einstrom verursachten. Nach der Präinkubation der TRPA1-transfizierten HEK-293-Zellen mit HC-030031 rief die Zugabe von 4-HNE keinen Kalziumeinstrom mehr hervor (Abbildung 8C). Die Blockierung des Kalziumeinstromes spiegelt sich auch in der statistischen Auswertung wider. So verringerte sich durch die Inkubation der Zellen mit HC-030031 die Fläche unter der Kurve (Abbildung 8D) und auch die Anzahl der reagierenden Zellen signifikant (Abbildung 8E).

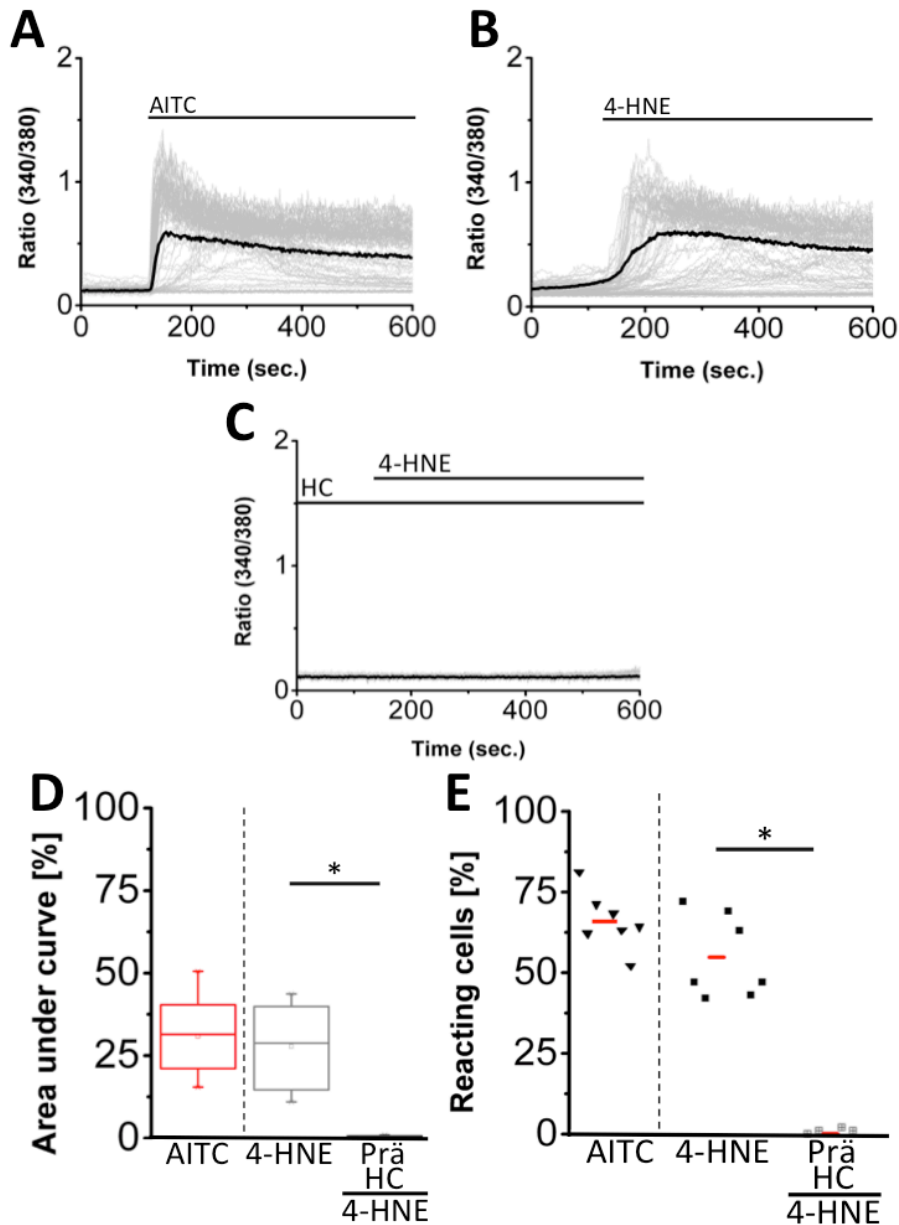


Abbildung 8: Der durch 4-HNE verursachte Kalziumeinstrom lässt sich durch den TRPA1-Blocker HC-030031 in HEK-293_{TRPA1}-Zellen blockieren. Die repräsentativen Darstellungen der intrazellulären Kalziummessung (Ratio F(340/380)) zeigen als graue Linie den Kalziumeinstrom jeder einzelnen Zelle und der durchschnittliche Kalziumeinstrom aller Zellen als schwarze Linie. Der Kalziumeinstrom erfolgt nach Zugabe von (A) AITC 10 μ M und (B) 4-HNE 30 μ M. Die Inkubation der HEK-293_{TRPA1}-Zellen für 5 min mit HC-030031 10 μ M gefolgt von anschließender 4-HNE 30 μ M Gabe ist in (C) dargestellt. Ausgewertet wurde die Fläche unter der Kurve (D) und die Anzahl der reagierenden Zellen in Prozent (E). Bei beiden Auswertungsmethoden wurde jeweils AITC, 4-HNE und die mit HC-030031 präinkubierten Zellen + 4-HNE miteinander verglichen (D, E: n = 3, Student t-test, * p \leq 0.05).

3.1.4 Blockade des 4-HNE induzierten Kalziumeinstromes durch E06 mAb in sensiblen Spinalganglienzellen

Um die gemessenen Effekte von 3.1.1 und 3.1.2 an nativ TRPA1-exprimierenden Zellen des peripheren Nervensystems zu untersuchen, wurden spinale Hinterganglienzellen von C57BL/6 Mäusen untersucht.

Nach der Zugabe von 4-HNE erfolgte ein Kalziumeinstrom (Abbildung 9A), die Kontrolle aus 4-HNE präinkubiert mit IgM (Abbildung 9B) zeigte keinen Unterschied zur Referenzmessung mit 4-HNE.

Erfolgte jedoch die Zugabe von 4-HNE, welches für 30 min mit E06 mAb präinkubiert wurde, so war kein Kalziumeinstrom mehr zu beobachten (Abbildung 9C). Diese Aussagen spiegelten sich auch in der statistischen Auswertung wider. Die Fläche unter der Kurve war für 4-HNE und 4-HNE+IgM nicht signifikant unterschiedlich. 4-HNE präinkubiert mit E06 mAb reduzierte jedoch signifikant die Fläche unter der Kurve (Abbildung 9D). Ähnlich verhielt es sich mit der Anzahl der reagierenden Zellen; hier war kein signifikanter Unterschied zwischen der Applikation von 4-HNE zu 4-HNE+IgM festzustellen, jedoch nach Zugabe von 4-HNE+E06 mAb (Abbildung 9E).

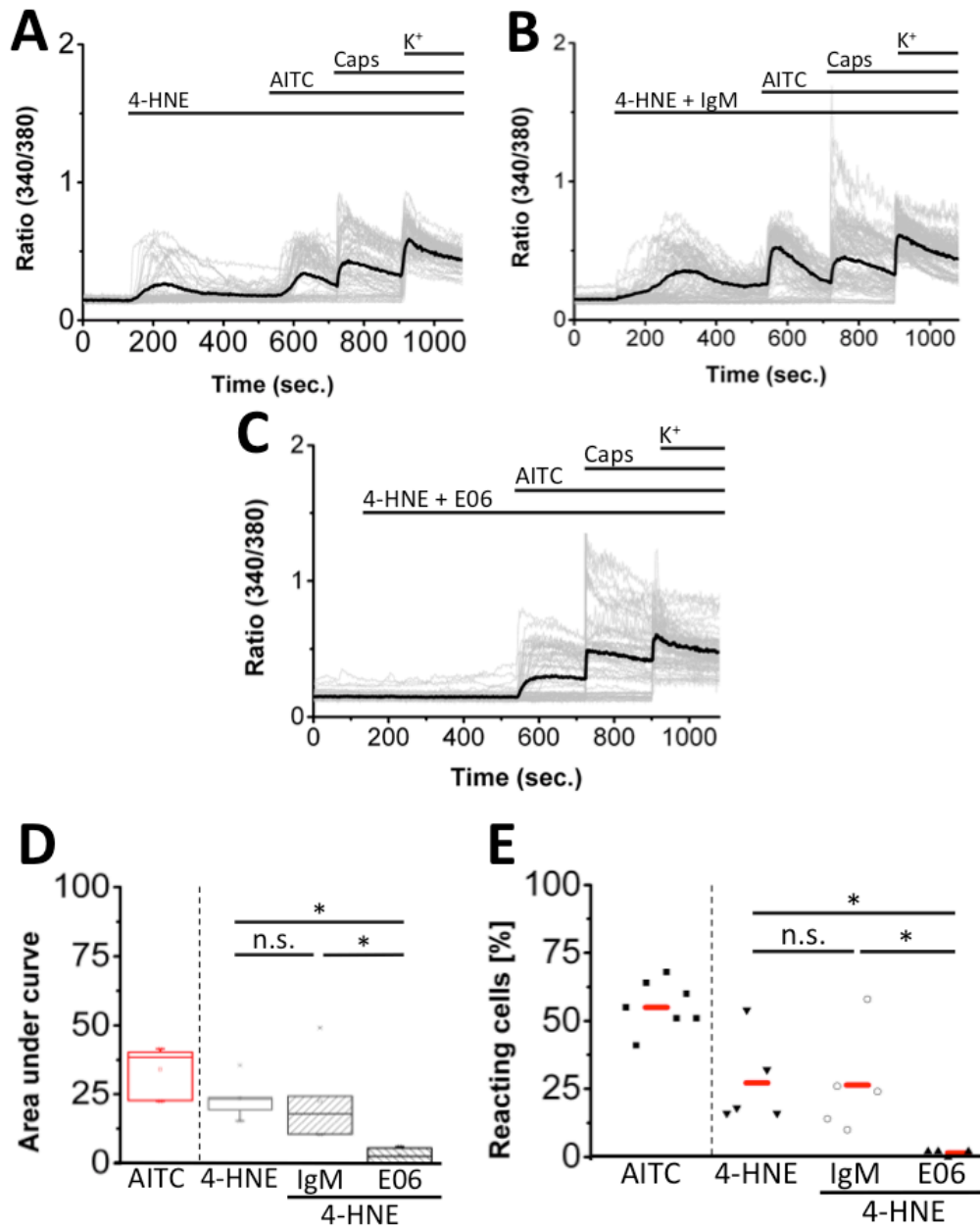


Abbildung 9: In spinalen Hinterwurzelganglienzellen von Mäusen verringert sich der durch 4-HNE verursachte Kalziumeinstrom durch E06 mAb. Die Daten der Kalziummessungen wurden durch entsprechende repräsentative Abbildungen visualisiert (**A**, **B**, **C**). Hierbei repräsentiert die schwarze Linie den durchschnittlichen Kalziumeinstrom aller 90 - 110 Zellen, die grauen Linien den Kalziumeinstrom jeder Einzelzelle. Nach Bestimmung des Basalwertes erfolgte nach 120 s die Zugabe von 4-HNE 30 μ M (**A**), 4-HNE + IgM (**B**) oder 4-HNE + E06 (**C**). Nach der Zugabe der zu testenden Substanzen erfolgte bei allen Messungen die Applikation von AITC 10 μ M, Capsaicin 1 μ M und K⁺ 50 mM. Mittels Fläche unter der Kurve (**D**) und Anzahl der reagierenden Zellen in Prozent (**E**) erfolgte die statistische Auswertung. Hierbei wurde AITC, 4-HNE und (präinkubiert für 30 min) 4-HNE + IgM/E06 miteinander verglichen (**D**, **E**: n = 4, Einfaktorielle-ANOVA, post hoc Holm-Sidak, * p \leq 0.05).

3.1.5 Blockade des 4-HNE induzierten Kalziumeinstromes durch D-4F in sensiblen Spinalganglienzellen

D-4F konnte den durch 4-HNE bedingten Kalziumeinstrom in der mit TRPA1-transfizierten HEK-293-Zelle vermindern. Um dieses Ergebnis auch auf Zellen des peripheren Nervensystems übertragen zu können, erfolgten die im Folgenden aufgeführten Messungen. Nach Zugabe von 4-HNE auf die sensiblen Spinalganglienzellen von C57BL/6 Mäusen erfolgte ein Kalziumeinstrom (Abbildung 10A), welcher als Referenzwert diente. Präinkubierte man 4-HNE mit D-4F für 30 min und appliziert die Mischung auf die Spinalganglienzellen, so war kein Einstrom von Kalzium mehr zu beobachten (Abbildung 10B). Dieser Effekt zeigte sich auch in der statistischen Auswertung. So bewirkte D-4F eine signifikante Reduktion der Fläche unter der Kurve (Abbildung 10C). Auch der Mittelwert der Anzahl der reagierenden sensiblen Spinalganglienzellen ließ sich durch die Inkubation von 4-HNE mit D-4F signifikant verringern (Abbildung 10D).

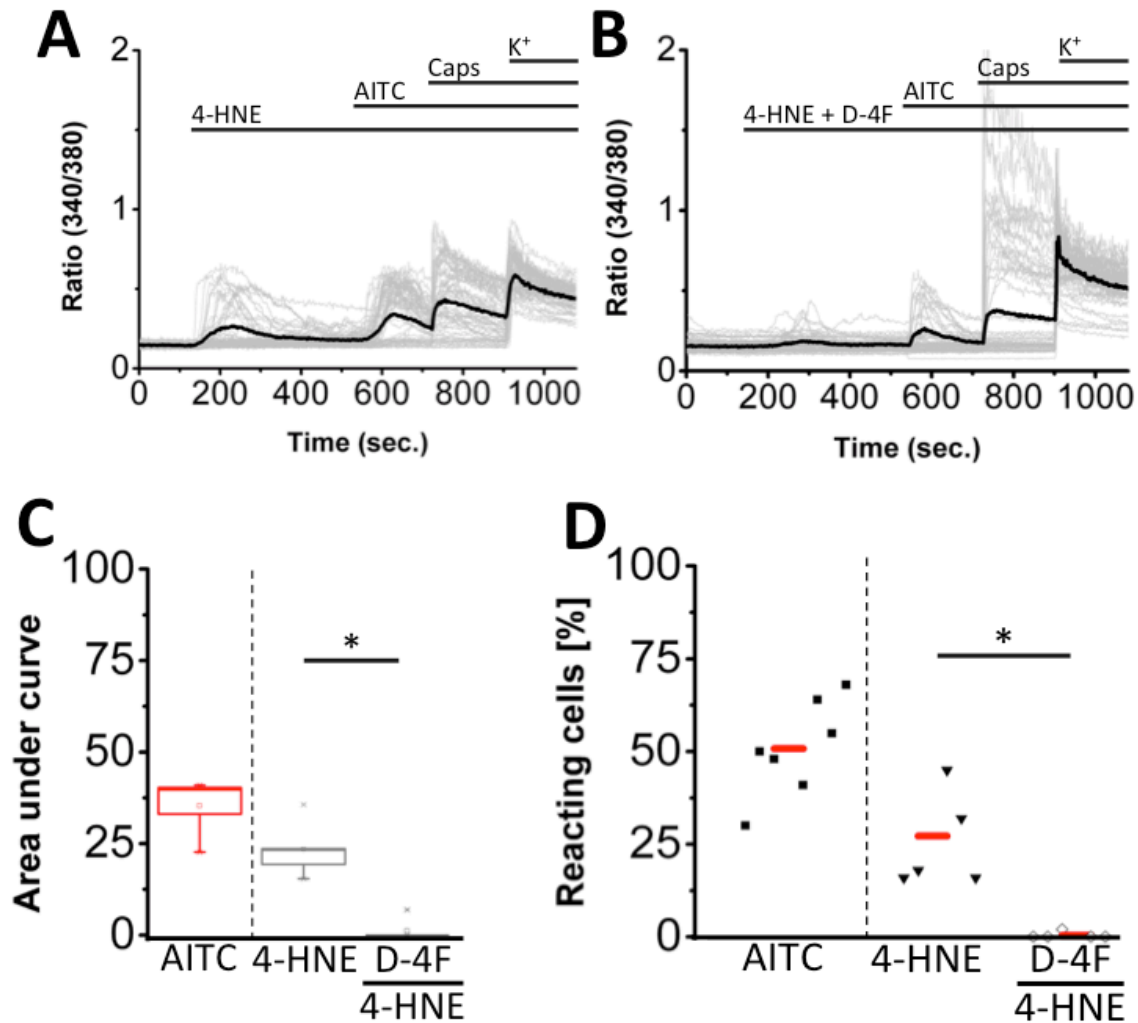


Abbildung 10: D-4F verringert den durch 4-HNE hervorgerufenen Kalziumeinstrom in sensiblen Spinalganglienzellen von Mäusen. Das Testprotokoll sah für die Testung von sensiblen Spinalganglienzellen nach der Zugabe der Testsubstanz (A) 4-HNE 30 μ M oder (B) 4-HNE 30 μ M + D-4F 10 μ g/ml eine Applikation von AITC 10 μ M, Capsaicin 1 μ M und K⁺ 50mM vor. Der Kalziumeinstrom in die zu untersuchenden Zellen wird für jede einzelne Zelle in grau, der Durchschnitt aller 90 – 110 Einzelzellen in schwarz dargestellt. In der statistischen Auswertung wurden die Flächen unter der Kurve (C) oder die Anzahl der reagierenden Zellen (D) für AITC, 4-HNE und 4-HNE + D-4F (30 min präinkubiert) miteinander verglichen. (C, D: n = 4, Student t-test, * p \leq 0.05)

3.2 Einfluss von E06 mAb und D-4F auf H₂O₂ in HEK-293_{TRPA1} und DRGs

3.2.1 Blockade des H₂O₂ induzierten Kalziumeinstromes durch IgM und E06 mAb in HEK_{TRPA1}-Zellen

Da eine Reduktion der Hyperalgesie *in vivo* durch E06 mAb auch durch eine mögliche Interaktion mit den proalgetisch wirkenden ROS bedingt sein konnte, erfolgten die Messungen in Analogie zu den 4-HNE Experimenten mit H₂O₂ als ROS-Vertreter. H₂O₂ verursachte in den HEK_{TRPA1}-Zellen (Abbildung 11B) einen ähnlich starken Kalziumeinstrom wie die Positivkontrolle AITC (Abbildung 11A). Bei den für 30 min präinkubierten Proben von H₂O₂ + IgM (Abbildung 11C) und H₂O₂ + E06 mAb (Abbildung 11D) strömte vergleichbar viel Kalzium in die Zellen ein. In der statistischen Auswertung zeigte sich in der Fläche unter der Kurve kein signifikanter Unterschied zwischen IgM und E06 mAb (Abbildung 11E). Auch bei der Anzahl der reagierenden Zellen wurde kein signifikanter Unterschied zwischen IgM und E06 mAb festgestellt (Abbildung 11F). Es kam jedoch insgesamt zu einer signifikanten Reduktion, unabhängig von dem zugesetzten Antikörper, im Vergleich zu den durch H₂O₂ aktivierten Zellen.

