Aus der Poliklinik und dem Funktionsbereich für Rheumatologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Schneider

Einfluss des TRPA1-Kanals auf die B-Zell-Funktion

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Sofia Anna Katharina Laaser
2022

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan:	Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker
Erstgutachter:	Prof. Dr. med. Georg Pongratz
Zweitgutachter:	Prof. Dr. rer. nat. Hans Neubauer

Meinen Eltern

Zusammenfassung

Studien an Fibroblasten zeigten die Reduktion pro-inflammatorischer Zytokine, den verstärkten Übergang in den Zelltod sowie die Aufnahme von PoPo3 nach Stimulation mit TRPA1-Liganden. Neben Fibroblasten sind B-Zellen in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis wichtig. Deshalb sollte der Einfluss des TRPA1-Kanals auf die Zytokin-Produktion, das Leben-/Todverhalten, das intraz. Calcium sowie die Aufnahme des Farbstoffs PoPo3 auf B-Zellen mit Hilfe bekannter Liganden des Kanals untersucht werden, um spezifische Zielstrukturen für einen pharmakologischen Nutzen zu eruieren.

TRPA1 und eine mögliche Hochregulation nach CpG/anti-IgM-Stimulation in B-Zellen wurde mittels Western-Blot nachgewiesen. TNF-alpha- und IL-10-Produktion wurde mit einem ELISA untersucht. Die Leben-/Todmessung erfolgte mit einer Annexin V/PI-Färbung. Die Calcium-Messung sowie die PoPo3-Aufnahme wurden mit einem Multimode-Reader durchgeführt.

Der TRPA1- und TRPV2-Kanal wurden in murinen CD19-pos. B-Zellen nachgewiesen, der TRPA1-Kanal zudem in humanen B-Zellen. Eine Hochregulation nach Stimulation mit CpG/anti-IgM erfolgte nicht. Nach Stimulation der B-Zellen mit den TRPA1-Agonisten CBD und CIN wurden bei CpG/anti-IgM stim. B-Zellen weniger TNF-alpha und IL-10 gemessen. Polygodial nahm keinen Einfluss auf die Zytokinproduktion. Durch Stimulation mit CBD und CIN erfolgte ein vermehrter Übergang der B-Zellen in die Apoptose nicht jedoch in die Nekrose. Bei Polygodial veränderte sich das Leben-/Todverhalten nicht. Das intraz. Calcium stieg konzentrationsabhängig bei Stimulation der B-Zellen mit CBD, CIN und Polygodial, auch bei Abwesenheit von extraz. Calcium. Der Farbstoff PoPo3 wurde nach Stimulation mit CBD und CIN aus der B-Zelle ausgeschleust und nach Stimulation mit Polygodial in die B-Zelle aufgenommen. Spezifische Antagonisten gegen TRP-Kanäle konnten die Effekte von CBD, CIN und Polygodial nicht inhibieren.

Die Reduktion pro-inflammatorischer Zytokine sowie die Sensibilisierung gegenüber Apoptose durch CBD und CIN ermöglichen einen pharmakologischen Einsatz gegen Gewebsentzündungen bei der rheumatoiden Arthritis. Die Aufnahme von PoPo3 in B-Zellen durch Stimulation mit Polygodial zeigt das Potential einer Wirkstoffaufnahme von Pharmaka direkt in die B-Zellen. Durch fehlende Antagonisierung der Stimulantien bleibt die Zielstruktur noch zu untersuchen.

Summary

Studies on fibroblasts showed the reduction of pro-inflammatory cytokines, the enhanced transition to cell death and the uptake of PoPo3 after stimulation with TRPA1 ligands. Besides fibroblasts, B cells are important in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.

Therefore, the influence of the TRPA1 channel on cytokine production, life/death behavior, intracellular Calcium as well as the uptake of the dye PoPo3 on B cells using known ligands of the channel should be investigated to identify specific targets for pharmacological benefit.

TRPA1 and a possible upregulation after CpG/anti-IgM stimulation in B cells was detected by Western blotting. TNF-alpha and IL-10 production was investigated by ELISA. The live/death measurement was performed with an Annexin V/PI stain. The calcium measurement as well as PoPo3 recording was performed with a multimode reader.

The TRPA1 and TRPV2 channels were measured in murine CD19-positive B cells. The TRPA1 channel was also detected in human B cells. An upregulation after stimulation with CpG/anti-IgM was not observed. After stimulation of the B cells with the TRPA1 agonists CBD and CIN, less TNF-alpha and IL-10 was observed on CpG/anti-IgM stimulated B cells. Polygodial did not influence cytokine production. Stimulation with CBD and CIN resulted in an increase transition of B cells into apoptosis but not into necrosis. Polygodial did not change the life/death behavior. The intracellular Calcium increased in a concentration-dependent manner when B cells were stimulated with CBD, CIN and Polygodial, even in the absence of extracellular calcium. The dye PoPo3 was removed from the B cell after stimulation with CBD and CIN and absorbed into the B cells after stimulation with Polygodial. Specific antagonists to TRP channels were unable to inhibit the effects of CBD, CIN and Polygodial.

The reduction of pro-inflammatory cytokines as well as the sensitization to apoptosis by CBD and CIN allow a pharmacological use against tissue inflammation in rheumatoid arthritis. The uptake of PoPo3 in B cells by stimulation with Polygodial shows the potential of drug uptake directly into the B cells. Due to the lack of antagonization of the stimulants, the target structure remains to be investigated.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC-Transporter	ATP Binding Cassette Transporter
ACPA	Antikörper gegen citrullinierte Protein-Antigene
ACR	American College of Rheumatology
AITC	Allylisothiocyanat
AK	Antikörper
ANOVA	Analysis of Variance
APC	Antigen-präsentierende Zellen
APS	Ammonium Persulfate
ATP	Adenosintriphosphat
BAFF	B-Zell-Aktivierungsfaktor
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
Ca	Kalzium
CBD	Cannabidiol
CD	Clusters of Differentiation
CIN	Cinnamaldehyde
cm	Zentimeter
CO_2	Kohlenstoffdioxid
contr.	control
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CSIF	Cytokine Synthesis Inhibitory Factor
CTLA-4	cytotoxische T-Lymphozyten-assoziierte Protein 4
Cu	Kupfer
CV	citrulliniertes Vimentin
dest.	destilliert
DMARD	Disease-modifying antirheumatic Drugs

DNA	deoxyribonucleic acid
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
et al.	et alii
EULAR	European League Against Rheumatism
extraz.	extrazellulär
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FcR	Fc-Rezeptor
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FSC	forward scatter
g	Gramm
g	g-Beschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehy-3-phpsphat-Dehydrogenase
h	Stunde(n)
HBSS	„Hank's balanced" Salt Solution
HCl	Salzsäure
HLA	Human Leukocyte Antigen
H_2O	Wasser
HRP	Horseradish Peroxidase
H_2SO_4	Schwefelsäure
Ig	Immunglobulin
IL-10	Interleukin-10
intraz.	intrazellulär
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
l	Liter

LAL-Reagenz	Limulus-Amöbozyten-Lysat-Reagenz
M	Molar
mA	Milliampere
MACS	Magnetic activated cell sorting
MHC-II	Major Histokompatibilitätskomplex Klasse II
ml	Milliliter
MM	Magermilch
mPTP	mitochondrial Permeability Transition Pore
µ	mikro (Faktor 10^{-6})
NaOH	Natriumhydroxid
NCLX	Na+/Ca2+ exchanger (Natrium/Kalzium-Austauscher)
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
OCT	Organic Cation Transporter
PBMC	Periphal blood mononuclear cells
PBS	Phosphate-buffered saline
PCA	Pyrrolidone carboxylic acid
PDK1	3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1
pg	Pikogramm
pH	potentia hydrogenii
PI	Propidiumiodid
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
Poly	Polygodial
pos.	positiv
prim.	primär
PS	Phosphatidylserin
RA	rheumatoide Arthritis

RANKL	Receptor activator nuclear factor kappa B ligand
RB	Running Buffer
RF	Rheumafaktor
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RR	Ruthenium Red
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
SDS	Sodium Dodecylsulfate
sek.	sekundär
SEM	Standard Error of Mean
SSC	side scatter
stim.	stimuliert
TBS-T	Tris-buffered saline-Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor-alpha
TRIS	Tris-hydroxymethylaminomethan
TRPA	Transient receptor potential Ankyrin
TRPC	Transient receptor potential Canonical
TRPM	Transient receptor potential Melastatin
TRPML	Transient receptor potential Mucolipin
TRPP	Transient receptor potential Polycystin
TRPV	Transient receptor potential Vanilloid
URL	Uniform Resource Locator
VDAC	Voltage-dependent Anion Channel
VE	vollentsalztes (Wasser)
WB	Western-Blot

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis ..... **XI**

Tabellenverzeichnis ..... **XIII**

1 Einleitung **1**

1.1 Definition der rheumatoiden Arthritis 1

1.1.1 Klinik 1

1.1.2 Diagnostik 2

1.1.3 Therapeutische Möglichkeiten 2

1.2 Ätiologie und Pathogenese 2

1.2.1 Einfluss genetischer Faktoren 3

1.2.2 Einfluss der Umweltfaktoren 3

1.3 Stellung der B-Zellen in der rheumatoiden Arthritis 4

1.3.1 Produktion von Auto-Antikörpern 5

1.3.2 Antigen-Präsentation und T-Zell-Aktivierung 6

1.3.3 Zytokin-Produktion 6

a) Einfluss von TNF-alpha in der RA 6

b) Einfluss von IL-10 in der RA 7

1.3.4 Immunregulation 7

1.3.5 Knochen-Homöostase 7

1.4 Der TRPA1-Kanal: Eine Zielstruktur in der rheumatoiden Arthritis 8

1.4.1 Allgemeine Einflüsse des TRPA1-Kanals 9

a) TRPA1 in Atemwegen 9

b) TRPA1 im Gastrointestinal-Trakt 9

c) Einfluss von TRPA1 in der Haut 10

1.4.2 Einfluss des TRPA1-Kanals in der rheumatoiden Arthritis 10

1.5 Ziel der Arbeit 11

2 Material und Methoden **12**

2.1 Material 12

2.1.1 Substanzen und Kits 12

2.1.2 Verbrauchsmaterialien 15

2.1.3 Antikörper, Stimulanzien und Standards 18

2.1.4 Laborgeräte 20
2.1.5 Verwendete Software 22
2.2 Methoden 22
2.2.1 Zellkultur 22
a) Splenozyten-Isolation 22
b) PBMC-Isolation aus EDTA-Blut gesunder Probanden 23
c) Isolation CD19/IgD-pos. B-Zellen mittels magnetischer Zellseparation (MACS) 25
d) Weiterverarbeitung der Zellen für ELISA und Annexin-PI-Färbung 27
2.2.2 Bestimmung der Reinheit CD19-positiver B-Zell-Populationen mittels Fluorescence-activated cell sorting (FACS) 28
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden 29
a) Proteinisolation aus B-Zellen und Bestimmung der Proteinkonzentration 29
b) SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 31
c) Western-Blot 33
2.2.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) 36
2.2.5 Annexin V/PI-Färbung 40
2.2.6 Ca^{2+}-Messung und PoPo3-Aufnahme 41
2.2.7 Statistische Analyse 42

3 Ergebnisse 43

3.1 Nachweis des TRPA1/TRPV2-Kanals mittels Western-Blot sowie Veränderung der relativen Proteinmenge von TRPA1/TRPV2 unter Kontroll- und Stimulationsbedingungen 43
3.1.1 TRPA1 in humanen B-Zellen 43
a) Vergleich der TRPA1-Proteinmenge bei humanen B-Zellen unter Kontroll- und Stimulationsbedingungen 44
b) Vergleich der Proteinmenge zwischen CD19-pos. B-Zell-Isolation und IgD-pos. B-Zell-Isolation 45
3.1.2 TRPA1 in murinen B-Zellen 46
a) Nachweis des TRPA1-Kanals in murinen B-Zellen 46

b) Vergleich der TRPA1-Proteinmenge zwischen Kontrollgruppe und stimulierter Zellen von CD19-pos. B-Zellen der Maus ... 46
3.1.3 TRPV2 in murinen B-Zellen ... 47
a) Nachweis des TRPV2-Kanals in murinen B-Zellen ... 47
b) Vergleich der TRPV2-Proteinlevel zwischen Kontrollgruppe und stimulierter CD19-pos. B-Zellen der Maus ... 48
3.2 TNF- und IL-10-Produktion von B-Zellen unter dem Einfluss von TRPA1-Liganden ... 48
3.2.1 Einfluss von TRPA1-Liganden auf die TNF-alpha-Produktion ... 49
a) Einfluss von CBD auf die TNF-alpha-Produktion ... 49
b) Einfluss von CIN auf die TNF-alpha-Produktion ... 50
c) Einfluss von Polygodial auf die TNF-alpha-Produktion ... 50
d) Vergleich der Agonisten untereinander in Bezug auf die Modulation der TNF-alpha-Produktion ... 51
e) Einfluss der Antagonisten A967079 und Capsazepine auf die TNF-alpha-Produktion ... 52
3.2.2 Einfluss der Agonisten und Antagonisten auf die IL-10-Produktion ... 53
a) Einfluss von CBD auf die IL-10-Produktion ... 54
b) Einfluss von CIN auf die IL-10-Produktion ... 55
c) Einfluss von Polygodial auf die IL-10-Produktion ... 56
d) Vergleich der Agonisten untereinander in Bezug auf die Modulation der IL-10-Produktion ... 56
e) Einfluss der Antagonisten A967079 und Capsazepine auf die IL-10-Produktion ... 57
3.3 Einfluss der TRPA1-Liganden auf das Überleben von CD19-positiven B-Zellen ... 57
3.3.1 Einfluss von CBD auf das Überleben CD19-pos. B-Zellen ... 58
3.3.2 Einfluss von CIN auf das Überleben von CD19-pos. B-Zellen ... 60
3.3.3 Einfluss von Polygodial auf das Überleben CD19-pos. B-Zellen ... 62
3.3.4 Einfluss der Antagonisten auf das Überleben CD19-pos. B-Zellen ... 64

3.4 Messung des intrazellulären Kalziums nach Stimulation der B-Zellen mit TRPA1-Liganden 64
3.4.1 Beeinflussung des intraz. Kalziums durch TRPA1-Liganden 65
3.4.2 Bestimmung des intrazellulären Ca^{2+}-Spiegels bei naiven vs. CpG/anti-IgM stimulierten B-Zellen sowie Einfluss von extrazellulärem Ca^{2+} 66
3.4.3 Einfluss der TRPA1/TRPV1-Antagonisten auf das intraz. Kalzium 68
3.5 PoPo3-Aufnahme nach Stimulation der B-Zellen mit TRPA1-Liganden . 69
3.5.1 Einfluss der TRPA1-Agonisten auf die PoPo3-Aufnahme in CD19-pos. B-Zellen 69
3.5.2 Unterschied zwischen PoPo3 bei CpG/anti-IgM stimulierten und naiven B-Zellen bzw. bei HBSS-inkubierten und PBS-inkubierten B-Zellen 70
3.5.3 Beeinflussung des gemessenen PoPo3 durch TRPA1/TRPV1-Antagonisten 72

4 Diskussion 73

4.1 Nachweis des TRPA1-/TRPV2-Kanals auf B-Zellen 73
4.2 Beeinflussung der Zytokinproduktion durch TRPA1-Agonisten 74
4.3 Wirkung von TRPA1-Agonisten auf das Überleben CD19-pos. B-Zellen 75
4.4 Erhöhung der intraz. Kalzium-Konzentration durch TRPA1-Aktivierung 76
4.5 Veränderung des intraz. PoPo3 nach TRPA1-Aktivierung 77
4.6 Wirkung der Antagonisten auf murine CD19-pos. B-Zellen 78

5 Fazit und Ausblick 80

Literaturverzeichnis 82

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Lymphoprepp-Tubes 24

Abb. 2: Schematische Darstellung der Gates bei der Auswertung mit Flow-Logic bei der Bestimmung der Reinheit CD19-pos. B-Zellen 29

Abb. 3: Schematische Darstellung der Gates bei der Auswertung mit FlowLogic bei der Annexin V/PI-Färbung 41

Abb. 4: Western-Blot gegen humanes TRPA1 (A) und GAPDH (B) 44

Abb. 5: Vergleich der TRPA1-Proteinmenge bei humanen B-Zellen unter Kontroll- und Stimulationsbedingungen 45

Abb. 6: Vergleich der TRPA1 Proteinmenge zwischen CD19-pos. B-Zell Isolation und IgD-pos. B-Zell-Isolation 45

Abb. 7: Western-Blot gegen murines TRPA1 (A) und GAPDH (B) 46

Abb. 8: Vergleich der TRPA1-Proteinmenge zwischen Kontrollgruppe und stimulierter Zellen von CD19-pos. B-Zellen der Maus 47

Abb. 9: Western-Blot gegen murines TRPV2 (A) und GAPDH (B) 47

Abb. 10: Vergleich der TRPV2-Proteinlevel zwischen Kontrollgruppe und stimulierter CD19-pos. B-Zellen der Maus 48

Abb. 11: Einfluss von CBD auf die TNF-alpha-Produktion 49

Abb. 12: Einfluss von CIN auf die TNF-alpha-Produktion 50

Abb. 13: Einfluss von Polygodial auf die TNF-alpha-Produktion 51

Abb. 14: Vergleich der Agonisten untereinander in Bezug auf die TNF-alpha-Produktion 52

Abb. 15: Einfluss der Antagonisten A967079 und Capsazepine auf die TNF-alpha-Produktion 52

Abb. 16: Einfluss von CBD auf die IL-10-Produktion 54

Abb. 17: Einfluss von CIN auf die IL-10-Produktion 55

Abb. 18: Einfluss von Polygodial auf die IL-10-Produktion 56

Abb. 19: Vergleich der Agonisten untereinander in Bezug auf Modulation der IL-10-Produktion 57

Abb. 20: Einfluss der Antagonisten A967079 und Capsazepine auf die IL-10-Produktion 57
Abb. 21: Einfluss von CBD auf das Überleben CD19-pos. B-Zellen 59
Abb. 22: Einfluss von CIN auf das Überleben CD19-pos. B-Zellen..... 61
Abb. 23: Einfluss von Polygodial auf das Überleben von CD19-pos. B-Zellen 63
Abb. 24: Einfluss der Antagonisten auf das Überleben CD19-pos. B-Zellen 64
Abb. 25: Beeinflussung des intraz. Kalziums durch TRPA1-Liganden 65
Abb. 26: Einfluss von extrazellulärem Ca^{2+} auf die intraz. Ca^{2+}-Spiegel bei naiven und CpG/anti-IgM stimulierten B-Zellen 67
Abb. 27: Einfluss der TRPA1/TRPV1-Antagonisten auf das intraz. Kalzium..... 68
Abb. 28: Einfluss der TRPA1-Agonisten auf die PoPo3-Aufnahme in CD19-pos. B-Zellen 69
Abb. 29: Unterschied zwischen PoPo3 bei CpG/anti-IgM stimulierten und naiven B-Zellen bzw. bei HBSS-inkubierten und PBS-inkubierten B-Zellen? 71
Abb. 30: Beeinflussung des gemessenen PoPo3 durch TRPA1/TRPV1-Antagonisten . 72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Substanzen und Kits 12–14
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien 15–17
Tabelle 3: Antikörper, Stimulanzien und Standards 18–19
Tabelle 4: Laborgeräte 20–21
Tabelle 5: Verwendete Software 22
Tabelle 6: Herstellung Medium 27
Tabelle 7: Agonisten und Antagonisten 27
Tabelle 8: Standard 1 zur Proteinkonzentrationsbestimmung 31
Tabelle 9: Standard 2 zur Proteinkonzentrationsbestimmung 31
Tabelle 10: Trenngel (Western-Blot) 33
Tabelle 11: Sammelgel (Western-Blot) 33
Tabelle 12: Laufpuffer (Western-Blot) 33
Tabelle 13: Blottingpuffer (Western-Blot) 35
Tabelle 14: Waschpuffer (TBS-T) (Western-Blot) 35
Tabelle 15: Antikörper (Western-Blot) 36
Tabelle 16: Standardreihe Recombinant Mouse IL-10 Stocklösung [20 µg/ml] 38
Tabelle 17: Standardreihe TNF-alpha Stocklösung [100 µg/ml] 38
Tabelle 18: Antikörper IL-10 ELISA 39
Tabelle 19: Antikörper TNF-alpha ELISA 39
Tabelle 20: Coating-Puffer IL-10 ELISA 39
Tabelle 21: Assay-Puffer IL-10 ELISA 39
Tabelle 22: Wasch-Puffer IL-10 ELISA und TNF-alpha ELISA 39

1 Einleitung

1.1 Definition der rheumatoiden Arthritis

Die rheumatoide Arthritis (RA) stellt eine chronisch-entzündliche, autoimmune Erkrankung dar, die charakterisiert ist durch schmerzhafte, geschwollene Gelenke. Im Laufe der Erkrankung kommt es zu einer Gelenkdestruktion mit einer einhergehenden Behinderung der Patienten im Alltag (Picerno et al., 2015; Smolen et al., 2016).

Von der RA sind weltweit ca. 0,5–1 % der Menschen betroffen (Song und Lin, 2017; Scott et al., 2010). Generell erkranken Frauen häufiger als Männer an der RA, aufgrund verschiedener Einflüsse wie hormoneller, genetischer, immunologischer und endokriner Faktoren (Alpízar-Rodríguez et al., 2017).

Patienten mit einer RA haben im Vergleich zur Gesamtpopulation eine ca. 1,5-fach erhöhte Mortalitätsrate. Kardiovaskuläre Erkrankungen sind maßgeblich an der erhöhten Mortalität beteiligt, aber auch respiratorische Erkrankungen sowie Infektionen tragen dazu bei (van den Hoek et al., 2017; Myasoedova et al., 2010).

Aufgrund der Einschränkungen im alltäglichen Leben und der Lebensqualität sowie der erhöhten Mortalität ist ein besseres Verständnis der Pathogenese und der Identifikation einer potentiellen Zielstruktur für Medikamente weiterhin von großer Bedeutung.

1.1.1 Klinik

Zu Beginn der RA stehen unspezifische Allgemeinsymptome wie Müdigkeit, Abgeschlagenheit, vermehrtes Schwitzen, Muskelschmerzen und subfebrile Temperaturen im Vordergrund (Arasteh, 2018). Typisch ist eine ausgeprägte „Morgensteifigkeit“ vor allem der Hand- und Fußgelenke, die ca. 30 Minuten anhält und sich im Laufe des Tages verbessert (Wasserman, 2011). Im Verlauf der Erkrankung entwickelt sich eine symmetrische Arthritis besonders der kleinen Gelenke der Hände und Füße: Betroffen sind hauptsächlich die Grundgelenke, weniger die Mittelgelenke und sehr selten die Endgelenke (Wasserman, 2011). Später können auch Knie-, Sprung-, Hüft-, Ellenbogen- und Schultergelenke betroffen sein, seltener die Wirbelsäule und das Kiefergelenk. Die Erkrankung tritt in Schüben auf, in denen die betroffenen Gelenke meist stark geschwollen und druckschmerzhaft sind. Durch anhaltende Entzündungen treten im fortgeschrittenen Stadium Gelenkdestruktionen mit einhergehenden Fehlstellungen auf

(Arasteh, 2018). Komplikationen der RA sind unter anderem Erkrankungen im kardiovaskulären System und im Respirationstrakt sowie Infektionen. Das Risiko eine kardiovaskuläre Erkrankung zu erleiden, erhöht sich um das 1,5–2-fache bei Patienten mit RA (Liao, 2017), die Prävalenz einer RA-bedingten interstitiellen Lungenerkrankung liegt bei 1 bis 58 % (Spagnolo et al., 2018).

1.1.2 Diagnostik

Eine frühe Diagnose mit einhergehender früher Therapie ist entscheidend für eine Verbesserung der Prognose der RA. Aufgrund dessen wurden ACR-/EULAR-Klassifikationskriterien verfasst, um eine möglichst frühe Diagnose zu ermöglichen (Kay und Upchurch, 2012). Für die Diagnose einer RA ist allein die Zusammenschau der Vorgeschichte des Patienten, der körperliche Befund, die serologischen sowie apparativen Ergebnisse zielführend (Arasteh, 2018).

1.1.3 Therapeutische Möglichkeiten

In der RA ist bisher noch keine kausale Therapie vorhanden, die eine Heilung der Erkrankung ermöglicht (Schett et al., 2016; Abbasi et al., 2019). Ziel der Therapie ist, eine Remission zu erreichen (Davis und Matteson, 2012). Das Konzept der Therapie erfolgt nach einem Stufenschema, bei dem zunächst mit NSAR (nichtsteroidale Antirheumatika) und Glukokortikoiden eine Symptomverbesserung erzielt und mit Hilfe der DMARDs (*Disease-modifying antirheumatic Drugs*) die Gelenkdestruktion verlangsamt werden soll (Schett et al., 2016; Arasteh, 2018). Biologika, die gezielt in pathogenetische Prozesse der RA eingreifen, haben die Behandlung der RA deutlich verbessert. Neben der medikamentösen Therapie steht eine umfassende physikalische Therapie (Arasteh, 2018).

1.2 Ätiologie und Pathogenese

Autoimmunerkrankungen sind gekennzeichnet durch einen Verlust der Toleranz gegenüber körpereigenem Gewebe, sodass nicht mehr zwischen „fremd“ und „eigen“ unterschieden werden kann, was zu einer Schädigung von Gewebestrukturen führt. Eine prominente Rolle in der Pathogenese autoimmuner Prozesse spielen autoreaktive T- und B-Zellen (Theofilopoulos et al., 2017). Die Ursachen für die Entstehung der RA sind nicht vollständig bekannt. Sowohl genetische, epigenetische als auch Umweltbedingungen nehmen Einfluss auf die Entstehung der RA (Giannini et al., 2020).

1.2.1 Einfluss genetischer Faktoren

Ein genetischer Zusammenhang bei der Entstehung der RA ist bekannt. In vielen Fällen konnte ein erhöhtes Krankheitsvorkommen in Familien von RA-Patienten beobachtet werden (Viatte et al., 2013; Lawrence, 1970). Eine Vererbbarkeit von bis zu 65 % wird angenommen (MacGregor et al., 2000).

Forschungen zeigten, dass die MHC-Region (*Major Histocompatibility Complex*) auf Chromosom 6p21.3 als ein wichtiger genetischer Faktor für die Entstehung der RA anzusehen ist (Stastny, 1976). Eine große Bedeutung spielen dabei die Allele im „Klasse II major Histokompatibilitätskomplex“ (MHC-II) HLA-DRB1 (Kong et al., 2002). Einen großen Anteil an dem Risiko der Entstehung der RA nimmt das „*shared epitope*“ in der dritten hypervariablen Region des HLA-DRB1-Allels ein, welches eine gemeinsame Aminosäuresequenz kodiert (Gregersen et al., 1987). Kodieren HLA-DRB1-Allele das „*shared epitope*“, besteht eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, dass sich eine ACPA-positive (Antikörper gegen citrullinierte Protein-Antigene) RA entwickelt (Klareskog et al., 2008; Holoshitz, 2010).