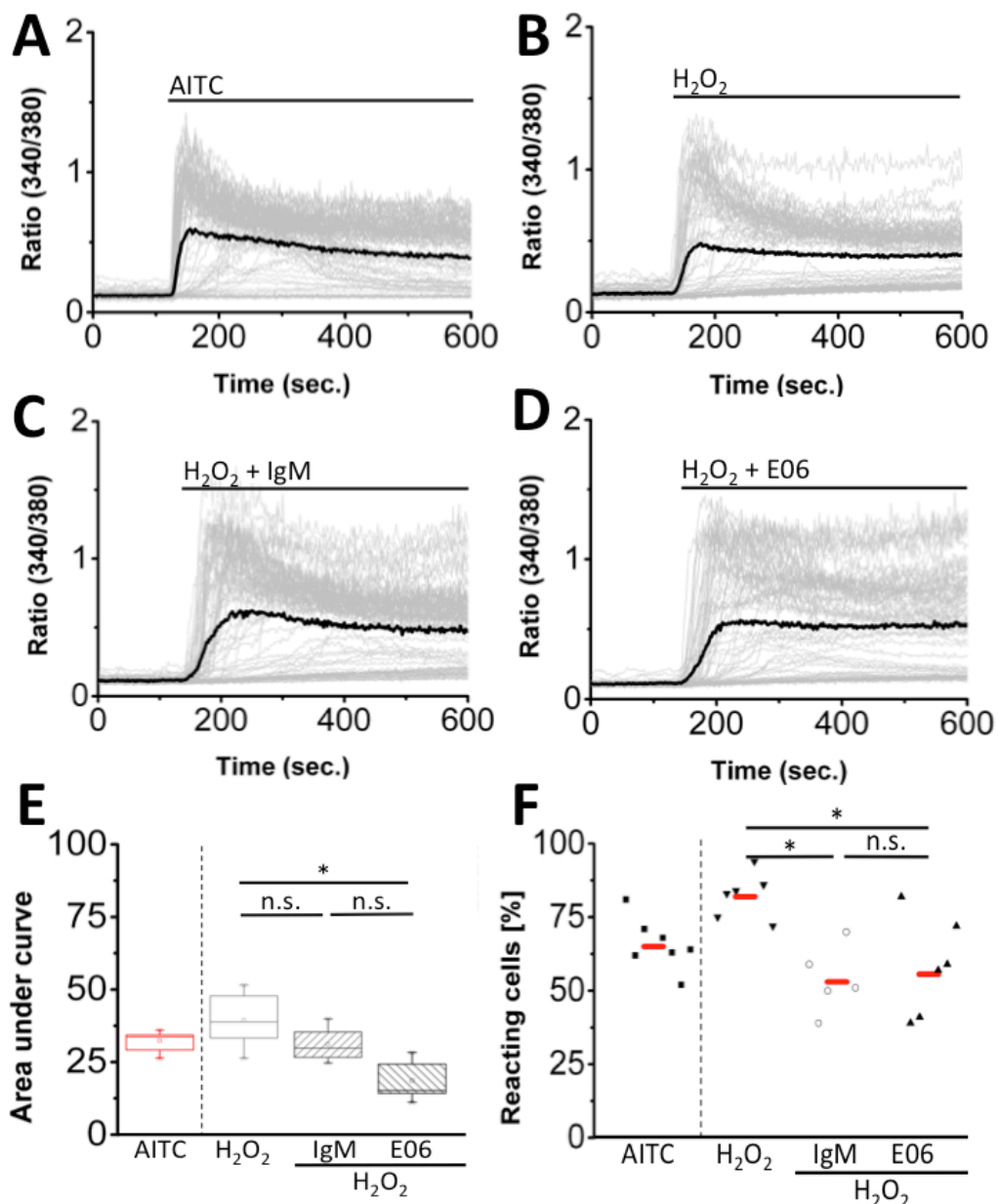


Abbildung 11: E06 mAb und IgM reduzieren den durch H₂O₂ bedingten Ca²⁺-Einstrom in TRPA1-transfizierte HEK-293 Zellen (A-F). (A-D) visualisieren den Ca²⁺-Einstrom in den Fura-2/AM basierten Kalzium Messungen (Ratio F(340/380)). Die Positivkontrolle (A) erfolgte mit Senföl (AITC 10 μM). Außerdem erfolgte die Zugabe von (B) 10 μM H₂O₂, (C) H₂O₂ 10 μM präinkubiert für 30 min mit IgM oder (D) E06 mAb. Die grauen Linien repräsentieren den intrazellulären Ca²⁺-Anstieg jeder einzelnen Zelle, die schwarze Linie den Durchschnitt der 100-120 Einzelzellen. (E+F) Statistik: (E) Der Vergleich der Fläche unter der Kurve (Area under curve) von HEK-293_{TRPA1} Zellen, die mit AITC 10 μM, H₂O₂ 10 μM und H₂O₂ 10 μM + IgM/E06 mAb behandelt wurden. (F) Prozentuale Angabe der reagierenden Zellen nach Zugabe von AITC, H₂O₂ bzw. H₂O₂ + E06 mAb/IgM pro Messung. (E, F: n = 5, Einfaktorielle-ANOVA, post hoc Holm-Sidak, * p ≤ 0.05).

3.2.2 Blockade des H₂O₂ induzierten Kalziumeinstromes durch D-4F in HEK_{TRPA1}-Zellen

In der Entzündungssuppe im Rahmen der Wundheilung finden sich stets ROS (siehe 1.1.2), deshalb sollen die hier gezeigten Messungen den Effekt von H₂O₂ auf D-4F mechanistisch klären.

Hierbei zeigte sich, dass D-4F nach vorheriger, 30 minütiger Präinkubation mit H₂O₂ den durch H₂O₂ bedingten Kalziumeinstrom in mit TRPA1-transfizierten HEK-293-Zellen verringert. Bei einer vorherigen Inkubation der transfizierten Zellen mit D-4F war kein verminderter Einstrom von Kalzium durch H₂O₂ festzustellen (Abbildung 12C, D). Die Positivkontrolle mittels AITC (Abbildung 12A) rief in den HEK_{TRPA1}-Zellen einen mit H₂O₂ vergleichbaren Kalziumeinstrom hervor (Abbildung 12B). Die Fläche unter der Kurve ließ sich durch die 30 minütige Präinkubation von D-4F mit H₂O₂ signifikant reduzieren. Es war jedoch keine Signifikanz im Bezug auf die Fläche unter der Kurve zwischen den mit D-4F präinkubierten H₂O₂ und den mit D-4F inkubierten HEK_{TRPA1}-Zellen und anschließender H₂O₂ Zugabe festzustellen. Auch die Fläche unter der Kurve nach der Applikation von H₂O₂ war im Vergleich zu den mit D-4F präinkubierten HEK_{TRPA1}-Zellen nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 12E). Die Anzahl der reagierenden Zellen ließ sich durch die Präinkubation von H₂O₂ mit D-4F signifikant reduzieren. Zwischen den durch H₂O₂ aktivierten TRPA1-transfizierten HEK-293-Zellen und den mit D-4F präinkubierten Zellen war keine signifikante Reduktion festzustellen (Abbildung 12F).

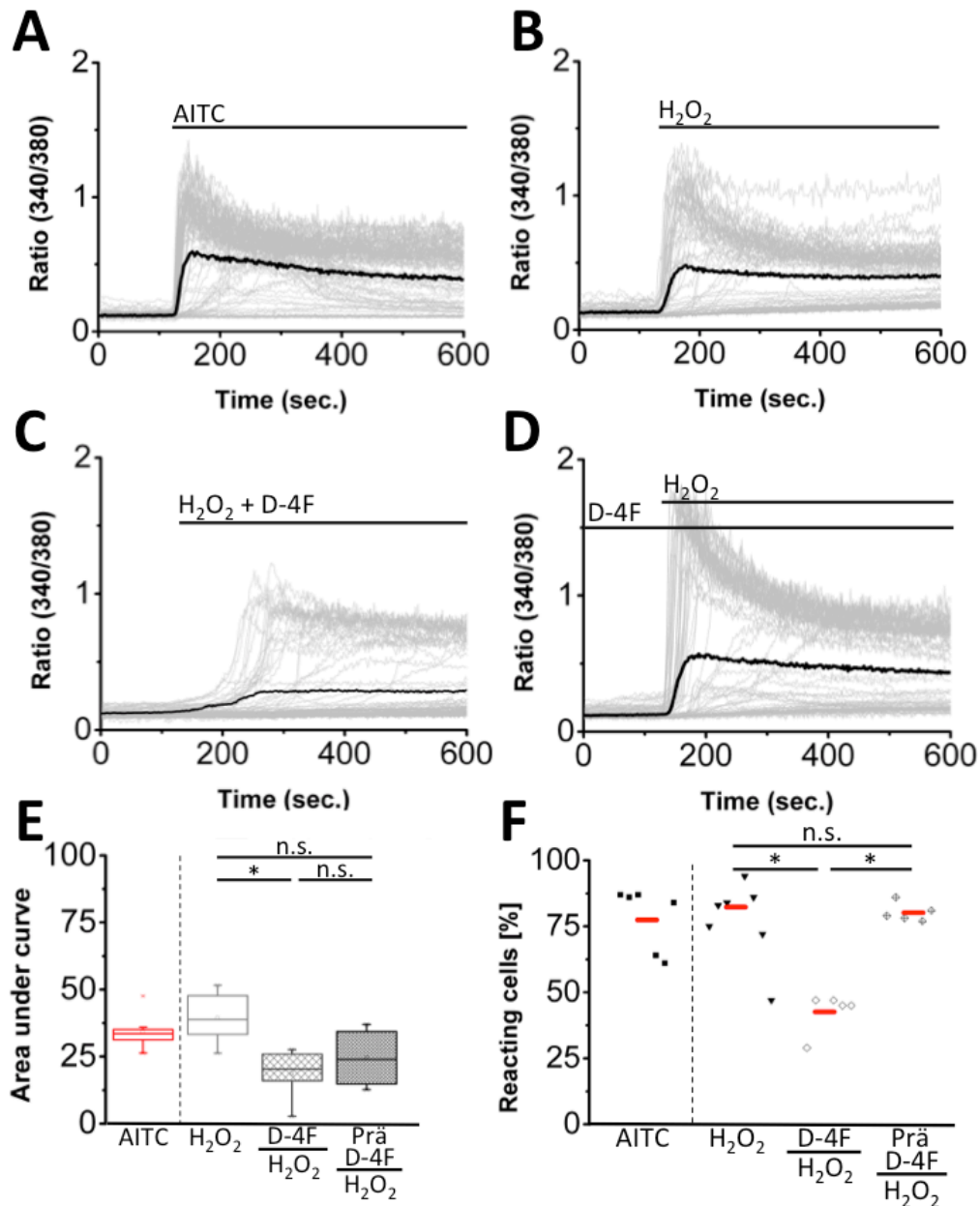


Abbildung 12: D-4F verringert den durch H₂O₂ verursachten Ca²⁺ Einstrom in HEK-293_{TRPA1} Zellen. (A-D) Repräsentative Abbildungen der Fura-2/AM basierten intrazellulären Ca²⁺-Messungen, die den Einfluss von (A) AITC 10 μ M, (B) H₂O₂ 10 μ M und (C) H₂O₂ 10 μ M 30 min präinkubiert mit D-4F 10 μ g/ml auf mit TRPA1-transfizierte HEK-293-Zellen darstellen. (D) Fünfminütige Präinkubation von HEK-293_{TRPA1} mit D-4F 10 μ g/ml und anschließender Applikation von 10 μ M H₂O₂. Die grauen Linien repräsentieren den Ca²⁺-Gehalt der einzelnen Zellen zu jedem Zeitpunkt, die schwarze Linie den durchschnittlichen Einstrom aller 110 – 120 Zellen. (E) Statistische Darstellung der Fläche unter der Kurve und (F) Anzahl der reagierenden Zellen pro Messung in Prozent für AITC, H₂O₂, H₂O₂ + D-4F und HEK-293_{TRPA1} Zellen präinkubiert mit D-4F. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Einfaktorieller-ANOVA, post hoc Holm-Sidak, n = 5, * p \leq 0.05.

3.2.3 Einfluss von HC-030031 auf den Effekt von H₂O₂ in HEK_{TRPA1}

Um potentielle Interaktionen des TRPA1-spezifischen Blockers HC-030031 mit dem Wasserstoffperoxid und daraus folgender Abnahme der Schmerzensation *in vivo* auszuschließen erfolgten die im Folgenden gezeigten Messungen. AITC (Abbildung 13A) und H₂O₂ (Abbildung 13B) riefen in HEK_{TRPA1}-Zellen einen vergleichbaren Kalziumeinstrom hervor. Die Aktivierung durch H₂O₂ ließ sich nicht durch die Präinkubation der mit TRPA1-transfizierten HEK-293-Zellen mit HC-030031 verringern (Abbildung 13C). Dieses Bild spiegelte sich auch in der statistischen Auswertung wieder. So war die Fläche unter der Kurve für das eingeströmte Kalzium für H₂O₂ und HEK_{TRPA1}-Zellen präinkubiert mit HC-030031 nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 13D). Es zeigte sich auch keine signifikante Reduktion der Anzahl der reagierenden Zellen (Abbildung 13E).