Auch in Stammbaum- und Zwillingsanalysen wurde das Auftreten der RA untersucht. Die Wahrscheinlichkeit an RA zu erkranken, wenn ein Verwandter ersten Grades erkrankt ist, beträgt ca. 2–5 % (Firestein und McInnes, 2017). Es wurde beschrieben, dass die Konkordanzrate bei monozygoten Zwillingen bei 15–30 % und bei dizygoten Zwillingen bei 5 % liege (MacGregor et al., 2000; McInnes und Schett, 2011). Die scheinbar geringen Konkordanzraten lassen vermuten, dass weitere Einflussfaktoren wie Umwelt, Mikrobiom und epigenetische Veränderungen an der Entstehung der RA beteiligt sind (Firestein und McInnes, 2017). An der Verarbeitung genetischer Informationen sind epigenetische Mechanismen beispielsweise in Form einer Modulation der Genexpression mit beteiligt (Glant et al., 2014). Karami et al. (2020) beschrieben den Zusammenhang zwischen genetischen und epigenetischen Prozessen als zwei sich bedingende Faktoren: Kommt es zu Veränderungen in epigenetischen Prozessen, so können genetische Mutationen auftreten. Kommt es zu genetischen Mutationen in epigenetisch kodierten Sequenzen, so können epigenetische Mechanismen verändert werden.

1.2.2 Einfluss der Umweltfaktoren

Der Einfluss der Umwelt auf die Entstehung der RA kann in drei Gruppen gegliedert werden: beruflich, infektiös, nicht beruflich/nicht infektiös (Gourley und Miller, 2007).

Zu der beruflichen Exposition zählen unter anderem der Umgang mit kristallinem Siliziumoxid, Schwermetallen, Lösungsmitteln und Mineralölen (Gourley und Miller, 2007).

Eine größere Bedeutung spielen bakterielle und virale Erreger in der Ätiologie der RA. Eine etablierte Verbindung besteht zwischen dem Epstein-Barr-Virus (EBV) und der RA. Es besteht eine Assoziation zwischen dem latenten nukleären EBV-Antigen 1 (EBNA-1) und charakteristischen Autoantikörpern der RA (Westergaard et al., 2015). Für das EBV wurden viele immunmodulierende Funktionen beschrieben, die bei genetisch prädisponierten Patienten eine RA auslösen können (Draborg et al., 2013). Neben EBV wurden auch Einflüsse des humanen Herpesvirus 6, des Zytomegalievirus und des Parvovirus B19 auf die Pathogenese der RA beschrieben (Sorgato et al., 2020; Broccolo et al., 2013). Bezogen auf das Parvovirus B19 konnten eine stärkere Krankheitsaktivität und Aggressivität sowie erhöhte Spiegel pro-inflammatorischer Zytokine gemessen werden als bei Parvovirus-negativen RA-Patienten (Naciute et al., 2016). Aber auch bakterielle Erreger wie Escherichia coli, Porphyromonas gingivalis und Streptokokkus pyogenes können den Verlauf der RA beeinflussen (Terato et al., 2018).

Als stärkste Umweltexposition, die als Risikofaktor für die RA gilt, ist das Rauchen zu nennen. Oxidativer Stress, ein pro-inflammatorischer Zustand, Autoantikörper-Produktion und epigenetische Effekte werden durch das Rauchen begünstigt (Chang et al., 2014). Der negative Einfluss des Rauchens auf RA-Patienten ist durch die geringere Effektivität einer anti-TNF-alpha-Therapie bei Rauchern zu erkennen (Abhishek et al., 2010). Bei Rauchern konnte ein dosisabhängiges Auftreten von citrullinierten Antikörpern bei RA-Patienten gezeigt werden (Klareskog et al., 2006). Da Citrullinierungen auch unter physiologischen Bedingungen auftreten, reicht diese Erkenntnis allein nicht aus, um den Zusammenhang zu erläutern (Zamanpoor, 2019). Durch eine Interaktion zwischen genetischen Faktoren (Auftreten des „*shared epitopes*“) und der Umwelt (Rauchen) kann es jedoch letztendlich zu einem Toleranzbruch kommen (Klareskog et al., 2006).

Weitere Einflussfaktoren stellen geringe Spiegel von ungesättigten Omega-3-Fettsäuren und Vitamin-D im Körper dar (Gioxari et al., 2018; Song et al., 2012).

1.3 Stellung der B-Zellen in der rheumatoiden Arthritis

Die B-Zellen spielen sowohl in der humoralen als auch in der zellulären Immunität eine zentrale Rolle. Neben der Produktion von Auto-Antikörpern sind B-Zellen unter anderem

in der Aktivierung von T-Zellen durch Antigenpräsentation, Ko-Stimulation und Zytokinproduktion beteiligt (Sokolov et al., 2018). Diese Prozesse tragen zu einer Gewebsentzündung im Körper bei. Die Bedeutung der B-Zellen zeigt sich in der Diagnostik durch Bestimmung von Autoantikörpern wie dem Rheumafaktor (RF) und Antikörpern gegen citrullinierte Proteine (ACPA) (Verheul et al., 2015). Das therapeutische Ziel einer Depletion der B-Zellen mit Hilfe des monoklonalen CD20-Antikörpers Rituximab geht mit einer Verbesserung der Krankheitssymptomatik bei RA-Patienten einher und verdeutlicht den Einfluss der B-Zellen in der Pathogenese der RA (Bugatti et al., 2014; Edwards und Cambridge, 2001; Cambridge et al., 2003).

1.3.1 Produktion von Auto-Antikörpern

In der B-Zell-Entwicklung weisen 55 bis 75 % der frühen unreifen B-Zell-Vorläufer einen gewissen Grad an Autoreaktivität auf (Finnegan et al., 2012; Wardemann et al., 2003). Bei gesunden Menschen werden mit Hilfe zweier Kontrollpunkte in der B-Zell-Entwicklung autoreaktive B-Zellen erkannt und entfernt. Im zentralen B-Zell-Toleranz-Kontrollpunkt im Knochenmark wird der größte Teil autoreaktiver B-Zellen, die sich zwischen der frühen unreifen und der unreifen Phase befinden, entfernt. Im peripheren B-Zell-Toleranz-Kontrollpunkt werden autoreaktive B-Zellen, die vor dem Übergang in reife naive B-Zellen stehen, entfernt (Bugatti et al., 2014). Sowohl der zentrale als auch der periphere B-Zell-Toleranz-Kontrollpunkt sind bei der RA defekt und ermöglichen das Auftreten autoreaktiver B-Zellen (Samuels et al., 2005). Ursächlich sind verschiedene Faktoren wie Veränderungen in den Signalwegen des B-Zell-Rezeptors und des Toll-like-Rezeptors sowie eine verminderte Anzahl regulatorischer T-Zellen und eine erhöhte Konzentration des B-Zell-Aktivierungsfaktors (BAFF) (Meffre, 2011; Finnegan et al., 2012). Prognostisch und diagnostisch bedeutsame Antikörper stellen der RF wie auch die ACPAs dar (Verheul et al., 2015). 60 bis 80 % aller RA-Patienten weisen den RF auf, der sich gegen den Fc-Teil körpereigener Immunglobuline der Klasse G (IgG) richtet (Verheul et al., 2015). Da der RF auch bei gesunden Menschen (RA-negativ) vorkommen kann, nimmt der Antikörper gegen citrullinierte Protein-Antigene (ACPA) eine wichtige Stellung in der Diagnostik der RA ein, da er eine höhere Spezifität und Sensitivität aufweist (Verheul et al., 2015). Aufgrund der Assoziation mit schwereren Krankheitsverläufen und stärkeren radiologisch sichtbaren Schäden wird dem ACPA ebenso ein hoher prognostischer Stellenwert beigemessen (Kroot et al., 2000; van der Helm-van Mil et al., 2005). Neben diesen beiden Biomarkern sind noch viele weitere

Autoantikörper in betroffenen Gelenken von RA-Patienten nachzuweisen, die eine lokale Entzündungsreaktion provozieren können (Monach et al., 2009).

1.3.2 Antigen-Präsentation und T-Zell-Aktivierung

B-Zellen fungieren als Antigen-präsentierende-Zellen (APC), indem sie Antigene endozytieren und über MHC-II-Moleküle an ihrer Oberfläche präsentieren (Finnegan et al., 2012; O'Neill et al., 2005). Der T-Zell-Rezeptor CD4-positiver T-Zellen erkennt das über MHC-II präsentierte Peptid, sodass weitere ko-stimulatorische Signale eingeleitet werden. CD28 auf T-Zellen interagiert mit CD80/86 auf B-Zellen, wodurch Immunreaktionen wie Zytokin-Ausschüttung, Antikörper-Produktion und T-Zell-Aktvierung provoziert werden (Finnegan et al., 2012; Vidard et al., 1996). Diese Interaktion kann durch das „cytotoxische T-Lymphozyten-assoziierte Protein 4“ (CTLA-4) auf T-Zellen unterbrochen werden, indem CTLA-4 CD80/86 bindet und die Signalwege inhibiert (Linsley et al., 1991). Die Wirksamkeit des Medikaments Abatecept, ein Fusionsprotein aus dem Fc-Teil des humanen IgG1 und der extrazellulären Domäne vom humanen CTLA-4, verdeutlicht die Bedeutsamkeit der B-Zell-T-Zell-Interaktion in der Pathogenese der RA, indem es die T-Zell-Aktivierung über den CTLA-4-Signalweg inhibiert (Blair und Deeks, 2017). Darüber hinaus führt eine B-Zell-Depletion beispielsweise mit Rituximab zu einer Reduktion der T-Zell-Aktivierung, was den Einfluss der B-Zellen auf die T-Zell-Aktivierung unterstreicht (Hamel et al., 2008; Bouaziz et al., 2007).

1.3.3 Zytokin-Produktion

Zytokine spielen im Entzündungsprozess der RA eine wichtige Rolle. Bekannt ist, dass ein Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen die Autoimmunität, chronische Entzündungsprozesse sowie die resultierenden Gelenkdestruktionen begünstigt (McInnes und Schett, 2007). B-Zellen tragen zur Synthese des breiten Spektrums an Zytokinen in der RA bei (Bugatti et al., 2014).

a) Einfluss von TNF-alpha in der RA

TNF-alpha ist ein Zytokin, welchem eine zentrale Rolle in der Pathogenese der RA zukommt (Radner und Aletaha, 2015). In der Synovialflüssigkeit und in der Synovialmembran von RA-Patienten wurden erhöhte TNF-alpha-Spiegel sowie eine erhöhte Dichte an TNF-Rezeptoren gemessen (Di Giovine et al., 1988; Blüml et al., 2012). Es beeinflusst

verschiedene Zellen in der Synovialmembran wie Makrophagen, Synoviozyten, Chondrozyten und Osteoklasten, was zu einer lokalen Entzündung mit Erosionen von Knorpel und Knochen führt (Radner und Aletaha, 2015; Azuma et al., 2000). Eine erhöhte Konzentration von TNF-alpha spiegelt sich in einer verstärkten Gelenkdestruktion wider, da die Aktivierung von Osteoklasten dosisabhängig ist (Azuma et al., 2000). Die herausragende Stellung von TNF-alpha in der RA zeigt sich anhand der Effektivität von TNF-alpha-Inhibitoren wie Infliximab, Adalimumab oder Etanercept (Radner und Aletaha, 2015). Mit Hilfe der TNF-alpha-Inhibitoren kann die Krankheitsaktivität kontrolliert werden, sodass eine Remission der Erkrankung teilweise erzielt werden kann (Radner und Aletaha, 2015).

b) Einfluss von IL-10 in der RA

IL-10, dessen ursprüngliche Bezeichnung „Zytokin-Synthese-Inhibitions-Faktor (CSIF)“ war (Mannino et al., 2015), reguliert als ein entzündungshemmendes Zytokin pro-inflammatorische Zytokine wie TNF-alpha, IL-6 oder IL-1 (Hernández-Bello et al., 2017). Es wird nahezu von allen angeborenen und adaptiven Immunzellen gebildet (Hernández-Bello et al., 2017; Saxena et al., 2015). IL-10 hemmt APCs in der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine sowie in der Hochregulation von Molekülen, die für die Lymphozytenaktivierung wichtig sind, was in einer Unterdrückung vieler Funktionen von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und T-Zellen mündet (Trinchieri, 2007).

1.3.4 Immunregulation

B-Zellen können immunregulatorische Funktionen aufweisen und somit lokale Entzündungsgeschehen kontrollieren (Bugatti et al., 2014). Bei RA-Patienten wurde eine geringere Anzahl regulatorischer B-Zellen gemessen, was negativ mit der Krankheitsaktivität korrelierte (Ma et al., 2014). In Studien zeigte sich, dass regulatorische B-Zellen die T-Zell-Proliferation unterdrücken und die T-Zell-Differenzierung sowie die Bildung von regulatorischen T-Zellen beeinflussen können (Bugatti et al., 2014). In der immunsuppressiven Funktion der B-Zellen stellte sich IL-10 als ein wichtiger Mediator heraus (Ries et al., 2014).

1.3.5 Knochen-Homöostase

Autoantikörper gegen citrulliniertes Vimentin (CV) begünstigen die Osteoklastogenese mit einhergehender verstärkten Aktivität knochenresorptiver Prozesse (Harre et al., 2012). Bei ACPA-positiven RA-Patienten wurden eine Ausdünnung und Fenestrierung

der Kortikalis in periartikulären Knochen beschrieben (Kleyer et al., 2014). Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass der „*Receptor activator nuclear factor kappa B ligand*“ (RANKL), ein wichtiges Zytokin in der Aktivierung von Osteoklasten und daraus resultierendem Knochenschaden bei RA-Patienten, von B-Zellen produziert wird (Meednu et al., 2016; Yeo et al., 2011). Die Bedeutsamkeit von RANKL im Prozess der Knochendestruktion bei RA-Patienten zeigt sich anhand der Wirksamkeit des Medikaments Denosumab, ein humaner Antikörper gegen RANKL (Tanaka, 2019). Denosumab bewirkt eine Suppression des Progresses der Knochendestruktion (Tanaka, 2019).

1.4 Der TRPA1-Kanal: Eine Zielstruktur in der rheumatoiden Arthritis

Der TRPA1-Kanal zählt zu der Familie der TRP-Kanäle (*transient receptor potential*), eine Gruppe nicht-selektiver Kationen-Kanäle, die bei Stimulation zu einem intrazellulären Anstieg von Kalzium, Natrium und Magnesium führen (Lowin et al., 2018; Billeter et al., 2014). Die TRP-Kanäle können anhand ähnlicher Aminosäuresequenzen in sechs Gruppen unterteilt werden: TRPM (melastatin), TRPC (kanonisch), TRPV (vanilloid), TRPML (mucolipin), TRPP (polycystin) und TRPA (ankyrin) (Zhou et al., 2013). Einige TRP-Kanäle werden durch physikalische Stimuli wie Wärme, Kälte oder Dehnung aktiviert, andere durch exogene oder endogene Agonisten (Lowin et al., 2018). In Säugetieren gibt es nur eine Untergruppe der TRPA-Kanäle, den TRPA1-Kanal, der charakterisiert ist durch multiple N-terminale Ankyrin-Wiederholungen (Guimaraes und Jordt, 2007). Der TRPA1-Kanal ist auf sensorischen Neuronen lokalisiert und spielt eine wesentliche Rolle in der Schmerzwahrnehmung (Billeter et al., 2014). Die Bedeutung in der Schmerzvermittlung zeigt sich in dem seltenen autosomal-dominanten familiären episodischen Schmerzsyndrom, bei dem durch eine Punktmutation im TRPA1-Gen normale Stimuli zu einer verstärkten Schmerzwahrnehmung führen (Kremeyer et al., 2010). Weitere Studien wiesen auf einen Zusammenhang zwischen TRPA1 und TRPV1 in der Signalkaskade der Schmerzwahrnehmung hin, da die beiden Kanäle zu 90 % kolokalisiert sind (Horváth et al., 2016; Salas et al., 2009; Billeter et al., 2014; Patil et al., 2020; Patil et al., 2010).

Endogene Stimuli des TRPA1- wie auch des TRPV1-Kanals sind ungesättigte Fettsäuren, Aldehyde und Endovanilloide, die in entzündlichen Prozessen gebildet werden (Redmond

et al., 2014; Ross, 2003). Exogene Stimuli des TRPA1-Kanals sind Polygodial, Cannabidiol (CBD), Zimtaldehyd (CIN) sowie Allylisothiocyanat (AITC) und beim TRPV1-Kanal Capsaicin wie auch CBD (Lowin et al., 2018; Petrocellis et al., 2011).

Neben der Lokalisation auf Nervenzellen wurde der TRPA1-Kanal auf Keratinozyten, Fibroblasten, Synoviozyten, Makrophagen, Lymphozyten, Endothelzellen und Thymozyten nachgewiesen (Horváth et al., 2016; Atoyan et al., 2009; Kochukov et al., 2006; Tian et al., 2020; Bertin et al., 2017; Earley et al., 2009), wodurch der Einfluss des TRPA1-Kanals in entzündlichen Prozessen an Bedeutung gewann (Moilanen et al., 2012).

Aufgrund seiner nozizeptiven und immunmodulatorischen Funktion stellt der TRPA1-Kanal eine therapeutische Zielstruktur in der chronisch entzündlichen von Schmerzen geprägten Erkrankung der RA dar.

1.4.1 Allgemeine Einflüsse des TRPA1-Kanals

Der TRPA1-Kanal ist Gegenstand vieler Untersuchungen unterschiedlicher Fachbereiche. So stellt dieser Kanal neben der Schmerzwahrnehmung und -therapie eine bedeutsame Zielstruktur im Bereich der Atemwege, des Gastrointestinal-Trakts sowie der Haut dar.

a) TRPA1 in Atemwegen

TRPA1 und TRPV1 sind in den Atemwegen vor allem in Nozizeptoren lokalisiert und werden als ein Hauptauslöser des Hustenreflexes beschrieben (Billeter et al., 2014). TRPA1 wird durch eine Vielzahl von Umweltgiften wie z.B. dem in Zigarettenrauch und Fahrzeugabgasen enthaltenen Reizstoff Acrolein aktiviert, aber auch durch Anästhetika wie Isofluran (Billeter et al., 2014; Belvisi et al., 2011). Über TRPA1 und TRPV1 werden so Entzündungsprozesse verstärkt, die zu Lungenerkrankungen wie der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) oder Asthma führen können (Billeter et al., 2014).

b) TRPA1 im Gastrointestinal-Trakt

TRPA1 und TRPV1 werden im Kolon auf Epithelzellen, Makrophagen, $CD4^+$-T-Zellen und Darmganglien exprimiert (Kun et al., 2014; Bertin et al., 2017). Bei Kolitis wird der TRPA1-Kanal hochreguliert (Kun et al., 2014). Der Einfluss auf die entzündlichen Prozesse in der Kolitis ist weiterhin nicht vollständig geklärt (Csekő et al., 2019). Sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Eigenschaften werden beschrieben (Csekő et al., 2019; Kun et al., 2014; Bertin et al., 2017). Aktuelle Ergebnisse deuten darauf hin, dass

TRPA1 zu einer mechanischen Überempfindlichkeit bei Kolitis-Patienten führt, was durch die Hochregulation des Kanals mit begründet werden kann (Jain et al., 2020).

c) Einfluss von TRPA1 in der Haut

Untersuchungen zeigten, dass der TRPA1-Kanal auf Keratinozyten, Melanozyten und Fibroblasten der Haut lokalisiert ist (Atoyan et al., 2009). Es wird angenommen, dass TRPA1 Einfluss auf die Differenzierung von Keratinozyten nimmt. Darüber hinaus spielt der TRPA1-Kanal eine Rolle in entzündlichen Prozessen der Haut. Nach Stimulation von Keratinozyten mit TRPA1-Agonisten wurden erhöhte IL-10-Spiegel gemessen, welches ein wichtiges Zytokin in der Entstehung inflammatorischer Prozesse der Haut ist (Atoyan et al., 2009). Außerdem wurde beschrieben, dass TRPA1 in der Signalkaskade von Histamin-unabhängigen Pruritus involviert ist (Bautista et al., 2013).

1.4.2 Einfluss des TRPA1-Kanals in der rheumatoiden Arthritis

Der TRPA1-Kanal spielt eine wesentliche Rolle in der Vermittlung mechanisch-evozierter entzündlicher Schmerzen in der RA (Garrison und Stucky, 2014). Studien zeigten, dass TRPA1-Antagonisten die mechanische Überempfindlichkeit, die nach Induktion einer RA auftrat, reduzierten (Galindo et al., 2018). Auch die Ergebnisse von Fernandes et al. (2011) deuteten auf einen entscheidenden Einfluss des TRPA1-Kanals bei der Entstehung und Aufrechterhaltung einer TNF-induzierten Hyperalgesie hin.

Mit Hilfe der Erkenntnisse, dass TRPA1 die Freisetzung wichtiger pro-inflammatorischer Mediatoren der RA provoziert und damit den Schweregrad der Erkrankung beeinflusst, gewann der Kanal in der Forschung entzündlicher Mechanismen eine größere Bedeutung (Lowin et al., 2015; Horváth et al., 2016). Sowohl in TRPV1- als auch in TRPA1-*knock-out*-Mäusen reduzierten sich typische RA-Beschwerden wie Gelenkschwellungen und Schmerz-Sensibilität (Barton et al., 2006; Horváth et al., 2016). Arbeiten an Fibroblasten zeigten, dass durch Stimulation mit TRPA1-Agonisten die Produktion von IL-6 und IL-8 vermindert und dabei intrazelluläres Kalzium erhöht wurde und ein verstärkter Übergang der Fibroblasten in den Zelltod provoziert wurde (Lowin et al., 2018). Da Fibroblasten beim Abbau von Knochen und Knorpel beteiligt sind, tragen diese Zellen wesentlich zur Pathogenese der RA bei (Bartok und Firestein, 2010; Bustamante et al., 2017).

1.5 Ziel der Arbeit

Die Expression von TRPA1 wurde bisher noch nicht in B-Zellen nachgewiesen und es ist unbekannt, ob dieser Kanal bei der Aktivierung und Zytokinproduktion involviert ist. Indirekte Hinweise von Soutar et. al zeigen Effekte des TRPV1/TRPA1-Agonisten und Pfefferbestandteils Piperin auf die B-Zellfunktion (Soutar et al., 2017). In dieser Arbeit wird daher die Bedeutung von TRPA1 auf die B-Zellfunktion genauer untersucht und charakterisiert werden. Dabei soll zunächst die Expression von TRPA1 in naiven und aktivierten B-Zellen bestätigt werden. Anschließend sollen nach TRPA1-Ligation funktionelle Parameter wie die Mobilisierung von Kalzium, das Überleben der B-Zellen sowie die Zytokinproduktion untersucht werden. Da B-Zellen eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der RA darstellen, ist das Ziel dieser Studie, TRPA1 als mögliche Zielstruktur für eine therapeutische Intervention zu etablieren. Dies hätte den Vorteil, dass neben der Modulation von B-Zellen auch die Aktivität weiterer, in der RA Pathogenese wichtiger Zellen wie z.B. Fibroblasten und T-Zellen, reduziert würde.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Substanzen und Kits

Produkt	Artikelnummer	Hersteller
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (1x)	D8537-1L	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Propidium Iodide Solution	130-093-233	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Annexin V Binding Buffer (10x)	51-66121E	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
MACS Quant Running Buffer	130-092-747	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Phosphate Buffered Saline (10x)	70011-036	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)
Coating-Buffer	00-0000-53	eBioscience (Waltham, USA)
Assay Diluent	00-4202-55	eBioscience (Waltham, USA)
TMB	T0440	Sigma-Alderich (St. Louis, USA)
H_2SO_4 (1,0 M)	X873.1	Carl-Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ampuwa 1000 ml Plastipur	143MDP243	Fresenius Kabi (Bad Homburg, Deutschland)
H_2SO_4 (0,5 M)	1.090.721.000	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Casein-Blocking-Buffer (5X)	B6429	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
FBS,Qualified,HI	10500-064	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)
Roti-Quant universal Reagenz 1	0120.2	Carl-Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Roti-Quant universal Reagenz 2	0120.2	Carl-Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Produkt	Artikelnummer	Hersteller
RIPA	R0278-50ML	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Stickstoff, flüssig		Linde (Guildford, England)
Isopropanol	I-9516	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Rotiphorese® Gel 30(37,5:1) Acrylamid	3029.2	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
SDS	L-4522	Sigma-Alderich (St. Louis, USA)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	161-0800	Bio-Rad (Hercules, USA)
TGS Buffer (10x)	161-0732	Bio-Rad (Hercules, USA)
Tris-Base	1.08382.500	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Glycin	H 507 a	Promega (Madison, USA)
Emsure Methanol for analysis	1.070.182.511	Merck (Darmstadt, Deutschland)
NaCl	1.06404.1000	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Tween	655204	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Clarity Western ECL Substrate	170-5060	Bio-Rad (Hercules, USA)
Blotting-Grade Blocker	170-6404	Bio-Rad (Hercules, USA)
Roti-Load1	K929.1	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Bovine serum albumin	7906-50G	Sigma-Alderich (St. Louis, USA)
Ponceau S	27195	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Lymphoprepp-Solution	1114545	Axis-Shield (Dundee, England)

Produkt	Artikelnummer	Hersteller
auto MACS Running Buffer	130-091-221	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
LAL Reagenz Wasser	H2olal-10	Invivo Gen (San Diego, USA)
RPMI 1640	72400-021	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)
Insulin solution human	I9278	Sigma-Alderich (St. Louis, USA)
Pen Strep	15140-122	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)
Red Blood (Cell Lysis Solution)	130-094-183	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
beta Mercaptoethanol	1.15433.0100	Merck (Darmstadt, Deutschland)
HBSS (Hank´s Balanced Salt solution)	H9394-500ML	Sigma-Alderich (St. Louis, USA)
FcR Blocking Reagent mouse	130-092-575	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)