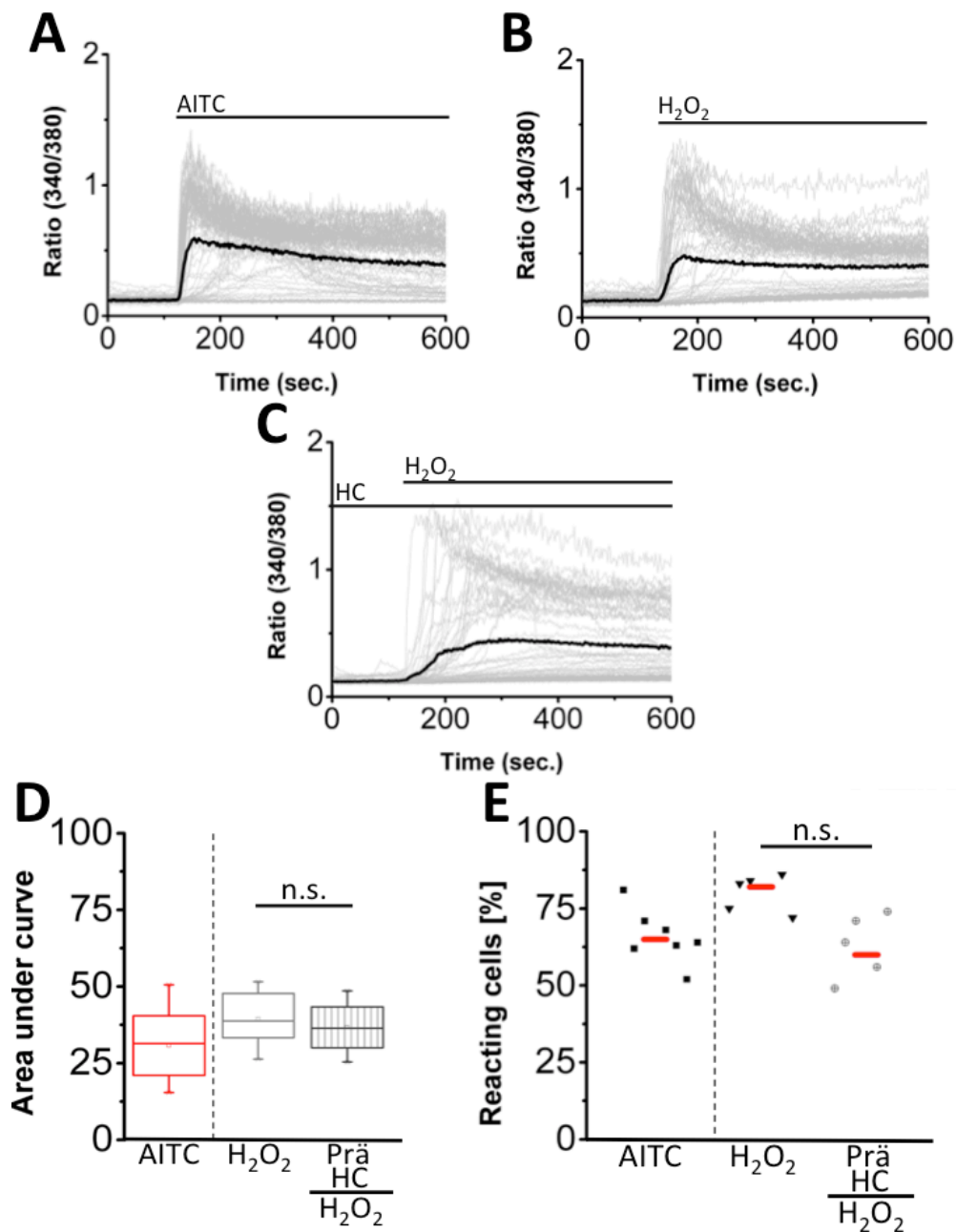


Abbildung 13: Der Effekt von H₂O₂ auf mit TRPA1-transfizierten HEK-293-Zellen lässt sich nicht durch HC-030031 blockieren. Die Abbildung der Positivkontrollen mit (A) AITC 10 μM und von (B) H₂O₂ 10 μM in Kombination mit TRPA1-transfizierten HEK-293 Zellen. Der Durchschnittliche Ca²⁺-Einstrom aller Zellen wird von der schwarzen Linie, der Einstrom von Ca²⁺ in die Einzelzellen mit den grauen Linien dargestellt. Der Effekt von 10 μM H₂O₂ auf mit HC-030031 präinkubierte HEK-293_{TRPA1}-Zellen ist in (C) dargestellt. Statistische Darstellung des intrazellulären Kalziumgehaltes nach Zugabe von AITC 10 μM, H₂O₂ 10 μM, nach Präinkubation (5 min) der HEK-293_{TRPA1} Zellen mit HC-030031 und anschließender H₂O₂ Applikation, mittels Fläche unter der Kurve (D) und Anzahl der reagierenden Zellen pro Messung in Prozent (E). (D, E: Students t-test, n = 5 Messungen an 3 Tagen, * p ≤ 0.05)

3.2.4 Blockade des durch H₂O₂ verursachten Kalziumeinstromes durch E06 mAb in sensiblen Spinalganglienzellen

In Analogie zu den Versuchen mit 4-HNE erfolgte auch mit H₂O₂ als Agens eine Übertragung der Versuche auf Zellen des peripheren Nervensystems. An spinalen Hinterganglienzellen von C57BL/6-Mäusen ließ sich nur die Anzahl der reagierenden Zellen durch den Einfluss von E06 mAb auf H₂O₂ vermindern, die Fläche unter der Kurve blieb davon unbeeinflusst. Als Referenzwert diente der durch H₂O₂ bedingte Kalziumeinstrom (Abbildung 14A). Hierbei zeigte sich kein quantitativer Unterschied zur Kontrolle mit dem IgM-Antikörper (Abbildung 14B). Bei dem mit E06 mAb präinkubierten H₂O₂ zeigte sich ein vergleichbarer Kalziumeinstrom (Abbildung 14C). Im Bezug auf die Fläche unter der Kurve war keine signifikante Zu- oder Abnahme zwischen H₂O₂, IgM und E06 mAb nachzuweisen (Abbildung 14D). Lediglich die Anzahl der reagierenden Zellen reduzierte E06 mAb signifikant (Abbildung 14E).

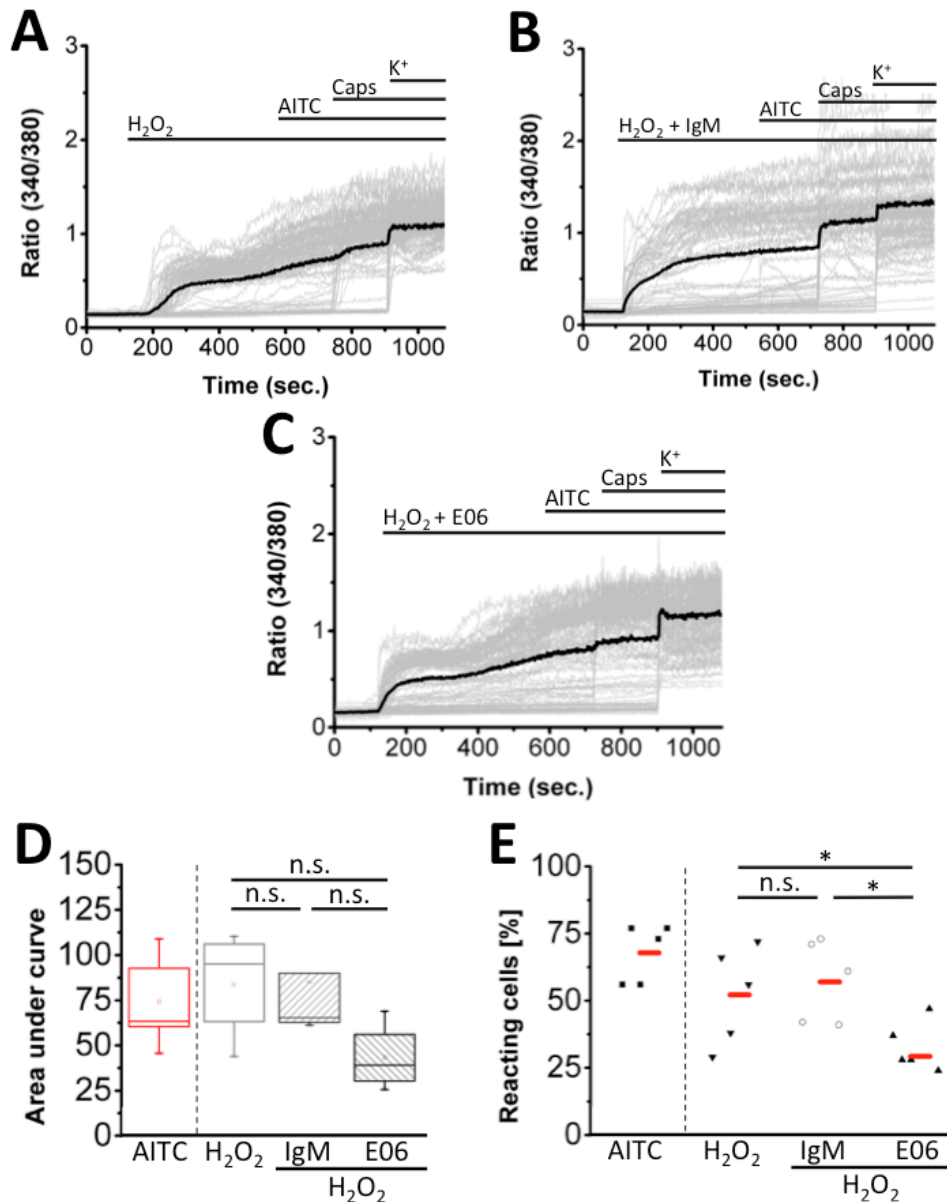


Abbildung 14: E06 mAb verringert die Anzahl der reagierenden spinalen Hinterwurzelganglienzellen von Mäusen, nicht aber den quantitativen Ca²⁺-Einstrom. Die Fura-2/AM basierten Ca²⁺-Messungen werden durch entsprechende, repräsentative Darstellungen (**A**, **B**, **C**) visualisiert. Die durchschnittliche Änderung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration aller 90 – 120 Zellen ist mittels schwarzer Linie, der Einstrom von Ca²⁺ in jeder einzelnen Zelle mittels grauer Linie dargestellt. Es erfolgte bei allen Messungen nach der Zugabe von (**A**) H₂O₂ 10 μM bzw. (**B**) H₂O₂ 10 μM + IgM oder (**C**) + E06 mAb die Applikation von AITC 10 μM, Capsaicin 1 μM und KCl 50 mM. Die Daten der Einzelmessungen wurden zusammengefasst (**D**, **E**) und der Effekt auf die Fläche unter der Kurve (**D**) und die Anzahl der reagierenden Zellen (**E**) nach Zugabe von H₂O₂ 10 μM oder H₂O₂ 10 μM präinkubiert für 30 min mit IgM/E06 mAb miteinander verglichen. (**D**, **E**: n = 5 Messungen an 3 unterschiedlichen Tagen, Einfaktorielle-ANOVA, post hoc Holm-Sidak, * p ≤ 0.05)

3.2.5 Blockade des durch H₂O₂ verursachten Kalziumeinstromes durch D-4F in sensiblen Spinalganglienzellen

In Analogie zu den E06 mAb Versuchen sollte auch D-4F in Kombination mit H₂O₂ an Zellen des peripheren Nervensystems getestet werden. Hierbei zeigte sich, dass D-4F in sensiblen, spinalen Ganglienzellen den durch H₂O₂ bedingten Kalziumeinstrom reduziert. Als Referenzwert diente der durch H₂O₂ hervorgerufene Kalziumeinstrom (Abbildung 15A). Es zeigte sich eine deutliche Reduktion des Kalziumeinstromes für das mit D-4F präinkubierte H₂O₂ (Abbildung 15B). Diese Reduktion ließ sich auch statistisch nachweisen. So erfolgte eine Abnahme der Fläche für H₂O₂ präinkubiert mit D-4F (Abbildung 15C). Auch bei der Anzahl der reagierenden Zellen erfolgte eine signifikante Reduktion (Abbildung 15D).

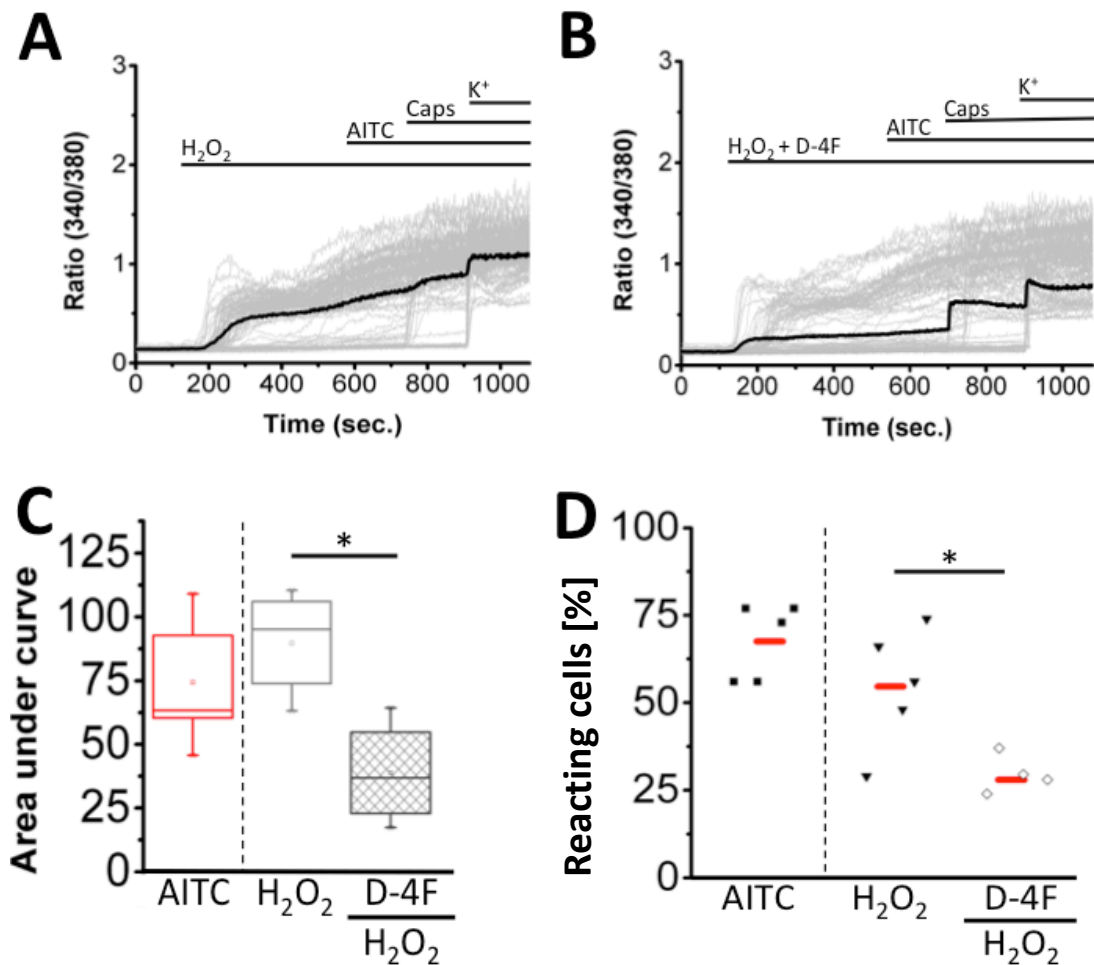


Abbildung 15: D-4F verringert den durch H_2O_2 bedingten Ca^{2+} -Einstrom in spinalen Hinterwurzelganglienzellen von Mäusen. Zur Visualisierung der Fura-2/AM basierten Ca^{2+} -Messungen zeigen die repräsentativen Abbildungen den Einstrom von Kalzium nach der Zugabe von (A) H_2O_2 10 μM bzw. (B) D-4F 10 $\mu\text{g/ml}$ + H_2O_2 10 μM (30 min präinkubiert). Der durchschnittliche Einstrom von Ca^{2+} aller 90-110 Zellen wird durch eine schwarze Linie, der Einstrom der Einzelzellen mittels grauer Linien dargestellt. (C, D) Statistische Zusammenfassung aller durchgeführten Messungen, dabei wurden je H_2O_2 10 μM und D-4F 10 $\mu\text{g/ml}$ + H_2O_2 10 μM (30 min präinkubiert) miteinander verglichen. Als Positivkontrolle diente der TRPA1-Aktivator Senföl (AITC 10 μM). Die Auswertung gliedert sich in die Änderung der Fläche unter der Kurve (C) und die Anzahl der reagierenden Zellen in Prozent (D). (C, D: n = 5, Students t-test, * $p \leq 0.05$)

3.3 Kontrollmessungen an HEK-293_{TRPV1} und HEK-293-Zellen

3.3.1 Wirkung von Capsaicin + E06 mAb/D-4F auf TRPV1-Kanäle

Um auszuschließen, dass die Wirkung von E06 mAb und D-4F in spinalen Hinterganglien auf einer Interaktion mit dem TRPV1-Kanal oder dem TRPV1 Aktivator Capsaicin beruhen, erfolgte eine Testung an mit TRPV1-transfizierten HEK-293-Zellen. Der starke Ca²⁺-Einstrom durch die Applikation von Capsaicin in TRPV1-transfizierten HEK-293-Zellen diente als Referenzwert (Abbildung 16A). Sowohl bei der Applikation von präinkubierten Capsaicin mit E06 mAb (Abbildung 16B) und mit D-4F (Abbildung 16C) war kein Unterschied im Vergleich zum Referenzwert festzustellen. Die statistische Auswertung wies dementsprechend keinen signifikanten Unterschied zwischen den quantitativen Ca²⁺-Einströmen auf (Abbildung 16D). Die Anzahl der reagierenden Zellen unter dem Einfluss von Capsaicin und Capsaicin präinkubiert mit E06 mAb bzw. D-4F unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant.