Tabelle 1: Substanzen und Kits

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Artikelnummer	Hersteller
Pipetten-Spitzen (200 µl)	S1120-8710-C	Starlab (Hamburg, Deutschland)
Pipetten-Spitzen (1000 µl)	S1122-1730-C	Starlab (Hamburg, Deutschland)
Pipetten-Spitzen (10/20 µl)	S1120-3710-C	Starlab (Hamburg, Deutschland)
Tubes (50 ml, flacher Boden)	210261	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Tubes (15 ml, konischer Boden)	188271	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Tubes (50 ml, konischer Boden)	227261	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
F96 Maxisorp NUNC-Immuno Plate	735-0083	VWR (Langenfeld, Deutschland)
48 Well Cell Culture Plate	677 180	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
96 Well Cell Culture Plate	655 180	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
24 Well Cell Culture Plate	662 160	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Suspensionskulturflasche (50 ml)	690 195	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Safe Lock Tube (1,5 ml)	0030 123.328	Eppendorf AG (Hamburg, Deutshland)

Produkt	Artikelnummer	Hersteller
Safe Lock Tube (2 ml)	0300 123.344	Eppendorf AG (Hamburg, Deutshland)
Screw Cap reaction Tube (5 ml)	725261	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Pasteurpipetten, ungestopft	747720	Brand (Bremen, Deutschland)
Pasteurpipetten, gestopft	612-1799	VWR (Langenfeld, Deutschland)
25 ml Stripette	4489	Omnilab (Bremen, Deutschland)
10 ml Stripette	4488	Omnilab (Bremen, Deutschland)
5 ml Stripette	4487	Omnilab (Bremen, Deutschland)
Nitrile Powder Free Examination Gloves	700113	Ansell (Richmond, Australien)
Spritze (Omnifix U-40 Insulin)	9161309V	Braun (Melsungen, Deutschland)
Wischtücher	206030	Wepa (Arnsberg, Deutschland)
PCR Plastics	FG-088WF	Nippon genetics (Düren, Deutschland)
Microplate 96 Well, PS, U-Bottom, transp.	650101	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Adhesive Film for Microplates	391-1250	VWR (Langenfeld, Deutschland)

Produkt	Artikelnummer	Hersteller
Parafilm	PM-996	Bemis (Neenah, USA)
Cell Culture Microplate, 96 Well, PS, F-Bottom, black	655090	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Nitrocellulose Membranes o,2um	162-0147	Bio-Rad (Hercules, USA)
Chromatography Paper	0303-931	Bio-Rad (Hercules, USA)
BD Vacutainer K2E (EDTA)	367525	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)
Leucosep Tube	227290	Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich)
MS Columns	130-042-201	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
LS Colums	130-042-401	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

2.1.3 Antikörper, Stimulanzien und Standards

Produkt	Artikelnummer	Hersteller
FITC Annexin V	51-65874X	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
CD19-VioBright ™ FITC	130-105-110	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Isotyp: Rat IgG 2a	130-105-822	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
recombinant Murine TNF-alpha	315-01A-5KG	Pepro Tech (Hamburg, Deutschland)
Detection-AK (TNF-alpha ELISA)	13-7341-68	eBioscience (Waltham, USA)
Avidin-HRP (TNF-alpha ELISA)	00-4100-94	eBioscience (Waltham, USA)
Capture-AK (TNF-alpha ELISA)	14-7423-68	eBioscience (Waltham, USA)
Capture: Purified Rat Anti-Mouse IL-10	551215	Becton Dickenson (Franklin Lakes, USA)
Standard: Recombinant Mouse IL-10	550070	Becton Dickenson (Franklin Lakes, USA)
Detection: Biotin Rat Anti-Mouse IL-10	554465	Becton Dickenson (Franklin Lakes, USA)
Strepatividin-Poly-HRP (IL-10 ELISA)	21140	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)
Anti-TRPA1	pAb NB110-40763	Novus biologicals (Littleton, USA)
VRL1 AK	NBP1-32096	Novus biologicals (Littleton, USA)
Goat Anti-Rabbit IgG HRP	P0448	Dako (Santa Clara, USA)
GAPDH (14C10) Rabbit mAb	2118	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)
CD19 MicroBeads human	130-050-301	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Anti-IgD MicroBeads	130-103-775	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)

Produkt	Artikelnummer	Hersteller
CD19 MicroBeads mouse	130-052-201	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
B Cell Isolations Kit mouse	130-090-862	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
anti-mouse-IgM F(ab') 2 (µ chain) functional	115-006-075	Jackson Immuno Research (Ely, England)
Class B CpG oligonucleotide; a human TLR9 ligand	Tlrl-2006	Invivo Gen (San Diego, USA)
Cal-520, AM	ab171868	Abcam (Cambridge, England)
PoPo3 Iodide	P3584	Invitrogen (Carlsbad, USA)
PIC: Proteinase Inhibitor Cocktail (100x)	P8340	Sigma Alderich (St. Louis, USA)
CBD	1570	Tocris (Wiesbaden, Deutschland)
Polygodial	3197	Tocris (Wiesbaden, Deutschland)
Capsaicin	0462	Tocris (Wiesbaden, Deutschland)
A967079	4716	Tocris (Wiesbaden, Deutschland)
Capsazepine	0464/10	Tocris (Wiesbaden, Deutschland)
Ruthenium Red	1439/100	Tocris (Wiesbaden, Deutschland)
Zimtaldehyd	W228613	Sigma Alderich (St. Louis, USA)

Tabelle 3: Antikörper, Stimulanzien und Standards

2.1.4 Laborgeräte

Produkt	Hersteller
Zentrifuge	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, Deutschland)
Zentrifuge	Hitachi (Tokio, Japan)
Zentrifuge	Thermo Scientific Heraeus (Waltham, USA)
Zentrifuge	Nippon Genetics Europe (Düren, Deutschland)
Vortex Vibrofix VF2	IKA Labortechnik (Staufen, Deutschland)
Rotationsschüttler	Kisker (Steinfurt, Deutschland)
Aspirator	StarLab (Hamburg, Deutschland)
Aspirator	Grant-bio (Cambridge, England)
Thermo-Shaker	Neo Lab (Heidelberg, Deutschland)
Microplate Reader iMark	Bio Rad (Hercules, USA)
Infinite M200 Pro	Tecan (Männedorf, Schweiz)
MacsQuant Analyzer 10	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Sterilbank	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Kühlschrank –20 Grad	Liebherr (Bulle, Schweiz)
Kühlschrank –80 Grad	ThermoSientific (Waltham, USA)
Kühlschrank 4 Grad	ThermoScientific (Waltham, USA)
Eis-Maschine	Ziegra (Isernhagen, Deutschland)

Produkt	Hersteller
Magnetrührer	IKA Labortechnik (Staufen, Deutschland)
Magnetrührer	Heidolph Instruments (Schwabach, Deutschland)
MACS Magnet	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
CO_2-Inkubator	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Eisbad	Neo Lab (Heidelberg, Deutschland)
Abzug	Vinitex (Coswig, Deutschland)
Pipetten	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Waage	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
pH Messgerät	Hanna Instrument (Woonsocket, USA)
ChemiDoc™ Touch Imaging System	Bio-Rad (Hercules, USA)
Mini PROTEAN System Short Plates	Bio-Rad (Hercules, USA)
Mini PROTEAN System Spacer Plates	Bio-Rad (Hercules, USA)
Kammer Western Blot (Mini Protean Tetra Cell)	Bio-Rad (Hercules, USA)
Visier	Uvex (Fürth, Deutschland)
MACS SmartStrainers (70um)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Pre-Separation Filters (30um)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Handschuhe (Ice Grip 691)	Honeywell (Morristown, USA)

Tabelle 4: Laborgeräte

2.1.5 Verwendete Software

Name	Hersteller/Bezugsquelle
Citavi	Swiss Academic Software (Wädenswil, Schweiz)
Prism6	GraphPad Prism Software (San Diego, USA)
Image Lab 6.0.1	Bio-Rad (Hercules, USA)
FlowLogic	Inivai (Victoria, Australien)
Word, Excel, Powerpoint	Microsoft (Albuquerque, USA)

Tabelle 5: Verwendete Software

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

a) Splenozyten-Isolation

In diesem Projekt wurden Organentnahmen an Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Die Organentnahmen wurden von einer Biologisch-technischen Assistentin des Labors durchgeführt und sind unter der Projektnummer O 57/15 genehmigt. Zur Gewinnung der Splenozyten wurden die Mäuse zunächst mit Isofluran getötet. Anschließend wurden die Milzen entnommen und bis zur Weiterverarbeitung in PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung) gelagert. Die Weiterverarbeitung der Milzen erfolgte unter sterilen Bedingungen mit auf 4 °C gekühlten Puffern sowie mit einer auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge.

Die Milzzellisolation wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Auf ein 50 ml *Falcon-Tube* wurde ein feinmaschiger Filter (*Cell-Strainer*) angebracht und dieser wurde zunächst mit 3 ml PBS mit 1 % BSA (RB blau) equilibriert. Anschließend wurde die Milz mit einem Spritzenstempel und leichtem Druck durch den Filter dissoziiert. Dies erfolgte so lange, bis nur noch das Bindegewebe der Milz auf dem Filter zu sehen war. Während des Dissoziationsvorgangs wurde die Milz mit RB blau gespült, um alle Splenozyten in das 50 ml *Tube* zu überführen. Die Milzzellsuspension wurde dann mit RB blau auf 10 ml

aufgefüllt. Darauf wurde 1 ml Erythrozyten-Lysepuffer (Ery-Lyse) hinzugegeben. Anschließend wurde die Probe für fünf Sekunden *gevortext* und für zwei Minuten mit Erylyse inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde die Probe durch einen weiteren kleineren Filter in ein 15 ml *Tube* überführt. Im Anschluss wurde die Probe für 10 Minuten bei 300xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in RB blau resuspendiert. Die Probe wurde in 10 ml RB blau verdünnt. Daraus wurden 10 µl mit 390 µl RB blau verdünnt und anschließend wurde die Zellzahl mit Hilfe eines MacsQuant-*Analyzer* von Miltenyi bestimmt. Die genaue Zellzahl berechnete sich wie folgt:

Gemessene Zellzahl × Verdünnung (1:40) × Ausgangsmenge der Probe (10 ml)

= Gesamtzellzahl

Im Anschluss wurde die Probe nochmals bei 300xg und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Die Splenozyten wurden anschließend in 10 ml Medium resuspendiert.

b) PBMC-Isolation aus EDTA-Blut gesunder Probanden

Probandendaten

Das Projekt zur Entnahme humanen Bluts gesunder Probanden zur Erforschung des Einflusses von Immunzellen auf die Produktion von Entzündungsmediatoren ist unter der Studiennummer 2018-296-KFogU von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt worden. Vor der Blutentnahme wurden die Probanden zunächst über den Versuch informiert und eine Einwilligungserklärung wurde unterschrieben. Insgesamt nahmen sechs Probanden teil, davon waren drei weiblich und drei männlich. Im Schnitt betrug das Alter 36,7 Jahre (Median: 32,5 Jahre).

Durchführung

Den Probanden wurden ca. 60 ml EDTA-Blut (Ethylendiamintetraacetat) entnommen. Die weiteren Schritte erfolgten unter sterilen Bedingungen und mit auf 4 °C gekühlten Puffern. Bei 60 ml EDTA-Blut wurden drei 50 ml *Tubes* vorsichtig mit je 15 ml Lymphoprepp-*Solution* befüllt. Das Blut wurde aus den EDTA-Röhrchen in zwei 50 ml *Tubes* überführt, mit PBS aufgefüllt und anschließend mit einer 25 ml Stripette sehr langsam und vorsichtig auf die Lymphoprepp-*Solution* pipettiert. Dabei war wichtig, dass sich das Blut nicht mit der Lösung vermischte, sondern das Blut über die Lösung geschichtet wurde. Pro *Tube* wurden somit 30 ml EDTA-Blut pipettiert. Anschließend wurden die Proben bei 800xg und Raumtemperatur (RT) für 25 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation war der Lymphozyten-Ring mit den zu isolierenden Zellen als

eine trübe Schicht gut abzugrenzen (vgl. Abb. 1). Um diesen abnehmen zu können, wurde zunächst das Plasma oberhalb des Lymphozyten-Rings vorsichtig abgesaugt. Mit Hilfe einer gestopften Pasteur-Pipette wurde dann der Lymphozyten-Ring abgenommen und in ein neues 50 ml *Tube* überführt. Anschließend wurde die Probe mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und bei 250xg und RT für 10 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml PBS resuspendiert. Im Anschluss wurde die Probe nochmals bei 300xg und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml RB blau resuspendiert und kurz *gevortext*, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen in der Probe zu erhalten. Daraus wurden 10 µl entnommen, mit 390 µl RB blau verdünnt und anschließend die Zellzahl mit Hilfe eines Macs-Quant-*Analyzer* von Miltenyi bestimmt. Die genaue Zellzahl berechnete sich wie folgt:

Gemessene Zellzahl × Verdünnung (1:40) × Ausgangsmenge der Probe (10 ml)

= Gesamtzellzahl

Im Anschluss wurde die Probe nochmals bei 300xg und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) Medium mit 10 % FCS (*fetal calf serum*) aufgenommen.

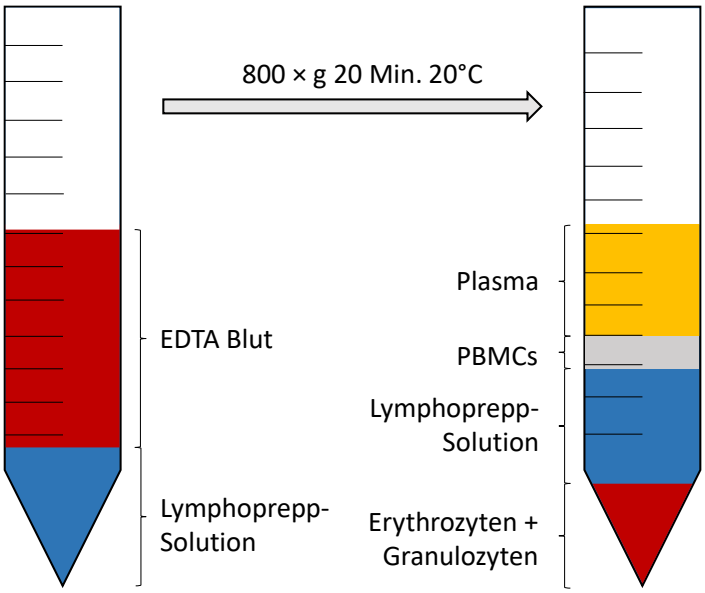


Abb. 1: Lymphoprepp-Tubes

c) Isolation CD19/IgD-pos. B-Zellen mittels magnetischer Zellseparation (MACS)

Nach der erfolgreichen Isolation der Splenozyten aus der Maus-Milz und der mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMC) aus humanem EDTA-Blut wurden aus diesen Zell-Pools CD19-positive bzw. IgD-positive B-Zellen magnetisch separiert. Den Oberflächenmarker CD19 exprimieren pro-/prä-/unreife und reife B-Zellen wie auch Plasmazellen. Der Oberflächenmarker IgD ist hauptsächlich auf reifen B-Zellen vorzufinden (Hardy und Hayakawa, 2001; Murphy und Weaver, 2018). Die folgenden Schritte wurden sowohl an Splenozyten als auch an PBMC angewandt. Die Arbeiten erfolgten weiterhin unter sterilen Bedingungen mit auf 4 °C gekühlten Puffern und Medien. An das Zentrifugieren der Zellen schlossen sich das Absaugen des Puffers und die Resuspension der Zellen in RB blau an. Die zu verwendende Menge des Puffers (RB blau) und des Antikörpers berechnete sich aus der zuvor bestimmten Splenozyten- bzw. PBMC-Zellzahl.

<u>CD19-positive B-Zellen Isolation:</u>

- Splenozyten (murin):
    - Puffer: 90 µl pro 10^7 Zellen
    - Antikörper: 10 µl pro 10^7 Zellen
- PBMC (human):
    - Puffer: 80µl pro 10^7 Zellen
    - Antikörper: 20 µl pro 10^7 Zellen

<u>Anti-IgD positive B-Zellen Isolation:</u>

- PBMC (human):
    - Puffer: 80 µl pro 10^7 Zellen
    - Antikörper: 20 µl pro 10^7 Zellen

Nach Hinzugabe des Antikörpers zu den im RB blau Puffer resuspendierten Zellen wurde die Probe *gevortext* und anschließend für 15 Minuten bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. In dieser Zeit wurde die Apparatur für die magnetische Trennung der CD19-positiven bzw. IgD-positiven B-Zellen vorbereitet. Vor der Zellseparation wurde die Zellsuspension gewaschen. Dafür wurde die Probe mit RB blau auf 10 ml aufgefüllt und bei 300xg

und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet pro $1{,}25 \times 10^8$ Zellen in 500 µl RB blau resuspendiert (MS-Säulen: 10^8 Zellen in 500 µl).

Die B-Zellen wurden über positive Selektion gereinigt. Hierbei wurden die Zellen mit Antikörpern (anti-CD19 oder anti-IgD), an die magnetische Kügelchen gekoppelt sind, inkubiert. Anschließend wurden die entsprechenden B-Zellen mit einem Magneten aus der Zellsuspension isoliert. Die isolierten B-Zellen präsentieren CD19 bzw. IgD an der Oberfläche (Moore et al., 2019). Da die Anzahl der B-Zellen in den humanen Blut-Proben geringer war als in den Maus-Milzen, wurden bei den humanen Proben MS-Säulen und bei den murinen Proben LS-Säulen verwendet (Kapazität LS-Säulen: 10^8 magnetisch markierte Zellen aus insgesamt bis zu 2×10^9 Zellen, Kapazität MS-Säulen: 10^7 magnetisch markierte Zellen aus insgesamt bis zu 2×10^8 Zellen) (Miltenyi Biotec, 2020b, 2020a). Im weiteren Verlauf beziehen sich die Werte im Text auf LS-Säulen und die in Klammern angegebenen Werte auf MS-Säulen.

Die Säule, die im Macs-Separator eingeklemmt wurde, wurde mit 3 ml RB blau equilibriert (MS-Säulen: 500 µl). Anschließend wurde die Zellsuspension auf die Säule gegeben und 3 Mal mit 3 ml RB blau gewaschen (MS-Säulen: 3×500 µl). Um die Zellen aus der Säule zu eluieren, wurde die Säule aus dem Magneten genommen und auf ein 15 ml *Tube* gesetzt. Dann wurden 5 ml (MS-Säulen: 1 ml) RB blau in die Säule pipettiert und direkt im Anschluss mit einem Stempel durch das Sieb der Säule gedrückt. Dabei lösten sich die magnetisch gelabelten B-Zellen von der in der Säule befindlichen Stahlwolle. Zuletzt wurde die B-Zellzahl analog zu den Unterkapiteln 2.2.1a) und 2.2.1b) bestimmt.

Je nach sich anschließendem Versuch wurden die Zellen in Medium (vgl. Tabelle 6) resuspendiert und mit CpG (Cytosin-Guanosin) (1,25 µg/ml)/anti-IgM (5 µg/ml) stimuliert.

Zelltyp	Medium-Bestandteile	Verdünnung
Murine B-Zellen	• RPMI 1640 • Pen 10000 U/ml/ Strep 10000 µg/ml • Fetal Bovine Serum, *heat inactivated* • beta-Mercaptoethanol	 1:100 1:10 1,05 µl/500 ml
Humane B-Zellen	• RPMI 1640 • Pen/Strep • Fetal Bovine Serum, *heat inactivated* • Insulin, human (10 mg/ml)	 1:100 1:10 1:2.000

Tabelle 6: Herstellung Medium

d) Weiterverarbeitung der Zellen für ELISA und Annexin-PI-Färbung

Die B-Zellen wurden nach Isolation mit CpG/anti-IgM stimuliert und in 96-*Well*-Platten überführt (250.000 Zellen/*Well*). Anschließend wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der Agonisten Cannabidiol (CBD), Zimtaldehyd (CIN) und Polygodial sowie mit einer gleichbleibenden Konzentration der Antagonisten A967079, Capsazepine und Ruthenium Rot inkubiert (vgl. Tabelle 7). Für die Kontrollgruppe wurden B-Zellen anstelle der Agonisten mit Medium behandelt. Die B-Zellen inkubierten für 24 h bei 37 °C und 5 % CO_2 im Brutschrank.

Für die Quantifizierung löslicher Faktoren mittels ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) wurden am Folgetag 150 µl Überstand pro *Well* abgenommen und das B-Zell-Überleben mit Annexin/PI (Propidiumiodid) überprüft.

Typ	Substanz	Eingesetzte Konzentrationen
Agonisten	• Cannabidiol (CBD) • Polygodial • Zimtaldehyd (CIN)	20 µM, 10 µM, 5 µM, 1 µM 10 µM, 5 µM, 1 µM, 0,5 µM 500 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM
Antagonisten	• A967079 • Capsazepine • Ruthenium Rot	10 µM 1 µM 2 µM

Tabelle 7: Agonisten und Antagonisten

2.2.2 Bestimmung der Reinheit CD19-positiver B-Zell-Populationen mittels Fluorescence-activated cell sorting (FACS)

Die Reinheit der CD19-pos. B-Zell-Population wurde durchflusszytometrisch mittels FACS bestimmt. Dabei bindet ein fluoreszenzgekoppelter Antikörper (AK) an das Oberflächenmolekül CD19 der B-Zellen. Sobald die Zellen den Laserstrahl passieren, beginnen die markierten Zellen zu fluoreszieren. Das Fluoreszenzsignal wird von Detektoren aufgenommen, sodass eine quantitative Aussage über die Zell-Population getroffen werden kann. Durch die Detektion des gebrochenen Lichts im rechten Winkel können Aussagen über die Granularität sowie Größe und Struktur des Zellkerns der Zelle getroffen werden. Je mehr Seitwärtsstreulicht (SSC = *side scatter*) vorhanden ist, desto stärker ist die Granularität der Zelle. Ein Maß für die Größe der Zelle stellt die Beugung des Lichts im flachen Winkel dar. Je mehr Vorwärtsstreulicht (FSC = *forward scatter*) erfasst wird, desto größer ist die Zelle. Die Ergebnisse der Stärke der Fluoreszenz sowie der Werte aus FSC und SSC können in einem Koordinatensystem zusammengetragen werden. Anhand der Lokalisation der Zellen im Koordinatensystem kann auf die Zusammensetzung der Zell-Population geschlossen werden (Adan et al. 2017).

Die Durchführung der Färbung erfolgte nach Herstellerangaben. Es wurden sowohl unstimulierte Zellen direkt im Anschluss der Zell-Separation untersucht als auch stimulierte Zellen nach 24 Stunden Inkubation. Alle Proben und Antikörper wurden bei 4 °C verwendet. Zunächst wurde die 96-*Well*-Platte mit den B-Zellen zentrifugiert (300xg, 10 Minuten, 4 °C). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 200 µl PBS/bovines Serumalbumin (BSA) (RB grün) resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 300xg für 10 Minuten bei 4 °C wurden 20 µl/*Well* FcR-*Blocking* Lösung (hergestellt aus 1 µl FcR-*Blocking*-Reagenz plus 20 µl RB grün) hinzugefügt und für 10 Minuten bei 4 °C lichtgeschützt inkubiert. Im Anschluss wurden 20 µl der Isotypkontrolle oder des CD19-AK zupipettiert und für 10 Minuten bei 4 °C lichtgeschützt inkubiert. Sowohl die Isotypantikörperlösung als auch die CD19-Antikörperlösung setzten sich aus 1 µl Antikörper und 20 µl RB grün zusammen. Die Färbung von CD19 wurde in Duplikaten durchgeführt, die Färbung des Isotyps als einfaches Replikat. Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei 4 °C lichtgeschützt wurden 160 µl RB grün pro *Well* pipettiert und die Platte anschließend zentrifugiert (300xg, 10 Minuten, 4 °C). Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellpellets wurden mit 200 µl/*Well* RB grün resuspendiert. PI

wurde während der durchflusszytometrischen Messung automatisch zugegeben (*Autolabel*). Im Anschluss wurden die Ergebnisse mit *Flow-Logic* ausgewertet (vgl. Abb. 2).

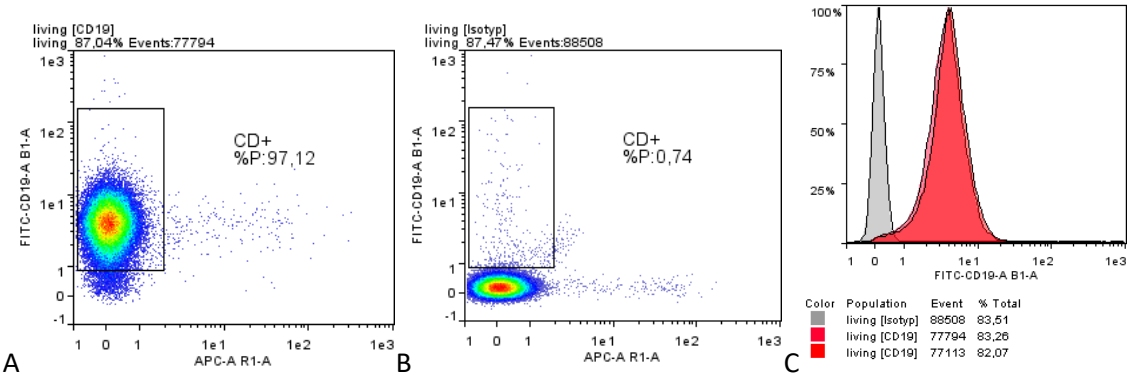


Abb. 2: Schematische Darstellung der Gates bei der Auswertung mit Flow-Logic bei der Bestimmung der Reinheit CD19-pos. B-Zellen
(A) Gate der CD19-pos. B-Zell-Population
(B) Gate der Isotypkontrolle
(C) Histogramm

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

a) Proteinisolation aus B-Zellen und Bestimmung der Proteinkonzentration

Im Anschluss an die Zellseparation wurden die CD19-positiven bzw. IgD-positiven B-Zellen in Medium (vgl. Tabelle 6) resuspendiert und anschließend mit CpG (1,25 µg/ml)/anti-IgM (5 µg/ml) in 200 µl Medium stimuliert oder unbehandelt belassen (Kontrollgruppe). In der Kontrollgruppe wurde anstelle von CpG LAL-Reagenz-Wasser (Limulus-Amöbozyten-Lysat-Reagenz) genutzt sowie PBS anstelle von anti-IgM im gleichen Verhältnis wie bei CpG und anti-IgM. Die Platten wurden über Nacht bei 5 % CO_2 und 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten bei 300xg für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen mit 200 µl PBS resuspendiert und in Eppendorf-*Tubes* überführt. Das Eppendorf-*Tube* wurde dann bei 300xg für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in flüssigem Stickstoff gefroren. Bis zur Weiterverarbeitung der Zellen für den *Western-Blot* wurden die Eppendorf-*Tubes* mit den B-Zellen bei –80 °C gelagert.