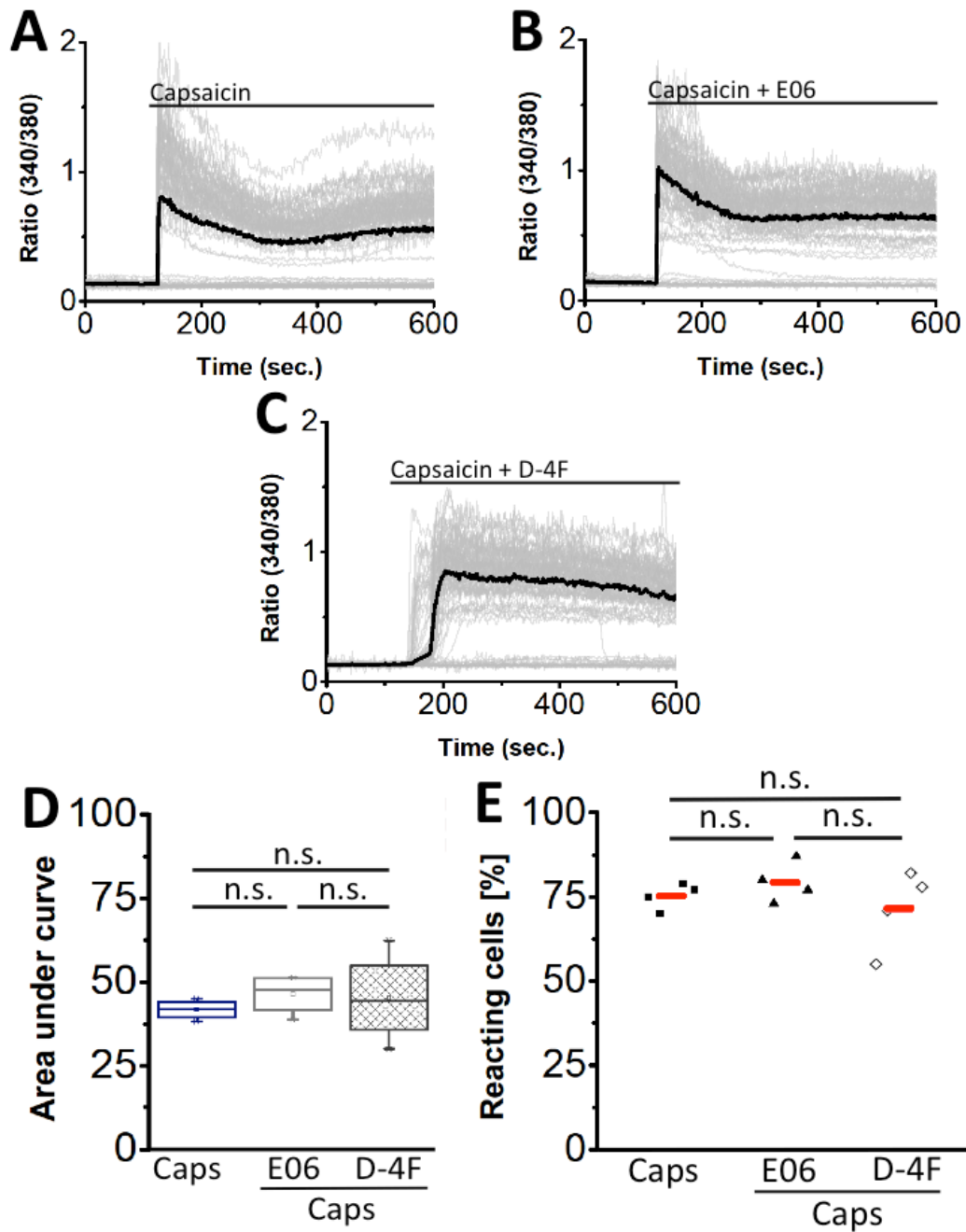
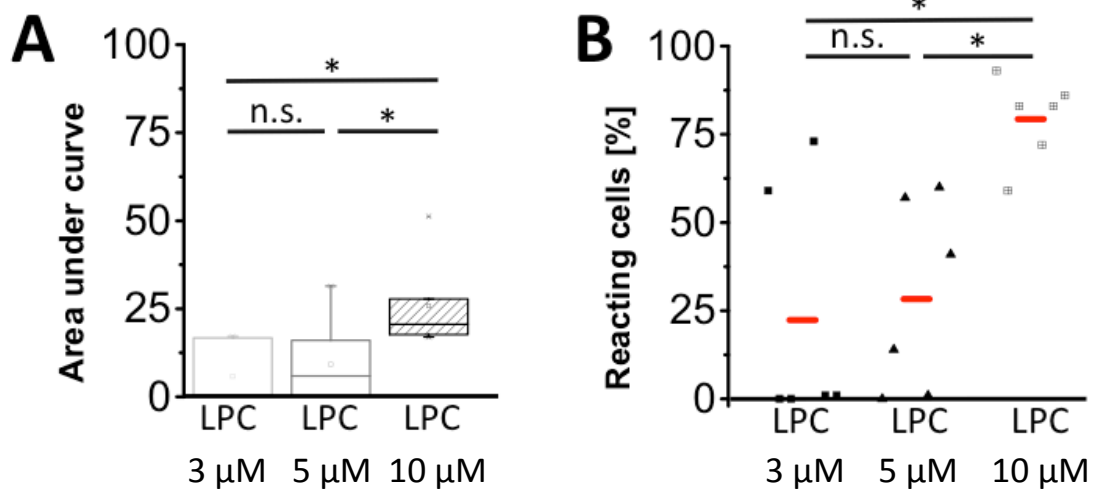


Abbildung 16: D-4F und E06 mAb verringern den durch Capsaicin bedingten Kalziumeinstrom in HEK-293_{TRPV1}-Zellen nicht. Die visualisierten Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration beschreiben den Einfluss von Ca^{2+} nach Zugabe von (A) Capsaicin 1 μM und (jeweils für 30 min präinkubiert) (B) Capsaicin 1 μM + E06 mAb bzw. (C) Capsaicin 1 μM + D-4F 10 $\mu\text{g/ml}$. Zur Verdeutlichung erfolgte zusätzlich der Vergleich mittels (D) Fläche unter der Kurve und (E) Anzahl der reagierenden Zellen. Es wurde jeweils Capsaicin, Capsaicin + E06 mAb und Capsaicin + D-4F verglichen. (D, E: n = 3, Einfaktorielle-ANOVA, post hoc Holm-Sidak, * p \leq 0.05)

3.3.2 Effekt von Lysophosphatidylcholin auf HEK-293-Zellen

In den MALDI-TOF Analysen von Oehler et al. konnte regelhaft Lysophosphatidylcholin nachgewiesen werden. Um die Wirkung von Lysophosphatidylcholin (LPC) auf TRPA1 transfizierte Zellen zu untersuchen, erfolgten die Messungen nach dem bekannten Protokoll. Hier zeigte sich, dass LPC unabhängig von der Transfizierung mit TRPA1 einen Kalziumanstieg in HEK-293-Zellen bewirkt. In untransfizierten HEK-293-Zellen war für die Fläche unter der Kurve bei einer LPC Konzentration von 3 μM und 5 μM kein signifikanter Unterschied festzustellen. Bei einer Erhöhung der Konzentration auf 10 μM LPC war ein signifikanter Ca^{2+} -Einstrom und somit eine Vergrößerung der Fläche unter der Kurve zu beobachten (Abbildung 17A). Ähnlich verhielt es sich mit der Anzahl der reagierenden Zellen. Bei einer LPC-Konzentration von 3 μM und 5 μM konnte keine signifikante Zunahme an reagierenden Zellen beobachtet werden. Bei einer Konzentration von 10 μM LPC hingegen zeigte sich ein signifikanter Anstieg der reagierenden Zellen (Abbildung 17B). Auch bei den TRPA1-transfizierten HEK-293-Zellen erfolgte ein LPC-konzentrationsabhängiger Ca^{2+} -Einstrom (Abbildung 17C, D).

HEK-Zellen



HEK_{TRPA1}-Zellen

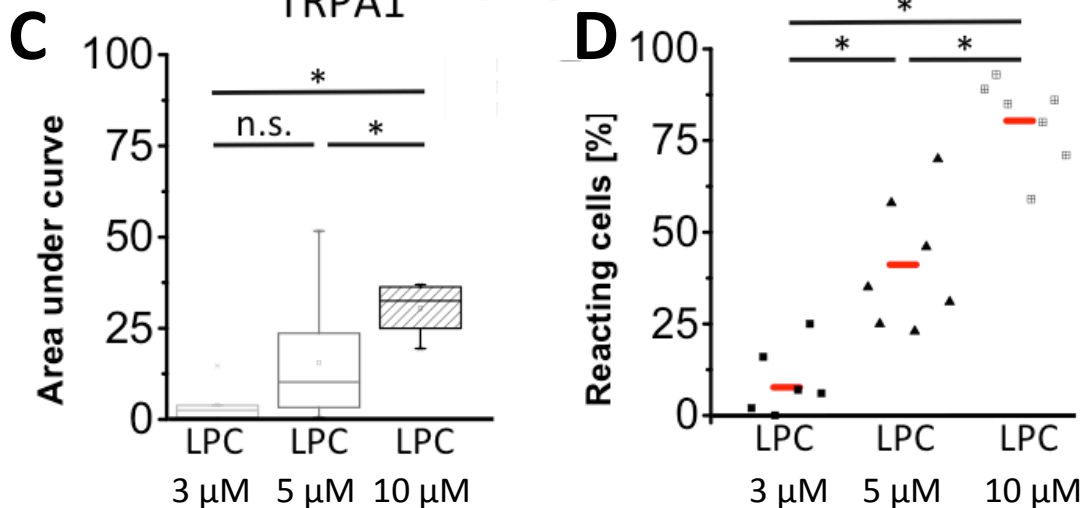


Abbildung 17: Konzentrationsabhängiger Anstieg des Kalziumeinstromes durch Lysophosphatidylcholin (LPC) in HEK-293 und HEK-293_{TRPA1}-Zellen. In den statistischen Auswertungen wurden jeweils die unterschiedlichen Konzentrationen von Lysophosphatidylcholin (3, 5 und 10 μM) und deren Effekt auf die Fläche unter der Kurve und die Prozentzahl der reagierenden Zellen pro Messung für untransfizierte HEK-293-Zellen (**A**, **B**) und mit TRPA1-transfizierte HEK-293-Zellen (**C**, **D**) dargestellt. (**A**, **B**: n = 4, **C**, **D**: n = 3, Einfaktorielle-ANOVA, post hoc Holm-Sidak, * p ≤ 0.05)

3.4 Effekt von H₂O₂ auf Membranphospholipide der HEK-293-Zellen

In den in Kooperation mit Herrn Priv.-Doz. Schiller in Leipzig durchgeführten MALDI-TOF- Analysen konnten keine oxidierten Phospholipide in den Proben nachgewiesen werden. Es zeigte sich unabhängig von der Inkubationszeit mit H₂O₂ (Abbildung 18A, Abbildung 18B) kein verändertes Masse zu Ladungsverhältnis der nachgewiesenen Moleküle im Vergleich zur Kontrollmessung ohne H₂O₂ (Abbildung 18C). Im zu erwartenden Bereich von oxidierten Phospholipiden konnten keine Ausschläge aufgezeichnet werden (Oehler et al., 2017).

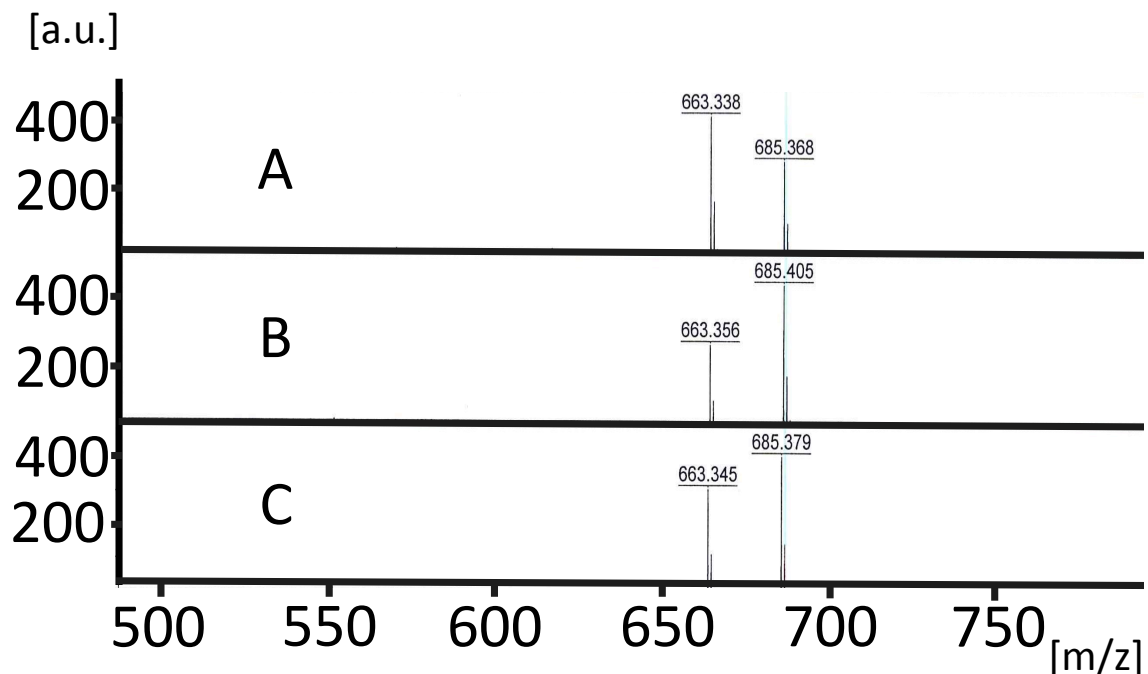


Abbildung 18: Keine nachweisbare Lipidperoxidation der Membranphospholipide von HEK-293-Zellen nach 3 bzw. 15 min Inkubation mit H₂O₂. Repräsentative Abbildung der 12 MALDI-TOF Analysen. Es zeigen sich sowohl in den Proben (HEK-293-Zellen + 10 µM H₂O₂) mit einer Inkubationszeit (A) von 3 min, (B) von 15 min und in den Kontrollmessungen (C) ohne H₂O₂ keine Verschiebungen des Masse zu Ladungsverhältnisses in Abhängigkeit der Inkubationsdauer.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Es wurde gezeigt, dass sowohl E06 mAb als auch ApoA-I mimetisches Peptid D-4F eine signifikante Reduktion des 4-HNE-induzierten Kalziumeinstroms in HEK-293_{TRPA1}-Zellen bewirkt. Da neben dem TRPA1-Kanal auch der TRPV1-Kanal eine große Rolle in der Nozizeption spielt (Gangadharan and Kuner, 2013), wurde sichergestellt, dass E06 mAb und D-4F keine detektierbaren Interaktionen mit dem TRPV1 Agonisten Capsaicin zeigen, bevor die Experimente an nativ TRPA1- und TRPV1-exprimierende, sensible Spinalganglienzellen von C57BL/6-Mäusen verifiziert wurden. Auch in den primären Neuronenkulturen verringerten D-4F und E06 mAb den durch 4-HNE verursachten Kalziumeinstrom.

Darüber hinaus konnte die Spezifität von E06 mAb und D-4F gegenüber H₂O₂ als Vertreter der reaktiven Sauerstoffspezies eingeschränkt werden. Hier zeigte sich lediglich eine unspezifische Reduktion des durch H₂O₂ bedingten Kalziumeinstromes.

Die Ergebnisse der MALDI-TOF Analyse konnten keine oxidierten Phospholipide als mögliche TRPA1 Aktivatoren nachweisen. Die Zusammenschau der Ergebnisse dieser Dissertation mit der aktuellen Literatur lässt aber die Möglichkeit offen, dass Versuchsaufbaubedingt kleinere OxPL wie z.B. 4-HNE nicht detektiert werden konnten (vergl. 4.4).

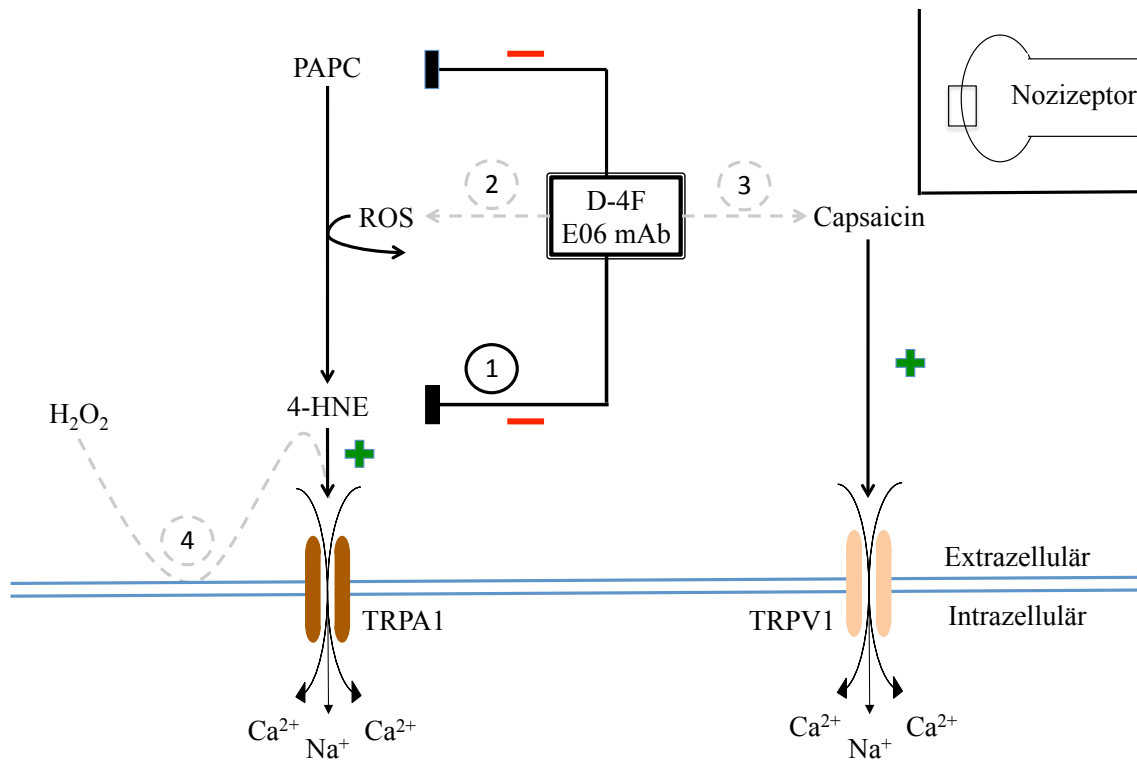


Abbildung 19: Zusammenfassung der Ergebnisse. Vergrößerung der Nozizeptoroberfläche mit Lipiddoppelschicht und TRPA1/TRPV1-Kanälen. Nachgewiesene Reaktionswege werden schwarz dargestellt, keine Interaktion hingegen grau. D-4F und E06 mAb blockieren den durch 4-HNE ausgelösten Kalziumeinstrom *in vitro* (vergl. Hypothese 1). Keine nachweisbaren, spezifischen Interaktion zwischen D-4F und E06 mAb mit H₂O₂ (vergl. Hypothese 2). D-4F und E06 mAb interagieren nicht mit dem TRPV1-Aktivator Capsaicin (vergl. Hypothese 3). *In vitro* konnten keine TRPA1-aktivierende OxPL durch die H₂O₂ bedingte Peroxidation der Membranlipide nachgewiesen werden (Locke et al.). (vergl. Hypothese 4)

4.2 Diskussion der Zellkulturen

4.2.1 Zellkultur HEK-293-Zelllinien

Die in dieser Dissertation verwendeten HEK-293-Zelllinien wurden wie unter 2.1 beschrieben, gelagert und kultiviert. Hierbei diente neben der täglichen morphologischen Kontrolle vor allem das Wachstumsverhalten als Maßstab für die Gesundheit der Zellkultur. Eine Verunreinigung der Zellkultur mit Bakterien ließ sich optisch mittels Mikroskop oder durch ein verzögertes Wachstum zuverlässig feststellen. Prophylaktisch wurden die Zellkulturen mit Penicillin/Streptomycin (P/S) versetzt, um eine Infektion zu verhindern.

Eine virale Verunreinigung konnte durch keine der zur Verfügung stehenden Methoden sicher ausgeschlossen werden. Deshalb wurde die Arbeiten mit den Zellen unter sterilen Bedingungen ausgeführt.

Die mit TRPA1-transfizierten Zellen wurden während der Kultivierung mit dem Selektionsantibiotikum Hygromycin B versetzt. Dieses, in der Kultivierung von Zellen verbreitete Verfahren, hemmt die Proteinbiosynthese von Zellen ohne Hygromycin B Resistenz. Die verwendeten TRPA1-transfizierten Zellen verfügten über eine Hygromycin Resistenz, somit konnte ein Selektionseffekt erreicht werden.

4.2.2 Zellkultur sensibler Spinalganglien

Die DRG-Zellen der C57BL/6 Mäusen wurden unter Beachtung der gesetzlichen Tierschutzbestimmungen gewonnen. Die anatomische Präparation zur Gewinnung und die Kultivierung der sensiblen Spinalganglienzellen ist unter 0 beschrieben. Als kritisch ist neben den unter 4.2.1 genannten Punkten der Einsatz von Kollagenase und Protease, um das Hüllgewebe der Zellen zu verdauen. Hierbei konnte eine Schädigung der DRG-Zellmembranen nicht sicher ausgeschlossen werden. Um die Zeit des Kontaktes mit der Kollagenase und Protease möglichst gering zu halten, erfolgte bereits bei der Präparation eine möglichst umfassende Entfernung des Hüllgewebes um die Zellen. Beschädigten Zellen gingen anschließend in der Zellkultur unter oder regenerierten sich und konnten wie unter 2.2.2 beschrieben kultiviert werden.

Auch bei diesen Kulturen wurde auf eine exakte Einhaltung der Hygienemaßnahmen geachtet, um eine Kontamination zu verhindern.

Aufgrund der Einhaltung der oben genannten Punkte eignete sich das etablierte System der Zellgewinnung und Kultivierung sowohl von HEK-293- als auch der DRG-Zellen für die hier aufgeführten Experimente.

4.3 Diskussion des Calcium-Imaging

Das Messen von intrazellulären Kalziumkonzentrationen mittels Echtzeit-Kalziummessung ist seit der Entwicklung von Farbstoffen der sogenannten „neuen Generation“, wie z.B. das in den Experimenten verwendete Fura-2, eine etablierte Methode (Grynkiewicz et al., 1985). Zum verwendeten technischen Aufbau, Farbstoffen und Funktion sei auf das Kapitel 2.3 verwiesen. Einige Eigenschaften der Methode erscheinen dennoch diskussionswürdig.

4.3.1 Absolute Kalziumkonzentration vs. Ratio

Eine grundlegende Limitation der Echtzeit-Kalziummessung war, dass sich keine Aussage über die absolute intrazelluläre Kalziumkonzentration ohne tägliche, vorangegangene Eichung treffen lässt. Die Eichung müsste mittels bekannten Stimulus vor jeder Messung erfolgen. Hierbei würde aber schon vor Beginn der Messung eine Manipulation des Ca^{2+} -Haushaltes der Zelle erfolgen, was die Messergebnisse verfälschen könnte. Eine weitere Möglichkeit wäre die Kalibrierung mittels Kalziumpuffer-Kalibrierungssets. Hierbei erfolgt vor jeder Messreihe eine Kalibrierung des Mikroskops.

Da der Fokus oft auf einer Änderung der Kalziumkonzentration und nicht der absoluten Konzentration liegt, hat sich die Ausgabe der Änderung des Kalziumwertes mittels Ratio $F(340/380)$ etabliert. So kann zwar keine Aussage über die absolute, intrazelluläre Kalziumkonzentration getroffen werden, wohl aber über die Änderung der Kalziumkonzentration

4.3.2 Lichteffekte auf die Fluoreszenzfarbstoffe

Für die von Grynkiewicz *et al.* beschriebenen Fluoreszenzfarbstoffe und deren Weiterentwicklungen besteht die Möglichkeit des Ausbleichens bei längerer Lichtexposition. Der hier verwendete Farbstoff Fura-2/AM zeichnet sich neben seiner verbesserten Affinität gegenüber Kalzium auch durch eine verbesserte Stabilität gegenüber UV Strahlung aus, gerade im Vergleich zu anderen Farbstoffen der neuen Generation wie z.B. Indol-1 (Becker & Fay, 1987). Der Versuchsaufbau und die Experimente berücksichtigten diesen Sachverhalt. Die Langzeitlagerung, Vorbereitung und Messung erfolgte unter größtmöglicher Lichtabschirmung. Des Weiteren wurden die Zeiten der Lichtexposition, mittels geringer Belichtungszeiten von <100 ms, in einem abgedunkelten Raum, möglichst geringgehalten. Auf diese Weise konnte kein Ausbleichen beobachtet werden.

Die Verminderung der Lichtexposition sollte auch die Radikalbildung v.a. durch UV-A Strahlung vermindern. Die durch UV-Licht entstehende Radikale sind als TRPA1-Aktivatoren bekannt (Hill and Schaefer, 2009). Durch die abwechselnde Belichtung mit Licht der Wellenlänge von 380 nm und 340 nm (UV-A-Spektrum) war eine komplette Abschirmung nicht möglich. Diese natürliche Limitation der Methode schien aber bei den aufgeführten Experimenten keinen großen Effekt auf die Messung zu haben, da sich

in jeder Messung ein stabiler Kalziumbasalwert zeigte. Der Effekt durch die verwendeten Agonisten so groß war, dass eine potentielle UV-A-induzierte Aktivierung nicht ins Gewicht fiel.

4.3.3 Selektionseffekt durch Auswahl der Zellen

Oft fanden sich im Sichtfeld der Kamera mehr Zellen als die maximal von ImageJ setz- und auswertbaren 145 ROIs, sodass eine Selektion der Zellen erfolgen musste. Um den „selection bias“ so gering wie möglich zu halten, wurden die Zellen nach morphologischen Kriterien mit einem ROI versehen: mittelgroß, gleichmäßige Furabeladung und keine Zellen aus Zellakkumulationen. Dieser Schritt der Auswertung erfolgte stets am Ende eines Messtages. Die über den Tag erhobenen Daten waren so gespeichert, dass aus dem Dateinamen nicht hervorging, welches Agens hinzugegeben wurde (z.B. 20151028_M1, 20151028_M2,...). Aufgrund dieser Vorkehrungen sollte der Einfluss des Untersuchers durch die ROI-Setzung möglichst geringgehalten werden.

4.3.4 Änderung der Zellmorphologie nach Agenszugabe

Eine weitere mögliche Beeinflussung könnte die Änderung der Zellmorphologie nach Agenszugabe darstellen. So könnte durch eine Verringerung des Zelldurchmessers aufgrund von Zellstress durch die Agenszugabe eine scheinbare Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration beobachtet werden. Da die Zellen vor, während und nach der Messung auf ihre Morphologie hin kontrolliert wurden, war dieser Effekt unwahrscheinlich.

4.3.5 Temperatur als TRPA1-Aktivator

Die potentielle Aktivierung des TRPA1-Kanals durch Temperatur ist umstritten, die Literatur dementsprechend heterogen. Gerade ältere Quellen stützen diese These (Karashima et al., 2009), neuere Quellen sehen die These von Kälte als alleinigen TRPA1-Aktivator kritischer (Chen et al., 2013). Um eine potentielle thermisch bedingte TRPA1-Aktivierung auszuschließen erfolgte die Vorbereitung und Messung stets bei Raumtemperatur, was $>3^{\circ}\text{C}$ über der postulierten Aktivierungstemperatur von 17°C liegt.

4.3.6 Agenszugabe mittels Eppendorf Pipette

Die Zugabe der Agenzien auf das Messschälchen erfolgte mittels Eppendorf Pipette. Hierbei wurde besonders darauf geachtet mit der Pipettenspitze in die zellbenetzende

Pufferflüssigkeit einzutauchen, jedoch nicht das Glasplättchen mit den adhären Zellen zu berühren. Erfolgte eine Berührung so wurden die Zellen während der Aufzeichnung verrutscht, was eine Auswertung unmöglich machte. Die zugegebenen Agenzien wurden vorsichtig und nicht direkt auf die Zellen pipettiert, um eine mögliche mechanische Aktivierung der TRP-Kanäle zu verhindern (Steinberg et al., 2014). Aus diesem Grunde wurde auch auf die Applikation der Agenzien mit einer Pumpe über ein Schlauchsystem verzichtet. Die Agenzien ließen sich mit der Pipette präziser und in kürzerer Zeit hinzugeben, ohne den Strom direkt auf die Zellen zu richten. Diese Möglichkeit flexibel auf die unregelmäßig mit Zellen bewachsenen Glasplättchen zu reagieren, konnte mit einem Pumpensystem nicht realisiert werden. Erschwerend kam hinzu, dass für das Pumpensystem größere Volumina nötig gewesen wären. Das hätte zum einen eine schnelle Messabfolge mit der Zugabe mehrerer Agenzien erschwert, zum anderen wäre zum Austausch größerer Volumina ein höherer Druck nötig gewesen mit der Gefahr der mechanischen TRP-Kanal Aktivierung.

Darüber hinaus erfolgte stets eine Einstellung des pH-Wertes und der Osmolarität auf physiologische Werte, um eine chemische Aktivierung zu vermeiden (Gonzalez-Ramirez et al., 2017). Des Weiteren wurde aufgrund der unter 4.3.5 genannten Gründe auf das Einhalten der Raumtemperatur geachtet.

Unter Beachtung der oben genannten Punkte waren die Störfaktoren vor, während und nach den Experimenten gering zu halten, weshalb sich die Methode sehr gut eignet, um die Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration zu bestimmen.

4.4 Diskussion der MALDI-TOF Methode

Die Matrix–Assistierte Laser–Desorption–Ionisierung (Veitenhansl et al.) mit der Flugzeitanalyse (engl. time of flight, TOF) ist ein etabliertes Verfahren zur Massenanalyse chemischer Verbindungen (Francese et al., 2009; Karas, 2003). Die vorbereiteten Proben wurden nach Leipzig an Herrn Priv.-Doz. Schiller zur Analyse versendet.

Die Auswertung des Masse zu Ladungsverhältnisses sagt per se nichts über die Zusammensetzung der aufgezeichneten Moleküle aus (Singhal et al., 2015). Es wurden die Auswertungen der unterschiedlichen Inkubationsdauern und die Kontrolle miteinander verglichen. Eine natürliche Limitation der Methode ist der beschränkte

Nachweis Masse/Ladungs-Verhältnissen kleiner Moleküle, da die Methode ursprünglich für die Analyse großer Moleküle entwickelt wurde (Michael Karas, 1985; Signor, 2013; Spickett, 2013). (Vergl. auch http://www.uni-leipzig.de/~biophys/research/dossier/maldi/maldi_long.htm).

Darüber hinaus lassen sich häufig Moleküle nachweisen die in der Prozedur der Proben aus Gefäßen, Pipetten, Kulturschalen etc. gelöst werden (Aldini et al., 2015). Um diese Störgröße möglichst klein zu halten wurde für die Prozedur der MALDI-TOF-Proben Glasflaschen, Glaspipetten und Glasschälchen verwendet. Jedoch ließ sich ein Kontakt mit potentiell reagiblen Oberflächen nicht komplett verhindern, da beispielsweise das verwendete H₂O₂ in einer Plastikflasche geliefert wurde. Deshalb muss erwähnt werden, dass die Peaks in einem Bereich liegen der auch für Subtypen des Antioxidationsmittel Irganox typisch ist. Irganox wird häufig als Antioxidans in Polyethylen verwendet (Katan, 1996; Rabek, 1990). Deshalb wurde der Kontakt mit Polyethylen so weit wie möglich reduziert.

Hierbei zeigte sich keine Verschiebung der Peaks, was gleichbedeutend mit einem unverändertem Masse zu Ladungsverhältnis ist. Deshalb wurde geschlossen, dass weder die Masse noch die Ladung durch eine eventuelle Peroxidation verändert wurde. Bei der nicht detektierbaren Interaktion im Sinne einer Peroxidation durch das applizierte Sauerstoffradikal H₂O₂ mit den Phospholipiden in den Zellmembranen besteht neben einer tatsächlichen fehlenden Interaktion auch die Möglichkeit, dass die Peroxidationsprodukte zu klein für den Nachweis mittels MALDI-TOF sind, da die ursprüngliche Verwendung der Methode der Nachweis großer Moleküle ist (Siehe hierzu: 4.5.8).

4.5 Diskussion der Ergebnisse

Der Ca²⁺-Einstrom *in vitro* und Hyperalgesie *in vivo* durch das oxidierte Phospholipid OxPAPC konnte durch die Präinkubation mit E06 mAb und D-4F signifikant reduziert werden (Oehler et al., 2017). Allerdings ließen die Experimente von Oehler et al. keinen Schluss zu, inwiefern E06 mAb und D-4F spezifisch für bestimmte Epitope von OxPAPC, oder auch gegenüber anderen oxidierten Phospholipiden sind (LPC und 4-HNE). Deshalb wurde in dieser Dissertation die Wirkung von E06 mAb und D-4F auf den durch 4-HNE verursachten Kalziumeinstrom *in vitro* untersucht. Darüber hinaus fand eine Abgrenzung der Spezifität von E06 mAb und D-4F gegenüber H₂O₂ statt.

4.5.1 Kalziueinstrom durch LPC in HEK-293-Zellen

In den Experimenten von Oehler et al erschien in den MALD-TOF Analysen von inflammatorisch veränderten Rattenpfoten regelhaft Lysophosphatidylcholin (LPC), ein Downstreamprodukt der Phospholipidperoxidation durch reaktive Sauerstoffspezies.

Es galt herauszufinden, ob sich der Kalziueinstrom durch E06 mAb und D-4F reduzieren lässt. LPC zeigte in einer dosisabhängigen Weise einen Einstrom von Kalzium unabhängig von der Transfektion der HEK-293-Zelle mit dem TRPA1-Kanal (Abbildung 17). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von (Monet et al., 2009), die eine LPC Konzentration von 10 μ M als Kontrolle an nativen HEK-293-Zellen verwendeten und keinen Kalziueinstrom verzeichneten. Bei den hier gezeigten Messungen reagierten 79 % der untransfizierten Zellen und 76 % der HEK_{TRPA1}-Zellen mit einem Kalziueinstrom auf den LPC Stimulus. Ob dieser Effekt auf eine Schädigung der Zellmembran zurückzuführen ist, bleibt mit der hier verwendeten Methode unbeantwortet.

4.5.2 D-4F und E06 mAb blockieren den durch 4-HNE verursachten Kalziueinstrom in HEK_{TRPA1}-293-Zellen

Im weiteren Verlauf wurde der Fokus der Untersuchungen auf ein anderes, als TRPA1-Aktivator bekanntes Downstreamprodukt der Oxidation von Phospholipiden durch reaktive Sauerstoffspezies gelegt: 4-Hydroxynonenal (Trevisani et al., 2007).

Für *in vitro* Versuche ist bekannt, dass 4-HNE bindungsreaktiv ist und leicht an die zugegebenen Agenzien binden kann (Shoeb et al., 2014), darüber hinaus kann 4-HNE auch *in vivo* OxPL generieren (Mohammadi et al., 2018).

Die Versuche zeigten, dass der durch 4-HNE verursachte Kalziueinstrom durch E06 mAb und D-4F in HEK-293_{TRPA1}-Zellen (Abbildung 7, Abbildung 11) vermindert werden kann.