Für die Proteinisolation wurde das Zellpellet mit Radioimmunpräzipitationsassaypuffer (RIPA-Lysepuffer) mit zugesetztem Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC; 1:100) resuspendiert. Pro 1 Mio. Zellen wurden 20 µl RIPA-Lysepuffer verwendet. Nach kurzem *Vortexen* und einer 10-minütigen Inkubation in RIPA-Puffer wurden die Proben in Stickstoff eingefroren und anschließend auf Eis wieder aufgetaut. Das Einfrieren und Auftauen der

Proben wurden einmal wiederholt. Im nächsten Schritt wurde für 10 Minuten bei 10.000xg und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand mit den lysierten Proteinen wurde in ein neues Eppendorf-*Tube* überführt. Im Anschluss wurden die Proben entweder bei –80 °C eingefroren oder es folgte die Bestimmung der Proteinkonzentration zur Vorbereitung der Proben für den *Western-Blot*.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des Roti-Quant universal Kits. Das colorimetrische Verfahren ermöglicht die Quantifizierung löslicher Proteine beruhend auf einer Biuret-Reaktion. Dabei werden Peptidbindungen photometrisch nachgewiesen. Das in Reagenz 2 enthaltene Cu^{2+} wird unter alkalischen Bedingungen zu Cu^{+} reduziert, aufgrund einer Komplexbildung von Peptiden mit Kupfer-Ionen. Dies geschieht proportional zur Proteinmenge in der Probe. Es kommt zu einem violetten Farbumschlag der Proben. Die Farbreaktion ist umso intensiver je mehr Protein und einhergehend je stärker die Komplexbildung ist (Smith et al., 1985). Eine Verstärkung des Farbumschlags wird durch eine Chelatierung der Cu^{+}-Ionen mit Pyrrolidincarbonsäure (PCA) erzielt. Die Farbintensität wird bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen.

Durchführung:

Zunächst wurden die BSA-Standardlösungen (0–1 mg/ml, Tabelle 8 und Tabelle 9) für die Eichkurve hergestellt. Da die Proteinproben in RIPA-Puffer gelöst waren, wurde dieselbe Menge RIPA auch in den BSA-Standards vorgelegt (für das Pipettierschema siehe Tabelle 8 bzw. Tabelle 9). Zu den einzelnen Standards bzw. Proben wurde anschließend die Arbeitslösung bestehend aus zwei Reagenzien pipettiert. Zur Herstellung der Arbeitslösung wurden 15 Teile des Reagenz 1 und 1 Teil des Reagenz 2 gemischt. Die fertige Arbeitslösung wurde im Verhältnis 2:1 mit den Proben bzw. Standards gemischt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Standard und Proteine wurden auf Eis aufgetaut. Die Reaktion wurde durch eine 10- bis 15-minütige Inkubation bei RT gestoppt.

Finale BSA-Konz. (mg/ml)	BSA: Volumen Stock (µl)	H_2O (µl)	RIPA (µl)
0	0	450	50
0,1	25	425	50
0,2	50	400	50
0,3	75	375	50
0,4	100	350	50
0,5	125	325	50
0,6	150	300	50
0,8	200	250	50
1,0	250	200	50

Tabelle 8: Standard 1 zur Proteinkonzentrationsbestimmung

Finale BSA-Konz. (mg/ml)	BSA: Volumen Stock (µl)	H_2O (µl)	RIPA (µl)
0	0	450	50
0,005	1,25	448,75	50
0,025	6,25	443,75	50
0,05	12,5	437,5	50
0,125	31,25	418,75	50
0,25	62,5	387,5	50
0,5	125	325	50
0,75	187,5	262,5	50
1,0	250	200	50

Tabelle 9: Standard 2 zur Proteinkonzentrationsbestimmung

b) SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Vorbereitung der Proben und des Standards

Die Proteinlysate wurden auf Eis aufgetaut, mit 7,5 µl je Probe Rotiload versetzt (1:4 Verdünnung) und mit Wasser auf 30 µl aufgefüllt. Neben den Proben wurde pro Gellauf ein *Page-Ruler*, der als Proteinmolekulargewichtsmarker dient, in die erste Tasche des Gels pipettiert. Zu 2 µl des *Page-Rulers* wurden 7,5 µl Rotiload und 20,5 µl Wasser hinzugefügt. Die Denaturierung der Proben erfolgte durch Aufkochen bei 95 °C für 5 Minuten.

Hintergrund und Durchführung

Die Gelelektrophorese ist ein Verfahren, mit dem Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden können. Das Gel dient dabei als ein Sieb, durch das die Proteine wandern (Brunelle und Green, 2014). Das Gießen der Gele sollte mindestens einen Tag vor der Durchführung der Elektrophorese erfolgen. Die Gele können eine Woche bei 4 °C gelagert werden.

Zunächst wurden die Glasplatten, zwischen die das Gel gegossen werden soll, mit Ethanol gesäubert. Damit die Glasplatten aneinanderhaften, wurden die Ränder mit Wasser befeuchtet und anschließend zusammengedrückt. Die Glasplatten wurden dann in die Gel-Apparatur eingeklemmt. Zur Prüfung der Dichtigkeit der Apparatur wurde Aqua dest. zwischen die Glasplatten gefüllt. Anschließend wurde unter einem Abzug das Trenn- und Sammelgel gegossen und in die Platten eingefüllt. Die Zusammensetzung der Gele ist in der Tabelle 10 und Tabelle 11 aufgeführt. Zuerst wurde das Trenngel (vgl. Tabelle 10) zwischen die Glasplatten eingefüllt. Es wurden ca. 2,5 cm bis zum oberen Rand der Glasplatten für das Sammelgel (vgl. Tabelle 11) freigelassen. Auf das Trenngel wurde im direkten Anschluss Isopropanol pipettiert, um eine gerade obere Kante des Gels zu erhalten und ein Austrocknen während der Polymerisation zu verhindern. Nach ca. 30 Minuten war das Trenngel auspolymerisiert. Nach dem Abkippen des Isopropanols konnte das Sammelgel auf das Trenngel geschichtet werden. Durch den Einsatz eines Kamms bildeten sich nach Auspolymerisation des Gels die Kammern für die Proben.

Das Gel wurde in eine Halte-Apparatur eingesetzt. Falls nur ein Gel vorhanden war, musste ein Gegenstück in die Apparatur eingeklemmt werden, damit eine Kammer (Elektrodenkammer) entstand. In diese wurde Laufpuffer (Tabelle 12) eingefüllt. Anschließend wurden die Proben in die Taschen des Gels pipettiert. Je Tasche wurden vorsichtig 29 µl Probe bis zum unteren Rand der Tasche eingelassen. Die Elektrodenkammer, die das Gel enthielt, wurde in eine große Kammer (Puffer-Kammer) eingesetzt. Die Puffer-Kammer wurde dann bis zu der Markierung „2 Gele“ mit Laufpuffer befüllt. Die Elektrophorese startete mit einer Einlaufphase für 10–20 Minuten bei 10–15 mA (konstant) pro Gel (30 mA für 2 Gele). Darauf folgte die Laufphase für 30–60 Minuten bei 25–30 mA (konstant) pro Gel (60 mA für 2 Gele). Die Laufphase wurde so lange beibehalten, bis die Lauffront gerade eben aus dem Gel ausgelaufen ist.

Substanzen	10 % [in ml]
TRIS (1,5M), pH 8,8	5
Acrylamid (30 %)	6,7
SDS (20 % oder 10 %)	0,1 oder 0,2
Aqua dest.	7,92 oder 7,82
APS (100mg/ml)	0,2
TEMED (10 %)	0,08

Tabelle 10: Trenngel (Western-Blot)

Substanzen	5 % [in ml]
TRIS (1,5M), pH 6,8	1,0
Acrylamid (30 %)	1,3
SDS (20 % oder 10%)	0,08 oder 0,16
Aqua dest.	5,46 oder 5,38
APS (100mg/ml)	0,08
TEMED (10 %)	0,08

Tabelle 11: Sammelgel (Western-Blot)

Substanzen	Menge [in g]
Tris-Base	30,3
SDS	10
Glycin	144

Tabelle 12: Laufpuffer (Western-Blot)

c) Western-Blot

Im direkten Anschluss an die Gelelektrophorese erfolgte der Transfer der nach dem Molekulargewicht aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Taylor und Posch, 2014). Dafür wurde zunächst das Gel mit Hilfe eines Spatels von den Glasplatten vorsichtig abgelöst und in eine Schale mit *Blotting*-Puffer (vgl. Tabelle 13) gelegt. Für einen erfolgreichen Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran wurden Schwämme,

Whatman-Paper, Gel und Membran in folgender Reihenfolge geschichtet und in eine *Blotting*-Kassette eingeklemmt:

Schwamm – 3× Whatman-Paper – Membran – Gel – 3× Whatman-Paper – Schwamm.

Die Schwämme sowie die *Whatman-Paper* wurden zuvor in *Blotting*-Puffer equilibriert. Damit die Membran luftblasenfrei auf dem Gel lag, wurde die Membran mit den Fingern fixiert und mit einem Roller luftblasenfrei gestrichen. Die Halterung wurde in die Puffer-Kammer eingehängt. Die Membran war dabei zum Pluspol und das Gel zum Minuspol gerichtet. Um ein starkes Aufheizen des *Blotting*-Puffers während des *Blottens* zu verhindern, wurde in die Puffer-Kammer ein Kühlakku eingebracht. Der *Blotting*-Puffer wurde bis zu der Markierung „*Blotten*" in die Puffer-Kammer eingefüllt. Dann erfolgte das *Blotten* bei 300 mA (konstant) für 1,5 Stunden.

Im Anschluss an das *Blotten* wurde die Membran aus der Apparatur entnommen und mit Panceau gefärbt, um den erfolgreichen Transfer der Proteine zu überprüfen. Nach der Färbung wurde die Membran mit Wasser gespült und 3 Mal für 5 Minuten im Waschpuffer *Tris buffered Saline* mit Tween (TBS-T) (vgl. Tabelle 14) gewaschen. Es schloss sich das Blocken mit 5 % Magermilch (MM)/TBS-T für eine Stunde an. Nach erneutem 3-maligem Waschen der Membran für 5 Minuten mit TBS-T wurde der primäre Antikörper zur Detektion des spezifisch nachzuweisenden Proteins hinzugegeben. Der primäre Antikörper wurde in MM 5 %/BSA 1 %/TBS-T verdünnt (vgl. Tabelle 15) und konnte in dieser Lösung 5 bis 6 Mal verwendet werden. Nach jedem Gebrauch wurde die Antikörperlösung bei –20 °C gelagert und vor erneutem Nutzen auf Eis wieder aufgetaut. Die Membran wurde über Nacht (24 h) bei 4 °C unter Schwenken in 10–15 ml Antikörperlösung inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde die Membran 3 Mal für 5 Minuten in TBS-T gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Meerettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt), für zwei Stunden bei RT. Der sekundäre Antikörper wurde in MM 5 %/TBS-T gelöst (vgl. Tabelle 15). Nach der Inkubation folgten drei weitere Waschschritte mit TBS-T für jeweils 5 Minuten. Zur anschließenden Visualisierung des Zielproteins wurde die Membran mit ECL-Reagenz (*Enhanced Chemiluminescence*) (beide Komponenten 1:1 gemischt) für 5 Minuten unter Schütteln lichtgeschützt inkubiert. Hierbei oxidiert das am sekundären Antikörper gebundene Enzym HRP das im ECL enthaltene Luminol, was als Chemilumineszenz detektiert werden kann (Thermo Fisher

Scientific, 2020). Das entstehende Chemilumineszenz-Signal wurde mit Hilfe des *Chemi-Doc-Touch-Imaging* Systems digital aufgenommen und in Graustufen sichtbar gemacht.

Zur quantitativen Auswertung folgte auf die Detektion des spezifisch nachzuweisenden Proteins die Bestimmung des *Housekeepers*, einem Protein, das unter den verwendeten Stimulationsbedingungen keine Regulation zeigte und daher als Normierung verwendet wurde. Als *Housekeeper* fungierte Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Der anti-GAPDH Antikörper wurde in 5 % BSA gelöst (vgl. Tabelle 15). Alle weiteren Schritte entsprachen der oben beschriebenen Vorgehensweise.

Die Analyse der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der Software *Image-Lab*. Zur Bestimmung des Molekulargewichts der detektierten Proteine wurde die Höhe der Banden der Proben mit den Banden des Proteinmolekulargewichtmarkers verglichen. Für einen quantitativen Nachweis der Proteine wurden die Bandenintensitäten densitometrisch gemessen. Zur Ermittlung der relativen Proteinmenge wurden die densitometrisch ermittelten Ergebnisse des zu untersuchenden spezifischen Proteins mit denen der GAPDH-Banden in Bezug gesetzt.

Bestandteile	**Molare Masse**
Tris-Base	0,25 M
Glycin	1,92 M

Tabelle 13: Blottingpuffer (Western-Blot)
Die in der Tabelle aufgeführten Bestandteile des Blottingpuffers wurden in 1 l Aqua dest. gelöst. Es entstand ein 10-fach konzentrierter Ansatz. Der Puffer wurde auf einen pH-Wert von 8,3 eingestellt. Um einen 1-fachen Ansatz zu erhalten, wurde der Blottingpuffer (10-fach) mit VE H_2O und Methanol verdünnt. Der 1-fache Ansatz bestand aus Blottingpuffer mit 20 % Methanol und 70 % VE H_2O.

Bestandteile	**Molare Masse**
Tris-Base	0,5 M
NaCl	1,5 M
Tween	0,1 %

Tabelle 14: Waschpuffer (TBS-T) (Western-Blot)
Zur Herstellung von TBS (10-fach) wurden die in der Tabelle genannten Stoffe in 1 l Aqua dest. gelöst. Zur Herstellung des Waschpuffers (1-fach) wurde TBS (10-fach) mit VE 1:10 verdünnt. Anschließend wurde Tween mit einer Endkonzentration von 0,1 % in den 1-fachen Puffer gegeben.