Basierend auf den Ergebnissen der *in vitro* Messungen wurde postuliert, dass E06 mAb 4-HNE direkt bindet und somit eine Reduktion des Kalziueinflusses bedingt. Die parallel zu den aufgeführten Experimenten in der Arbeitsgruppe durchgeführten *in vivo* Experimente durch Mohammadi et al. konnten diese Annahme jedoch nicht bestätigen. In der Literatur ist bekannt, dass E06 mAb an LDL gebundenes 4-HNE nicht erkennt und bindet (Palinski et al., 1996). Mohammadi *et al.* erweiterten diese

Ergebnisse, indem sie nachwiesen, dass auch freies 4-HNE und 4-HNE-BSA nicht direkt durch E06 mAb gebunden wird.

Um die Ergebnisse der hier vorliegenden *in vitro* Experimente in Einklang mit den *in vivo* Ergebnissen der Arbeitsgruppe zu bringen, wurden indirekte Mechanismen postuliert (Mohammadi et al., 2018). Mohammadi *et al.* konnten in den Pfoten der Versuchstiere eine erhöhte Konzentration von OxPL nachweisen. Das wurde damit erklärt, dass lokale Makrophagen ROS produzieren und damit auch OxPL generieren. Da OxPL ebenfalls sehr reaktiv sind, ist es wahrscheinlich, dass sie ebenfalls zur lokalen Entzündung beitragen. Die entstehenden OxPL gleichen sich nicht in ihrer Reaktionsfreudigkeit. Es entstehen auch OxPL, die oxidationsspezifische Epitope besitzen, an die E06 mAb binden kann. So kann E06 mAb die TRPA1-Aktivierung blockieren (Mohammadi et al., 2018). Darüber hinaus können die reaktionsfreudigen OxPL auch mit der Zellmembran interagieren. Der hydrophobe Teil der OxPL kann in die Zellmembran „eintauchen“, während der reaktionsfreudige hydrophile Teil außerhalb verbleibt. Dieser Vorgang kann funktionale Eigenschaften von Lipiden und Proteinen in und auf der Zellmembran verändern (Stemmer & Hermetter, 2012). So ist denkbar, dass es durch die Veränderung der Zellmembran durch die OxPL zu einer Aktivierung von TRPA1 und sogar TRPV1 kommt (Jansson et al., 2013; Saghy et al., 2015). Mit diesen Experimenten lässt sich der genaue Mechanismus nicht erklären und zeigt weiteren Forschungsbedarf auf.

4.5.3 E06 mAb und D-4F blockieren den Kalziueinstrom über die Interaktion mit OxPL und nicht spezifisch mit H₂O₂

Da die von Oehler et al. beschriebene Herabsetzung der Hyperalgesie *in vivo* auch durch die Interaktion von E06 mAb und D-4F mit den proalgetisch wirkenden ROS bedingt sein könnte, wurde versucht die Spezifität von E06 mAb und D-4F gegenüber H₂O₂ als ROS Vertreter abzugrenzen. Es konnte gezeigt werden, dass in HEK-293^{TRPA1}-Zellen appliziertes H₂O₂ + E06 mAb und die Kontrolle H₂O₂ + IgM eine ähnliche Reduktion des Kalziueinstromes bewirken, sodass der hier gezeigte Effekt wahrscheinlich auf eine unspezifische Reaktion des Oxidationsmittel H₂O₂ zurückzuführen ist. Die Kinetik des Einstroms blieb von den zu untersuchenden Substanzen unbeeinflusst (Abbildung 11).

D-4F bewirkt präinkubiert mit H₂O₂ und auf die HEK-293_{TRPA1}-Zellen appliziert eine deutliche Reduktion des Kalziumeinstromes (Abbildung 12). Wird das Protokoll geändert und die HEK-293_{TRPA1}-Zellen mit D-4F für 5 min. präinkubiert und anschließend H₂O₂ appliziert, so ist keine Reduktion des Kalziumeinstromes festzustellen (Abbildung 12). Aus diesem Sachverhalt kann man auf eine Radikalfängerfunktion von D-4F schließen. D-4F hat mit seinen vielen sauren Aminosäuren (siehe Einleitung) ein großes Potential H⁺-Ionen abzugeben, die mit dem Oxidationsmittel H₂O₂ während der 30 minütigen Inkubationszeit interagieren können (Anantharamaiah et al., 2007). Auf dieser Weise können weniger reaktive H₂O₂ Moleküle in dem zugegebenen Volumen vorhanden sein, was den geringeren Kalziumeinstrom für das präinkubierte H₂O₂ mit D-4F erklären würde.

4.5.4 HC-030031 blockiert nur den durch 4-HNE bedingten Kalziumeinstrom

Um festzustellen, ob der beobachtete Kalziumeinstrom bzw. die Reduktion des Kalziumeinstromes auf eine TRPA1-Aktivierung zurückzuführen ist, wurde der Kanal selektiv blockiert.

Der durch elektrophile Bindung am TRPA1-Kanal bedingte Ca²⁺-Einstrom kann durch die Applikation des TRPA1-spezifischen Blockers HC-030031 blockiert werden (Eid et al., 2008). Der Einstrom von Kalzium durch das oxidierte Phospholipid 4-HNE kann effektiv blockiert werden (Abbildung 8), der H₂O₂-verursachte Einstrom hingegen nicht (Abbildung 13).

Anfang 2015 wurde die Struktur mit Bindungsstellen für den TRPA1-Kanal veröffentlicht. Hier zeigte sich, dass es für elektrophile und nicht-elektrophile (nukleophil) TRPA1-Agonisten unterschiedliche Bindungsstellen gibt (Paulsen et al., 2015a). Da 4-HNE als Oxidationsprodukt von PAPC, ähnlich wie OxPAPC elektrophil ist, ist die Blockierung des Ca²⁺-Einstromes durch HC-030031 gut zu erklären (Abbildung 8). H₂O₂ ist aufgrund seiner freien Elektronenpaare reaktiv und gilt als nukleophil (elektrophob) (Kimball et al., 1993). Deshalb kann es nicht an der elektrophilen Bindungsstelle angreifen (Paulsen et al., 2015a) und ist als Konsequenz nicht durch den Blocker HC-030031 blockierbar (Abbildung 13). H₂O₂ besitzt jedoch die Fähigkeit auch über die Bindung an andere Cystein- und Lysin-Reste den TRPA1-Kanal zu aktivieren (Kashio & Tominaga, 2017). 2016 konnten Gupta *et al.* den

Cysteinrest N855 des TRPA1-Kanals als Essentiell für eine Inhibition durch HC-030031 beschreiben (Gupta et al., 2016)

4.5.5 Keine nachweisbare Interaktion zwischen E06 mAb und D-4F mit dem TRPV1-Aktivator Capsaicin

Um die Ergebnisse aus den mit TRPA1-transfizierten Model-HEK-293-Zellen auf nativ TRPA1-exprimierende Zellen des peripheren Nervensystems übertragen zu können, wie die hier verwendeten spinalen DRGs, musste ausgeschlossen werden, dass eine Interaktion zwischen E06 mAb oder D-4F mit dem hier verwendeten Aktivator der co-exprimierten TRPV1-Kanälen in sensiblen Spinalganglienzellen von C57BL/6-Mäusen, besteht. Beide Kanäle werden auf DRGs exprimiert und interagieren miteinander (Staruschenko et al., 2010). Die vorliegenden Daten schließen eine mit dieser Methode zu detektierende Interaktion der zu untersuchenden Substanzen mit dem TRPV1-Aktivator Capsaicin aus (Abbildung 16), sodass die Experimente auf DRGs übertragen werden konnten.

4.5.6 D-4F und E06 mAb blockieren den durch 4-HNE hervorgerufenen Kalziumeinstrom in sensiblen Spinalganglienzellen

Hier war, ähnlich der HEK-293_{TRPA1}-Ergebnisse, eine durch E06 mAb und D-4F verursachte, deutliche Reduktion des Kalziumeinstrom in DRGs festzustellen (Abbildung 14, Abbildung 15). Dieser Effekt ist wie unter 4.5.2 beschrieben am ehesten mit indirekten Mechanismen zu erklären (Mohammadi et al., 2018). Die so *in vitro* beschriebenen Reduktion des Kalziumeinstromes geht auch *in vivo* mit einer Reduktion der Hyperalgesie einher ((Mohammadi et al., 2018; Oehler et al., 2017; Trevisani et al., 2007)

4.5.7 D-4F und E06 mAb blockieren den durch H₂O₂ hervorgerufenen Kalziumeinstrom in DRGs nicht spezifisch

In den Experimenten mit HEK-293_{TRPA1}-Zellen konnte keine spezifische Interaktion zwischen H₂O₂ und E06 mAb bzw. D-4F nachgewiesen werden. In DRGs ist lediglich eine signifikante Reduktion der Anzahl der reagierenden Zellen für das präinkubierte H₂O₂ mit E06 mAb festzustellen, jedoch keine signifikante Reduktion der Fläche unter der Kurve. Die repräsentativen Abbildungen, welche den Kalziumeinstrom während der Messungen darstellen (Abbildung 14A, B, C), zeigen dass es nach der Zugabe von H₂O₂, H₂O₂ + IgM und H₂O₂ + E06 mAb eine kontinuierliche Aktivierung mit einem kontinuierlichen Kalziumeinstrom gibt. Ähnlich verhält es sich für das präinkubierte H₂O₂ und D-4F. Auch hier fällt in den Abbildungen des Kalziumeinstroms eine kontinuierliche Aktivierung nach Zugabe von H₂O₂ oder H₂O₂ + D-4F auf (Abbildung 15A, B). Diese kontinuierliche Aktivierung fällt aber bei dem präinkubierten H₂O₂ + D-4F deutlich geringer aus. Dies stützt die oben genannte Annahme, dass D-4F während der Inkubationszeit als Radikalfänger fungiert und somit weniger reaktive H₂O₂ Moleküle im Zugabevolumen vorhanden sind. Dieser Effekt scheint so groß zu sein, dass sich, trotz kontinuierlicher Aktivierung, eine signifikante Reduktion der Fläche unter der Kurve und die Anzahl der reagierenden Zellen beobachten lässt.

Warum lässt sich der durch H₂O₂ hervorgerufene Kalziumeinstrom nicht durch E06 mAb blockieren? Grundsätzlich muss man hervorheben, dass H₂O₂ nicht nur TRPA1 und TRPV1 aktivieren kann (Keeble et al., 2009), sondern auch andere Kanäle wie z.B. TRPM2 und TRPC5 (Andersson et al., 2008; DelloStritto et al., 2016; Naylor et al., 2011).

Die Aktivierung des TRPA1-Kanals kann über verschiedene Mechanismen stattfinden. Zum einen kann H₂O₂ den TRPA1-Kanal über eine Bindung an Cystein- und Lysinreste aktivieren (direkte Aktivierung) (Kashio & Tominaga, 2017). Darüber hinaus gibt es aber auch indirekte Wege, z.B. über die Generierung von TRPA1-aktivierenden Downstreamprodukten der Lipidoxidation wie OxPAPC oder 4-HNE (Oehler et al., 2017) oder die Hochregulierung der Expression von proinflammatorischen Cytokinen und Chemokinen (Chung et al., 2015; Keeble et al., 2009). Die direkte Aktivierung

findet unabhängig von OxPL statt und kann deshalb nicht durch E06 mAb blockiert werden.

4.5.8 Kein Nachweis einer Lipidperoxidation der Zellmembran durch H₂O₂

Da die Möglichkeit besteht, dass die H₂O₂ Moleküle mit den Phospholipiden in den Zellmembranen interagieren und so reaktive oxidierte Phospholipide entstehen, wurden die MALDI-TOF-Experimente durchgeführt. Diese Hypothese wird vor allem durch die beobachtete kontinuierliche Aktivierung in DRGs nach der Zugabe von H₂O₂ gestützt. Hierbei war eine kontinuierliche Aktivierung der TRPA1-Kanäle durch oxidierten Lipide aus den Zellmembranen denkbar. Zusätzlich erscheinen *in vivo* OxPL regelhaft beim Auftreten von ROS, was die Annahme weiter untermauerte (Oehler et al., 2017).

Die MALDI-TOF Analysen lassen keine Rückschlüsse über die Zusammensetzung der detektierten Moleküle zu, sondern nur über das Masse zu Ladungsverhältnis (Singhal et al., 2015). Es wurden die Auswertungen der unterschiedlichen Inkubationsdauern und die Kontrolle miteinander verglichen. Hierbei konnten Moleküle mit dem Masse zu Ladungsverhältnis von 663 m/z und 685 m/z nachgewiesen werden. Das entspricht dem Masse zu Ladungsverhältnis von ungesättigten Fettsäuren, wie sie in Zellmembranen vorkommen (Oehler et al., 2017). Da die Peaks über die Messungen konstant blieben, fand keine Änderung der Masse oder Ladung statt. Das widerspricht der Hypothese, dass H₂O₂ die Membranlipide oxidiert und OxPL entstehen, oder sich die OxPL aufgrund der geringen Größe der Detektion entziehen.

Die Methode wurde ursprünglich für die Analyse großer Moleküle entwickelt (Michael Karas, 1985; Signor, 2013; Spickett, 2013), deshalb entziehen sich kleinere Moleküle wie H₂O₂ aber auch 4-HNE oder andere Endprodukte der Lipidoxidation der Detektion. Ein weiterer kritischer Punkt ist die Tatsache, dass sich häufig Moleküle nachweisen lassen, die in der Prozedur der Proben aus Gefäßen, Pipetten, Kulturschalen etc. gelöst werden (Aldini et al., 2015).

Die nachgewiesenen Moleküle mit dem Masse zu Ladungsverhältnis von 663 m/z und 685 m/z können darüber hinaus den als Antioxidantien in der Verarbeitung von Polymeren verwendeten Antioxidantien Irganox (verschiedene Subtypen) entsprechen (Katan, 1996; Rabek, 1990). Hierbei ist nicht auszuschließen, dass die Substanzen durch das verwendete Chloroform aus den Polyethylen-haltigen Aufbewahrungsbehältern

gelöst wurden. Auch eine Verwendung der nachgewiesenen Moleküle als von Werk aus zugesetzte Stabilisatoren ist denkbar. Da diese Limitation bekannt ist, wurde im Verarbeitungsprozess der Proben auf Glasflaschen, Glaspipetten und Glasschälchen zurückgegriffen, die kein Polyethylen enthalten. Jedoch ließ sich ein Kontakt mit potentiell reagiblen Oberflächen nicht komplett verhindern, da beispielsweise das verwendete H_2O_2 in einer Polyethylen-haltigen Flasche geliefert wurde. Trotz des sorgsamsten Umganges mit den bekannten Limitationen konnten keine durch H_2O_2 oxidierte Phospholipide nachgewiesen werden. Da mit diesem Versuch nicht geklärt werden konnte, wie der kontinuierliche Kalziumeinstrom durch H_2O_2 in DRGs zustande kommt, besteht hier weiterer Forschungsbedarf.

4.5.9 Schaubild der zusammenfassenden Einordnung der Ergebnisse im Bezug auf die aktuelle Literatur

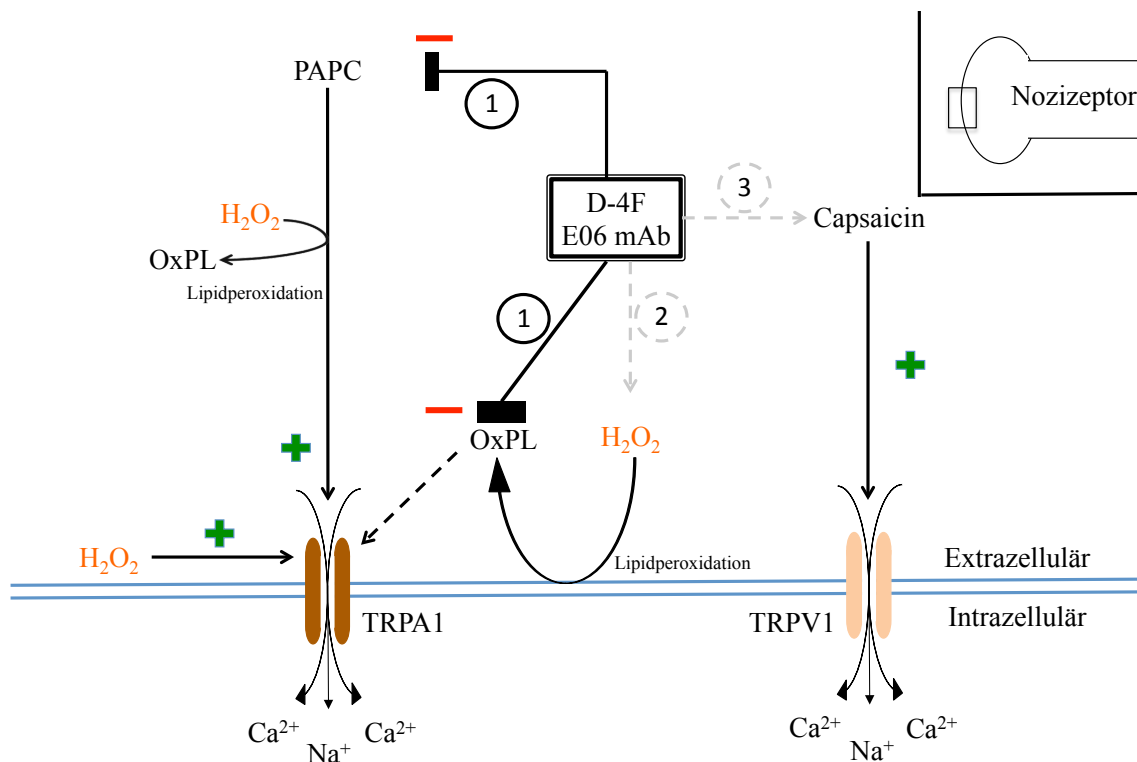


Abbildung 20: Einordnung der Ergebnisse vor dem Hintergrund aktueller Forschungsergebnisse. Nachgewiesene und postulierte Reaktionswege werden schwarz dargestellt, keine Interaktion hingegen grau. D-4F und E06 mAb blockieren die TRPA-1 Aktivierung über die Interaktion mit PAPC und den durch die Lipidperoxidation generierten OxPL. Keine spezifische Bindung von D-4F und E06 mAb an H_2O_2 (2) und keine Interaktion mit Capsaicin (3). Die indirekte Generierung von blockierbaren OxPL durch 4-HNE ist nicht dargestellt.

4.5.10 Verifizierung der Hypothesen anhand der Ergebnisse

1. E06 mAb und D-4F blockieren nicht nur die Funktion TRPA1-aktivierender oxidierte Phospholipide wie OxPAPC, sondern auch deren Lipidoxidations-downstreamprodukte wie 4-HNE.
2. Die von Oehler et al. und Mohammadi et al. *in vivo* gezeigte Reduktion der entzündlichen Hyperalgesie durch D-4F und E06 mAb findet über eine Interaktion mit OxPL statt und nicht über eine direkte Interaktion mit TRPA1-aktivierenden ROS.
3. E06 mAb und D-4F haben keinen Einfluss auf die Capsaicin-evozierte Aktivierung von TRPV1.
4. Die TRPA1-Aktivierung durch H_2O_2 findet *in vitro* auch durch oxidierte Membranphospholipide statt.

In den Experimenten dieser Dissertation wurde gezeigt, dass das bei der Peroxidation von Phospholipiden entstehende Downstreamprodukt 4-HNE in HEK-293_{TRPA1}-Zellen einen Kalziumeinstrom verursacht. Dieser Einstrom ist durch den TRPA1-spezifischen Blocker HC-030031 blockierbar. Sowohl D-4F als auch E06 mAb reduzieren *in vitro* signifikant den durch 4-HNE hervorgerufenen Kalziumeinstrom, wenn die Substanzen vor der Applikation präinkubiert werden. Um die Experimente auf dorsale Spinalganglien (DRG) von C57BL/6-Mäusen übertragen zu können, wurden Interaktionen von E06, IgM und D-4F mit dem Aktivator Capsaicin von auf DRGs co-exprimierten TRPV1 Kanälen ausgeschlossen. In den DRGs konnte analog zu den transfizierten HEK-293-Zellen eine signifikante Reduktion des Kalziumeinstromes nachgewiesen werden. Auf diese Weise konnten die Hypothesen **1.** und **3.** bestätigt werden.

Um Hypothese **2.** verifizieren zu können wurden die Experimente analog zu den mit 4-HNE durchgeführten Experimenten, mit einem Vertreter der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durchgeführt: H_2O_2 . Hierbei zeigte sich in den mit TRPA1-transfizierten HEK-293-Zellen keine spezifische Reduktion des Kalziumeinstromes. Für die Zugabe von präinkubierten H_2O_2 +D-4F auf HEK-293_{TRPA1} konnte eine signifikante Reduktion des Kalziumeinstromes beobachtet werden. Der Effekt ließ sich jedoch nicht nachweisen, wenn man die transfizierten Zellen mit D-4F präinkubiert und anschließend H_2O_2

hinzugibt. Deshalb scheint die Reduktion des Kalziumeinstromes durch D-4F über eine „Radikalfängerfunktion“ bedingt zu sein.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die gezeigte Reduktion der entzündlichen Hyperalgesie durch D-4F und E06 mAb *in vivo* (Oehler et al., 2017) über eine Interaktion mit OxPL stattfindet und nicht über eine direkte Interaktion mit TRPA1-aktivierenden ROS. Somit konnte die Hypothese **2**. bestätigt werden.

Durch die MALDI-TOF-Analysen konnte, am ehesten versuchsaufbaubedingt, keine Lipidperoxidation der Membranlipide durch H₂O₂ nachgewiesen werden. Da es aber, neben der direkten TRPA1 Aktivierung durch ROS, für den postulierten Weg der Hypothese **4** in der Literatur Hinweise gibt (Mohammadi et al., 2018), besteht hier weiterhin Forschungsbedarf (Locke et al.).

Aus den oben genannten Gründen erscheinen E06 mAb und ApoA-I D-4F als zwei vielversprechende Substanzen, um die molekularen Abläufe des nozizeptiven Schmerzes weitergehend zu verstehen und eventuell sogar verringern zu können. Gerade als potentiell Analgetikum für eine nebenwirkungsärmere, lokale Schmerzbekämpfung scheinen D-4F (Bloedon et al., 2008; Nissen et al., 2003; Tardif et al., 2007) und E06 mAb (Bigal et al., 2015a; Bigal et al., 2015b; Kivitz et al., 2013) vielversprechend.

5 Zusammenfassung

Die in der vorliegenden Dissertationsschrift durchgeführten Experimente sollen dazu beitragen, die mechanistischen Zusammenhänge der nozizeptiven Schmerzentsstehung im entzündlichen Schmerz genauer zu verstehen. Die Vorarbeiten zeigten, dass ApoA-I mimetisches Peptid D-4F und der monoklonale Antikörper E06 einen durch OxPAPC verursachten und somit für die Schmerzentsstehung notwendigen Kalziumeinstrom reduzieren können. Die hier durchgeführten Experimente sollten die Ergebnisse von Oehler et al. ergänzen. In den Calcium-Imaging Experimenten konnte an mit TRPA1 transfizierten HEK-293 Zellen und DRGs von C57BL/6 Mäusen nachgewiesen werden, dass D-4F und E06 mAb den durch Lipidperoxidationsprodukte wie 4-HNE und den durch H_2O_2 bedingten, TRPA1-vermittelten Kalziumeinstrom vermindern. Die MALDI-TOF Analysen konnten keine Peroxidationsprodukte von Membranphospholipiden durch H_2O_2 detektieren. Allerdings gab es starke Hinweise darauf, dass dennoch eine Lipidperoxidation mit anschließender TRPA1-Aktivierung stattfindet. Hier zeigt sich weiterer Forschungsbedarf. In den parallel zu diesen Experimenten durchgeführten *in vivo* Experimenten von Mohammadi et al. konnte die Hyperalgesie durch E06 mAb verringert werden. Hierbei wurde ebenfalls nachgewiesen, dass E06 mAb 4-HNE nicht direkt bindet. Die von Mohammadi et al. postulierte Lipidperoxidation der Membranphospholipide durch H_2O_2 bzw. 4-HNE, lässt verschiedene OxPL entstehen die sich in Ihrer Bindungsaffinität gegenüber E06 mAb und D-4F deutlich unterscheiden. Aus diesem Grunde kann angenommen werden, dass die beobachtete Verringerung des Kalziumeinstromes auf indirekten Mechanismen wie der Blockade von neu generierten OxPL mit einer höherer Bindungsaffinität gegenüber E06 mAb aus den Phospholipiden oder Zellmembran basiert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden dass weder E06 mAb noch D-4F eine Interaktion mit dem TRPV1-Aktivator Capsaicin aufweisen. Aus den oben genannten Gründen erscheinen E06 mAb und ApoA-I mimetisches Peptid D-4F als zwei vielversprechende Substanzen, um die molekularen Abläufe des nozizeptiven Schmerzes weitergehend zu verstehen und eventuell sogar verringern zu können. Auch als potentielles Analgetikum für eine nebenwirkungsärmere, lokale Schmerzbekämpfung scheinen D-4F und E06 mAb vielversprechend.

6 Literatur- und Abbildungsverzeichnis

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 5: Abkürzungsverzeichnis

4-HNE	4-Hydroxynonenal
AITC	Allylisothiocyanat
D-4F	Apolipoprotein A-I-mimetisches Peptid D-4F
ApoE	Apolipoprotein E
AUC	Area under curve
BSA	Bovine serum albumin
C57BL/6	C57 black /6
Ca ²⁺	Kalzium
Caps	Capsaicin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DRG	Dorsal root ganglion
FBS	Fetal Bovine Serum
Fe ²⁺	Eisen
Fura-2/AM	Fura-2/ Acetoxymethylester
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HDL	High Density Lipoprotein
HEK-293	Human Embryonic Kidney
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IASP	Association for the Study of Pain
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium
KCl	Kaliumchlorid
(V)LDL	(Very) Low Density Lipoprotein
LPC	Lysophosphatidylcholin

mAb	monoklonaler Antikörper
MALDI-TOF	Matrix–Assistierte Laser–Desorption– Ionisierung mit Flugzeitanalyse (engl. time of flight, TOF)
min	Minute
Mg ²⁺	Magnesium
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid- Phosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NGF	Nerve growth factor
O ₂ ^{·-}	Superoxidanionen
OH [·]	Hydroxylradikalen
OxLDL	Oxidiertes Low Density Lipoprotein
OxPAPC	1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3- phosphocholin
OxPL	oxidierten Phospholipide
P/S	Penicillin/Streptomycin
Procc.	Processi
ROI	Region of Interest
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
TRPA1	Transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1
TRPC5	Transient receptor potential cation channel subfamily C member 5
TRPM2	Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2
TRPV1	Transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1
UV-A Strahlung	Ultraviolett-A Strahlung

6.2 Abbildungsverzeichnis

Für alle Abbildungen mit Ausnahme von Abbildung 3 und Abbildung 4 liegen die Rechte der Bilder beim Autor dieser Dissertation. Für Abbildung 3 (License number: 4293650501543) und Abbildung 4 (License number: 4293630437545) liegen die entsprechenden Abdruckgenehmigungen des Verlages vor.

Abbildung 1: Illustration der Hypothesen.....	8
Abbildung 2: Exemplarisch dargestellte DRGs nach Anzüchtung auf Coverslip in Nährmedium.	14
Abbildung 3: Ratiometrisch-kalziumsensitiver Farbstoff FURA-2/AM	15
Abbildung 4: Abhängigkeit der Fluoreszenz von Fura-2 von der Anregungswellenlänge.	16
Abbildung 5: Stark vereinfachter Versuchsaufbau der MALDI-TOF Analyse..	21
Abbildung 6: E06 mAb verringert den durch 4-HNE bedingten Kalziumeinstrom in HEK-293 _{TRPA1} -Zellen.	29
Abbildung 7: Der durch 4-HNE verursachte Kalziumeinstrom in HEK-293 _{TRPA1} -Zellen lässt sich durch D-4F verringern.	31
Abbildung 8: Der durch 4-HNE verursachte Kalziumeinstrom lässt sich durch den TRPA1-Blocker HC-030031 in HEK-293 _{TRPA1} -Zellen blockieren.	33
Abbildung 9: In spinalen Hinterwurzelganglienzellen von Mäusen verringert sich der durch 4-HNE verursachte Kalziumeinstrom durch E06 mAb.....	35
Abbildung 10: D-4F verringert den durch 4-HNE hervorgerufenen Kalziumeinstrom in sensiblen Spinalganglienzellen von Mäusen.	37
Abbildung 11: E06 mAb und IgM reduzieren den durch H ₂ O ₂ bedingten Ca ²⁺ -Einstrom in TRPA1-transfizierte HEK-293 Zellen.....	39
Abbildung 12: D-4F verringert den durch H ₂ O ₂ verursachten Ca ²⁺ Einstrom in HEK-293 _{TRPA1} Zellen.	41
Abbildung 13: Der Effekt von H ₂ O ₂ auf mit TRPA1-transfizierten HEK-293-Zellen lässt sich nicht durch HC-030031 blockieren.....	43
Abbildung 14: E06 mAb verringert die Anzahl der reagierenden spinalen Hinterwurzelganglienzellen von Mäusen, nicht aber den quantitativen Ca ²⁺ -Einstrom.....	45

Abbildung 15: D-4F verringert den durch H ₂ O ₂ bedingten Ca ²⁺ -Einstrom in spinalen Hinterwurzelganglienzellen von Mäusen	47
Abbildung 16: D-4F und E06 mAb verringern den durch Capsaicin bedingten Kalziumeinstrom in HEK-293 _{TRPV1} -Zellen nicht.	49
Abbildung 17: Konzentrationsabhängiger Anstieg des Kalziumeinstromes durch Lysophosphatidylcholin (LPC) in HEK-293 und HEK-293 _{TRPA1} -Zellen.....	51
Abbildung 18: Keine nachweisbare Lipidperoxidation der Membranphospholipide von HEK-293-Zellen nach 3 bzw. 15 min Inkubation mit H ₂ O ₂	52
Abbildung 19: Zusammenfassung der Ergebnisse.	54
Abbildung 20: Einordnung der Ergebnisse vor dem Hintergrund aktueller Forschungsergebnisse.	66

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Materialien Zellkultur.....	23
Tabelle 2: Materialien Spinalganglienpräparation und -kultivierung.....	24
Tabelle 3: Materialien Kalzium Imaging.....	25
Tabelle 4: Sonstige verwendete Messgeräte, Materialien und Software.....	27
Tabelle 5: Abkürzungsverzeichnis	70

6.4 Literaturverzeichnis

Aldini G, Domingues MR, Spickett CM, Domingues P, Altomare A, Sanchez-Gomez FJ, *et al.* (2015). Protein lipoxidation: Detection strategies and challenges. *Redox biology* 5: 253-266.

Anantharamaiah GM, Jones JL, Brouillette CG, Schmidt CF, Chung BH, Hughes TA, *et al.* (1985). Studies of synthetic peptide analogs of the amphipathic helix. Structure of complexes with dimyristoyl phosphatidylcholine. *The journal of biological chemistry* 260: 10248-10255.

Anantharamaiah GM, Mishra VK, Garber DW, Datta G, Handattu SP, Palgunachari MN, *et al.* (2007). Structural requirements for antioxidative and anti-inflammatory properties of apolipoprotein A-I mimetic peptides. *Journal of lipid research* 48: 1915-1923.

Andersson DA, Gentry C, Moss S, & Bevan S (2008). Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *The journal of neuroscience: the official journal of the society for neuroscience* 28: 2485-2494.

Ayala A, Munoz MF, & Arguelles S (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2014: 360438.

Becker PL, & Fay FS (1987). Photobleaching of fura-2 and its effect on determination of calcium concentrations. *The american journal of physiology* 253: C613-618.

Bigal ME, Dodick DW, Rapoport AM, Silberstein SD, Ma Y, Yang R, *et al.* (2015a). Safety, tolerability, and efficacy of TEV-48125 for preventive treatment of high-frequency episodic migraine: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b study. *Lancet neurology* 14: 1081-1090.

Bigal ME, Edvinsson L, Rapoport AM, Lipton RB, Spierings EL, Diener HC, *et al.* (2015b). Safety, tolerability, and efficacy of TEV-48125 for preventive treatment of chronic migraine: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b study. *Lancet neurology* 14: 1091-1100.

Binder CJ, Horkko S, Dewan A, Chang MK, Kieu EP, Goodyear CS, *et al.* (2003). Pneumococcal vaccination decreases atherosclerotic lesion formation: molecular mimicry between streptococcus pneumoniae and oxidized LDL. *Nature medicine* 9: 736-743.

Binder CJ, Papac-Milicevic N, & Witztum JL (2016). Innate sensing of oxidation-specific epitopes in health and disease. *Nature reviews immunology* 16: 485-497.

Bloedon LT, Dunbar R, Duffy D, Pinell-Salles P, Norris R, DeGroot BJ, *et al.* (2008). Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of oral apoA-I mimetic peptide D-4F in high-risk cardiovascular patients. *Journal of lipid research* 49: 1344-1352.

Brack A, Labuz D, Schiltz A, Rittner HL, Machelska H, Schafer M, *et al.* (2004). Tissue monocytes/macrophages in inflammation: hyperalgesia versus opioid-mediated peripheral antinociception. *Anesthesiology* 101: 204-211.

Buga GM, Frank JS, Mottino GA, Hakhamian A, Narasimha A, Watson AD, *et al.* (2008). D-4F reduces EO6 immunoreactivity, SREBP-1c mRNA levels, and renal inflammation in LDL receptor-null mice fed a western diet. *Journal of lipid research* 49: 192-205.

Chen J, & Hackos DH (2015). TRPA1 as a drug target--promise and challenges. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 388: 451-463.

Chen J, Kang D, Xu J, Lake M, Hogan JO, Sun C, *et al.* (2013). Species differences and molecular determinant of TRPA1 cold sensitivity. *Nature communications* 4: 2501.

Chung MK, Asgar J, Lee J, Shim MS, Dumler C, & Ro JY (2015). The role of TRPM2 in hydrogen peroxide-induced expression of inflammatory cytokine and chemokine in rat trigeminal ganglia. *Neuroscience* 297: 160-169.

de Oliveira-Junior EB, Bustamante J, Newburger PE, & Condino-Neto A (2011). The human NADPH oxidase: primary and secondary defects impairing the respiratory burst function and the microbicidal ability of phagocytes. *Scandinavian journal of immunology* 73: 420-427.

DelloStritto DJ, Connell PJ, Dick GM, Fancher IS, Klarich B, Fahmy JN, *et al.* (2016). Differential regulation of TRPV1 channels by H₂O₂: implications for diabetic microvascular dysfunction. *Basic research in cardiology* 111: 21.

Eid SR, Crown ED, Moore EL, Liang HA, Choong KC, Dima S, *et al.* (2008). HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity. *Molecular pain* 4: 48.

Esterbauer H, Schaur RJ, & Zollner H (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical biology and medicine* 11: 81-128.

Faria-Neto JR, Chyu KY, Li X, Dimayuga PC, Ferreira C, Yano J, *et al.* (2006). Passive immunization with monoclonal IgM antibodies against phosphorylcholine reduces accelerated vein graft atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Atherosclerosis* 189: 83-90.

Foley JF (2013). Focus issue: understanding mechanisms of inflammation. *Science signaling* 6: eg2.

Francesse S, Dani FR, Traldi P, Mastrobuoni G, Pieraccini G, & Moneti G (2009). MALDI mass spectrometry imaging, from its origins up to today: the state of the art. *Combinatorial chemistry & high throughput screening* 12: 156-174.

Gangadharan V, & Kuner R (2013). Pain hypersensitivity mechanisms at a glance. *Disease models & mechanisms* 6: 889-895.

Getz GS, & Reardon CA (2014). The structure/function of apoprotein A-I mimetic peptides: an update. *Current opinion in endocrinology, diabetes and obesity* 21: 129-133.

Gonzalez-Ramirez R, Chen Y, Liedtke WB, & Morales-Lazaro SL (2017). TRP channels and pain. In *neurobiology of TRP channels*. eds nd, & Emir T.L.R.: Boca Raton (FL), pp 125-147.

Goswami C, & Islam MS (2010). Transient Receptor Potential channels: What's happening? Reflections in the wake of the 2009 TRP meeting, Karolinska Institutet, Stockholm. *Channels* 4: 124-135.

Grynkiewicz G, Poenie M, & Tsien RY (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *The journal of biological chemistry* 260: 3440-3450.

Gualandri V, Orsini GB, Cerrone A, Franceschini G, & Sirtori CR (1985). Familial associations of lipids and lipoproteins in a highly consanguineous population: the Limone sul Garda study. *Metabolism* 34: 212-221.

Gupta R, Saito S, Mori Y, Itoh SG, Okumura H, & Tominaga M (2016). Structural basis of TRPA1 inhibition by HC-030031 utilizing species-specific differences. *Scientific reports* 6: 37460.

Haider L, Fischer MT, Frischer JM, Bauer J, Hoftberger R, Botond G, *et al.* (2011). Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain* 134: 1914-1924.

Handa JT, Tagami M, Ebrahimi K, Leibundgut G, Janiak A, Witztum JL, *et al.* (2015). Lipoprotein(A) with an intact lysine binding site protects the retina from an age-related macular degeneration phenotype in mice (An american ophthalmological society thesis). *Transactions of the american ophthalmological society* 113: T5.

Hill K, & Schaefer M (2009). Ultraviolet light and photosensitising agents activate TRPA1 via generation of oxidative stress. *Cell calcium* 45: 155-164.

Jansson ET, Trkulja CL, Ahemaiti A, Millingen M, Jeffries GD, Jardemark K, *et al.* (2013). Effect of cholesterol depletion on the pore dilation of TRPV1. *Molecular pain* 9: 1.

Karas M (2003). Ion formation in MALDI: The cluster ionization mechanism. *Chemical reviews*: 427-440.

Karashima Y, Talavera K, Everaerts W, Janssens A, Kwan KY, Vennekens R, *et al.* (2009). TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* 106: 1273-1278.

Kashio M, & Tominaga M (2017). Redox-Sensitive TRP Channels: TRPA1 and TRPM2, redox - principles and advanced applications. InTech.

Katan L (1996) *Migration From Food Contact Materials* Blackie Academic & Professional, an imprint of Chapman & Hall.

Keeble JE, Bodkin JV, Liang L, Wodarski R, Davies M, Fernandes ES, *et al.* (2009). Hydrogen peroxide is a novel mediator of inflammatory hyperalgesia, acting via transient receptor potential vanilloid 1-dependent and independent mechanisms. *Pain* 141: 135-142.

Kimball AS, Lee J, Jayaram M, & Tullius TD (1993). Sequence-specific cleavage of DNA via nucleophilic attack of hydrogen peroxide, assisted by F1p recombinase. *Biochemistry* 32: 4698-4701.

Kivitz AJ, Gimbel JS, Bramson C, Nemeth MA, Keller DS, Brown MT, *et al.* (2013). Efficacy and safety of tanezumab versus naproxen in the treatment of chronic low back pain. *Pain* 154: 1009-1021.

- Klikovits T, Stockhammer P, Laszlo V, Dong Y, Hoda MA, Ghanim B, *et al.* (2017). Circulating complement component 4d (C4d) correlates with tumor volume, chemotherapeutic response and survival in patients with malignant pleural mesothelioma. *Scientific reports* 7: 16456.
- Kobayashi K, Matsuura E, Liu Q, Furukawa J, Kaihara K, Inagaki J, *et al.* (2001). A specific ligand for beta(2)-glycoprotein I mediates autoantibody-dependent uptake of oxidized low density lipoprotein by macrophages. *Journal of lipid research* 42: 697-709.
- Labos C, & Thanassoulis G (2018). Genetic risk prediction for primary and secondary prevention of atherosclerotic cardiovascular disease: an update. *Current cardiology reports* 20: 36.
- Locke AE, Kahali B, Berndt SI, Justice AE, Pers TH, Day FR, *et al.* (2015). Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature* 518: 197-206.
- Mallika V, Goswami B, & Rajappa M (2007). Atherosclerosis pathophysiology and the role of novel risk factors: a clinicobiochemical perspective. *Angiology* 58: 513-522.
- Marchand F, Perretti M, & McMahon SB (2005). Role of the immune system in chronic pain. *Nature reviews neuroscience* 6: 521-532.
- Matt U, Sharif O, Martins R, Furtner T, Langeberg L, Gawish R, *et al.* (2013). WAVE1 mediates suppression of phagocytosis by phospholipid-derived DAMPs. *The journal of clinical investigation* 123: 3014-3024.
- McCann SK, & Roulston CL (2013). NADPH oxidase as a therapeutic target for neuroprotection against ischaemic stroke: future perspectives. *Brain sciences* 3: 561-598.
- Michael Karas DB, Franz Hillenkamp (1985). Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *analytical chemistry* 57: 2935–2939.
- Mohammadi M, Oehler B, Kloka J, Martin C, Brack A, Blum R, *et al.* (2018). Antinociception by the anti-oxidized phospholipid antibody E06. *British journal of pharmacology* (in revision).
- Monet M, Gkika D, Lehen'kyi V, Pourtier A, Vanden Abeele F, Bidaux G, *et al.* (2009). Lysophospholipids stimulate prostate cancer cell migration via TRPV2 channel activation. *Biochimica et biophysica acta* 1793: 528-539.
- Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, Hama S, Hough G, Grijalva VR, *et al.* (2005). Apolipoprotein A-I mimetic peptides. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25: 1325-1331.

- Naylor J, Al-Shawaf E, McKeown L, Manna PT, Porter KE, O'Regan D, *et al.* (2011). TRPC5 channel sensitivities to antioxidants and hydroxylated stilbenes. *The journal of biological chemistry* 286: 5078-5086.
- Nicholls SJ, Tuzcu EM, Sipahi I, Grasso AW, Schoenhagen P, Hu T, *et al.* (2007). Statins, high-density lipoprotein cholesterol, and regression of coronary atherosclerosis. *Journal of the american medical association* 297: 499-508.
- Nissen SE, Tsunoda T, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Cooper CJ, Yasin M, *et al.* (2003). Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *Journal of the american medical association* 290: 2292-2300.
- Oehler B, Kistner K, Martin C, Schiller J, Mayer R, Mohammadi M, *et al.* (2017). Inflammatory pain control by blocking oxidized phospholipid-mediated TRP channel activation. *Scientific reports* 7: 5447.
- Palinski W, Horkko S, Miller E, Steinbrecher UP, Powell HC, Curtiss LK, *et al.* (1996). Cloning of monoclonal autoantibodies to epitopes of oxidized lipoproteins from apolipoprotein E-deficient mice. Demonstration of epitopes of oxidized low density lipoprotein in human plasma. *The journal of clinical investigation* 98: 800-814.
- Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W, & Lechleiter JD (2008). Chemical calcium indicators. *Methods* 46: 143-151.
- Paulsen CE, Armache JP, Gao Y, Cheng Y, & Julius D (2015a). Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. *Nature* 525: 552.
- Paulsen CE, Armache JP, Gao Y, Cheng Y, & Julius D (2015b). Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. *Nature* 520: 511-517.
- Pospisil P (2012). Molecular mechanisms of production and scavenging of reactive oxygen species by photosystem II. *Biochimica et biophysica acta* 1817: 218-231.
- Rabek J (1990) *Photostabilization of polymers*. Elsevier applied science: Crown house, Linton Road, Barking, Essex IG11 8JU, England.
- Ramsey IS, Delling M, & Clapham DE (2006). An introduction to TRP channels. *Annual review of physiology* 68: 619-647.
- Rather LJ (1971). Disturbance of function (functio laesa): the legendary fifth cardinal sign of inflammation, added by Galen to the four cardinal signs of Celsus. *Bulletin of the New York academy of medicine* 47: 303-322.
- Rittner HL, Mousa SA, Labuz D, Beschmann K, Schafer M, Stein C, *et al.* (2006). Selective local PMN recruitment by CXCL1 or CXCL2/3 injection does not cause inflammatory pain. *Journal of leukocyte biology* 79: 1022-1032.

Ross R, & Glomset JA (1976). The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *The new england journal of medicine* 295: 369-377.

Saghy E, Szoke E, Payrits M, Helyes Z, Borzsei R, Erostyak J, *et al.* (2015). Evidence for the role of lipid rafts and sphingomyelin in Ca²⁺-gating of transient receptor potential channels in trigeminal sensory neurons and peripheral nerve terminals. *Pharmacological research* 100: 101-116.

Shoeb M, Ansari NH, Srivastava SK, & Ramana KV (2014). 4-Hydroxynonenal in the pathogenesis and progression of human diseases. *Current medicinal chemistry* 21: 230-237.

Signor L, Boeri Erba, E. (2013). Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometric analysis of intact proteins larger than 100 kDa. *Journal of visualized experiments*: 79.

Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, & Viridi JS (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in microbiology* 6: 791.

Spickett CM (2013). The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal: Advances in chemistry and analysis. *Redox biology* 1: 145-152.

Staruschenko A, Jeske NA, & Akopian AN (2010). Contribution of TRPV1-TRPA1 interaction to the single channel properties of the TRPA1 channel. *The journal of biological chemistry* 285: 15167-15177.

Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, & Witztum JL (1989). Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *The new england journal of medicine* 320: 915-924.

Steinberg X, Lespay-Rebolledo C, & Brauchi S (2014). A structural view of ligand-dependent activation in thermoTRP channels. *Frontiers in physiology* 5: 171.

Stemmer U, & Hermetter A (2012). Protein modification by aldehydophospholipids and its functional consequences. *Biochimica et biophysica acta* 1818: 2436-2445.

Tardif JC, Gregoire J, L'Allier PL, Ibrahim R, Lesperance J, Heinonen TM, *et al.* (2007). Effects of reconstituted high-density lipoprotein infusions on coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *The journal of the american medical association* 297: 1675-1682.

Taylor AJ, Sullenberger LE, Lee HJ, Lee JK, & Grace KA (2004). Arterial biology for the investigation of the treatment effects of reducing cholesterol (ARBITER) 2: a double-blind, placebo-controlled study of extended-release niacin on atherosclerosis progression in secondary prevention patients treated with statins. *Circulation* 110: 3512-3517.

Trevisan G, Hoffmeister C, Rossato MF, Oliveira SM, Silva MA, Silva CR, *et al.* (2014). TRPA1 receptor stimulation by hydrogen peroxide is critical to trigger hyperalgesia and inflammation in a model of acute gout. *Free radical biology and medicine* 72: 200-209.

Trevisani M, Siemens J, Materazzi S, Bautista DM, Nassini R, Campi B, *et al.* (2007). 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* 104: 13519-13524.

Tuttolomondo A, Di Raimondo D, Pecoraro R, Arnao V, Pinto A, & Licata G (2012). Atherosclerosis as an inflammatory disease. *Current pharmaceutical designs* 18: 4266-4288.

Van Lenten BJ, Wagner AC, Jung CL, Ruchala P, Waring AJ, Lehrer RI, *et al.* (2008). Anti-inflammatory apoA-I-mimetic peptides bind oxidized lipids with much higher affinity than human apoA-I. *Journal of lipid research* 49: 2302-2311.

Veitenhansl M, Stegner K, Hierl FX, Dieterle C, Feldmeier H, Gutt B, *et al.* (2004). 40(th) EASD annual meeting of the european association for the study of diabetes: Munich, Germany, 5-9 september 2004. *Diabetologia* 47: A1-A464.

Woolf CJ (2010). What is this thing called pain? *The journal of clinical investigation* 120: 3742-3744.

Yeang C, Que X, Hoshijima M, Gu Y, Bradford W, Dalton N, *et al.* (2018). E06, a natural antibody targeted to oxidized phospholipids, attenuates cardiac ischemia reperfusion injury in mice. *Journal of the american college of cardiology* 71: A7.

Danksagung

Ich möchte mich hiermit sehr herzlich bei Frau Prof. Dr. Rittner für die Überlassung des hochinteressanten Themas bedanken. Die wissenschaftliche Ausbildung und die hervorragende, professionelle Unterstützung haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ein weiterer Dank sei Frau Dr. Beatrice Oehler ausgesprochen. Durch ihre Unterstützung während der Experimente, der Auswertung und des Schreibens der Dissertation setzt Frau Dr. Beatrice Oehler ein wunderbares Beispiel für unermüdete Geduld, Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit. Dafür gebührt ihr mein herzlichster Dank!

Herrn Priv.-Doz. Dr. Robert Blum, Corinna Martin und dem gesamten Team aus der klinischen Neurobiologie sei ebenfalls herzlich gedankt.

Die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, die interessanten Diskussionen und Denkanstöße, sowie die stete Motivation jede noch so triviale Frage zu beantworten ist nicht selbstverständlich. Deshalb von Herzen: Danke.

Darüber hinaus möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Erst durch die bedingungslose Unterstützung, Rückhalt und die stete Motivation war das Studium und diese Dissertation möglich. Dafür und für noch viel mehr danke ich euch!

Curriculum vitae

Jan Andreas Kloka

Ausbildung

Mai 2011 – Nov.2017 Studium der Humanmedizin
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
März 2013 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Okt. 2016 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Nov. 2017 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

Nov. 2016 – März 2016 Innere Medizin, Missioklinik Würzburg, Prof. Jany
März 2016 – Juli 2016 Anästhesie und operative Intensivmedizin,
Universitätsklinikum Bonn, Prof. Hoeft
Juli 2016 – Okt. 2016 Chirurgie, Kantonspital Graubünden, Schweiz, Prof. Furrer

Wissenschaftliche Tätigkeit

Seit Oktober 2014 Dissertation: „Endogene Lipide als neues Behandlungstarget
im TRPA1-vermittelten Entzündungsschmerz“
Arbeitsgemeinschaft Molekulare Schmerzforschung,
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie Universitätsklinik
Würzburg, Prof. Rittner, Prof. Brack
Juni 2015 Teilnahme an der Juniorakademie der Dt. Schmerzgesellschaft,
Berlin. Präsentation der Forschungsergebnisse.
Seit Juni 2015 Jährliche Teilnahme am Wissenschaftlichen Arbeitstag der
Deutschen Schmerzgesellschaft
Okt 2015 Vortrag, Deutscher Schmerzkongress 2015, Mannheim,
Präsentation der Forschungsergebnisse „Top young science“

Publikationen

Reaktive Sauerstoffspezies und deren Metabolit als Targets für neue analgetische Substanzen (D-4F Peptid und E06 mAb) im Entzündungsschmerz

B. Oehler, **J. Kloka**, M. Mohammadi, N. Roewer, R. Blum, A. Brack und H. Rittner
Abstract, 30. Wissenschaftliche Arbeitstage der DGAI, 19./20.2.2016

Inflammatory pain control by blocking oxidized phospholipid-mediated TRP channel activation, Nature Scientific Reports, 2017

Beatrice Oehler, Jürgen Schiller, Rafaela Mayer, Katrin Kistner, Reine-Solange Sauer, Francisco Rafael Nieto, Milad Mohammadi, Corinna Martin, **Jan Kloka**, Diana Pflücke, Kerstin Hill, Michael Schaefer, Marzia Malcangio, Peter W. Reeh, Alexander Brack, Robert Blum, Heike L. Rittner

Antinociception by the anti-oxidized phospholipid antibody E06

British Journal of Pharmacology, 2018
Milad Mohammadi, Beatrice Oehler, **Jan Kloka**, Corinna Martin, Alexander Brack, Robert Blum, Heike L. Rittner

Hattersheim, den 27.1.2019