Prim./Sek. AK	Artikelname	Verdünnung
Prim. AK	Anti-TRPA1	1:5.000 in MM 5 %/BSA 1 %
Prim. AK	VRL1-AK	1:1.500 in MM 5 %/BSA 1 %
Sek. AK	Goat-Anti-Rabbit IgG HRP	1:2.000 in MM 5 %
Housekeeper	GAPDH (14C10) Rabbit mAb	1:2.000 in BSA 5 %

Tabelle 15: Antikörper (Western-Blot)

2.2.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA ist eine quantitative Methode zur Bestimmung der Konzentration von löslichen Proteinen wie zum Beispiel Zytokine und Antikörper. Der Nachweis der Proteine ist antikörperbasiert. Das heißt, dass es nur zu einer enzymatischen Reaktion und somit zu einem Farbumschlag der Probe kommen kann, wenn ein passender Antikörper an dem zu analysierenden Protein (Antigen) mittels Schlüssel-Schloss-Prinzip gebunden hat (Hornbeck, 2001).

Die Durchführung des ELISAs (TNF) erfolgte nach Herstellerangaben. Der IL-10 Nachweis wurde mit einem eigens zusammengestellten Antikörperpaar durchgeführt. Der Versuchsablauf war analog zu dem käuflichen ELISA-Test. Bei den Versuchen handelte es sich um *Sandwich*-ELISAs. Dabei wurde eine *Multi-Sorp-96-Well*-Mikrotiterplatte über Nacht (ca. 24 h) bei 4 °C mit 100 µl eines *Capture*-AK inkubiert, sodass dieser Antikörper am Boden der Platte binden konnte (vgl. Tabelle 18 und Tabelle 19). Der *Capture*-AK wurde in *Coating*-Puffer verdünnt, alle weiteren verwendeten Antikörper und die Standards wurden in *Assay*-Puffer verdünnt. Die Herstellung des *Coating*-Puffers sowie des *Assay*-Puffers des IL-10 ELISAs kann der Tabelle 20 und der Tabelle 21 entnommen werden. Um Verdunstung zu vermeiden, wurden die Platten bei jeder Inkubation mit Folie beklebt. Am nächsten Tag wurde die Platte aspiriert und zwei Mal gewaschen. Für die einzelnen Waschschritte wurde der in Tabelle 14 beschriebene Waschpuffer verwendet. Anschließend erfolgte das Blockieren unspezifischer Bindungen mit Hilfe eines *Blocking*-Puffers. Für den IL-10 ELISA wurde dafür eine 5-fach konzentrierte Caseinlösung in

PBS mit H_2O auf eine 1-fache Konzentration verdünnt. Bei dem TNF-alpha ELISA entsprach der *Blocking*-Puffer dem *Assay*-Puffer. Pro Kavität wurden 100 µl des *Blocking*-Puffers pipettiert. Dies inkubierte für eine Stunde bei RT. Während der Inkubation wurden die TNF und IL-10 Standardreihen angesetzt (vgl. Tabelle 16 und Tabelle 17). Im Anschluss der Inkubation wurde die Mikrotiterplatte aspiriert und drei Mal gewaschen (bei TNF-alpha 5 Mal). Darauf folgte das Überführen der Standards und der Probenüberstände mit den gelösten Proteinen auf die Platten. Pro Platte wurden 50 µl des Standards in Duplikaten und 50 µl der unverdünnten Überstände pipettiert und für zwei Stunden bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Platte 5 Mal gewaschen und 50 µl pro *Well* des biotinyliertem Sekundär-AK (vgl. Tabelle 18 und Tabelle 19) aufgetragen und für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach erneutem 5-maligem Waschen folgte eine 30-minütige Inkubation bei RT mit 50 µl Streptavidin-HRP, welches das Biotin am sekundären Antikörper bindet. Anschließend wurde die Platte 5 Mal (IL-10 ELISA) bzw. 7 Mal (TNF-alpha ELISA) gewaschen. Im Anschluss wurde die Entwicklerlösung (Tetramethylbenzidin; TMB, 50 µl/*Well*) zugegeben, die dann für 15 bis 30 Minuten bei RT im Dunkeln inkubierte. Die HRP (*horseradish peroxidase*) setzt TMB zu einem blauen Endprodukt um. Je mehr Protein in der Probe ist, desto mehr Antikörper finden eine Bindungsstelle und desto stärker ist letztendlich die Farbreaktion. Die Reaktion wurde mit 50 µl/*Well* H_2SO_4 (0,5 M) beim IL-10 ELISA und 50 µl/*Well* H_2SO_4 (1,0 M) beim TNF-alpha ELISA gestoppt. Das Stoppen der Farbreaktion wurde deutlich durch den Farbumschlag von Blau zu Gelb. Die photometrische Analyse der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des *Microplate-Reader iMark*. Die Platte wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

Konzentration	Verdünnung
200 ng/ml	1:100 in Assay Buffer
500 pg/ml	1:400 in Assay Buffer
250 pg/ml	1:2 in Assay Buffer
125 pg/ml	1:2 in Assay Buffer
62,5 pg/ml	1:2 in Assay Buffer
31,25 pg/ml	1:2 in Assay Buffer
15,6 pg/ml	1:2 in Assay Buffer
7,8 pg/ml	1:2 in Assay Buffer
3,9 pg/ml	1:2 in Assay Buffer
0 pg/ml	Assay Buffer

Tabelle 16: Standardreihe Recombinant Mouse IL-10 Stocklösung [20 µg/ml]

Konzentration	Verdünnung
500 ng/ml	1:200 in Assay Buffer
1000 pg/ml	1:500 in Assay Buffer
800 pg/ml	1:1,25 in Assay Buffer
500 pg/ml	1:2 in Assay Buffer
250 pg/ml	1:2 in Assay Buffer
125 pg/ml	1:2 in Assay Buffer
62,5 pg/ml	1:2 in Assay Buffer
31,25 pg/ml	1:2 in Assay Buffer
15,6 pg/ml	1:2 in Assay Buffer
7,8 pg/ml	1:2 in Assay Buffer
0 pg/ml	Assay Buffer

Tabelle 17: Standardreihe TNF-alpha Stocklösung [100 µg/ml]

Antikörper	Name	Verdünnung
Capture-AK	Purified Rat Anti-Mouse IL-10	1:500 in Coating-Puffer
Detection-AK	Biotin Rat Anti-Mouse IL-10	1:500 in Assay-Puffer
Streptavidin-Poly-HRP-AK	Streptavidin-Poly-HRP	1:5000 in Assay-Puffer

Tabelle 18: Antikörper IL-10 ELISA

Antikörper	Verdünnung
Capture-AK	1:250 in Coating-Puffer
Detection-AK	1:250 in Assay-Puffer
Avidin-HRP-AK	1:250 in Assay-Puffer

Tabelle 19: Antikörper TNF-alpha ELISA

Name	Summenformel	Molare Masse
Natriumhydrogenphosphat	$Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$	177,99 g/mol
Natriumdihydrogenphosphat	$NaH_2PO_4 \times H_2O$	137,99 g/mol

Tabelle 20: Coating-Puffer IL-10 ELISA
Natriumhydrogenphosphat und Natriumdihydrogenphosphat wurden entsprechend abgewogen und in Aqua dest. verdünnt. Anschließend erfolgte die pH-Einstellung auf pH 6,5 mittels Salzsäure (HCl) und Natriumhydroxid (NaOH).

Name	Konzentration
PBS	1-fach
FCS	10 %

Tabelle 21: Assay-Puffer IL-10 ELISA
Für einen 30 ml Ansatz werden 3 ml 10x PBS und 3 ml FCS mit H_2O auf 30 ml aufgefüllt.

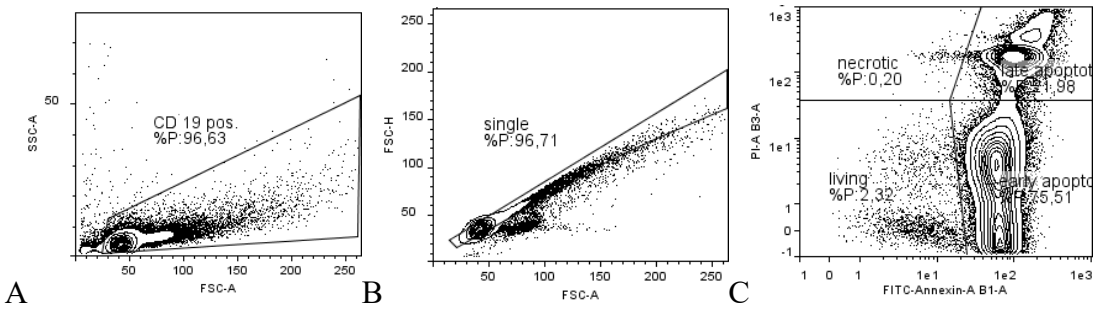
Name	Konzentration
PBS	1-fach
Tween	0,05 %

Tabelle 22: Wasch-Puffer IL-10 ELISA und TNF-alpha ELISA
Entsprechend der benötigten Verdünnung wurde 10x PBS und Tween mit VE aufgefüllt.

2.2.5 Annexin V/PI-Färbung

Mit Hilfe der Annexin-PI-Färbung kann der Anteil lebender, früh-apoptotischer, spät-apoptotischer und nekrotischer Zellen in einer Zellpopulation bestimmt werden. Dabei wird genutzt, dass Phosphatidylserin (PS) in lebenden Zellen auf der Innenseite der Zellmembran lokalisiert ist. Sobald die Zelle in den apoptotischen Zustand übergeht, wird PS auf die Außenseite der Zellmembran transloziert. Annexin V bindet an PS, sodass es als Marker für apoptotische Zellen dient. Ist die Zelle jedoch nekrotisch, wird die Zellmembran durchlässig, sodass Annexin V auch an der Innenseite der Zellmembran bindet. Um apoptotische Zellen von nekrotischen Zellen unterscheiden zu können, wird eine zusätzliche Färbung mit Propidiumiodid (PI) herangezogen. PI bindet an DNA (*Deoxyribonucleic acid*) und wird nur von Zellen mit durchlässiger Membran aufgenommen. Damit ist PI ein Marker für die Nekrose. So sind lebende Zellen PI-negativ und Annexin-negativ, apoptotische Zellen PI-negativ und Annexin-positiv und nekrotische Zellen PI-positiv und Annexin-positiv (Wallberg et al., 2016).

Die Durchführung der Färbung erfolgte nach Herstellerangaben. Die CD19-pos. B-Zellen wurden behandelt wie beschrieben (siehe Seite 27). Für die Annexin V/PI-Färbung wurde die 96-*Well*-Platte bei 300xg für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände in eine neue Platte pipettiert und die Zellpellets mit 200 µl kaltem PBS resuspendiert. Nachdem die Zellen bei 300xg für 10 Minuten und bei 4 °C zentrifugiert und die Überstände abgesaugt wurden, wurden die Zellen nochmals mit 200 µl/*Well* PBS gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren der Platte (300xg, 10 Minuten, 4 °C) wurde der Überstand abgesaugt. Anschließend wurden 100 µl/*Well* Annexin-*Binding*-Puffer (1-fach) und 5 µl/*Well* Annexin V/FITC (Fluorescein Isothiocyanate) hinzugefügt und für 15 Minuten bei RT lichtgeschützt inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden nochmals 100 µl/*Well* Annexin-*Binding*-Puffer (1-fach) zugegeben. Daran schloss sich die durchflusszytometrische Analyse per FACS an. PI wurde dabei vor jeder Analyse automatisch durch die Einstellung *Autolabel* in der FACS *Software* zupipettiert. Ausgewertet wurden die Ergebnisse mit der *Software Flow-Logic* (Abb. 3).



A B C

Abb. 3: Schematische Darstellung der Gates bei der Auswertung mit FlowLogic bei der Annexin V/PI-Färbung
(A) Gate der CD19-pos. B-Zell-Population
(B) Gate der einzeln gemessenen Events
(C) Gates der lebenden, früh-apoptotischen, spät-apoptotischen und nekrotischen CD19-pos. B-Zell-Populationen

2.2.6 Ca^{2+}-Messung und PoPo3-Aufnahme

Für die Ca-Messung wurden sowohl B-Zellen verwendet, die unstimuliert am selben Tag weiterverarbeitet wurden als auch mit CpG (1,25 µg/ml)/anti-IgM (5 µg/ml) stimulierte Zellen, die über Nacht (24 h) in Medium bei 5 % CO_2 und 37 °C inkubierten. Für den Versuch wurden die B-Zellen entweder in PBS (kein Kalzium) oder in HBSS („*Hank's balanced*" Salzlösung) (1 mM Kalzium) resuspendiert.

Aufgrund seiner Durchlässigkeit für Kalzium-Ionen kann die Funktionalität des TRPA1-Kanals auf B-Zellen durch die Bestimmung von intrazellulärem Kalzium nach Stimulation untersucht werden. Dies geschah mit Hilfe des fluoreszierenden Ca^{2+}-Indikators Cal-520, dessen Fluoreszenz nach Bindung durch Kalzium um den Faktor 100 ansteigt (Abcam, 2020). Neben Cal-520 wurde der fluoreszierende Farbstoff PoPo3 eingesetzt, der an Nukleinsäure bindet (Invitrogen, 2020). Ähnlich wie PI wird PoPo3 nur von Zellen mit kompromittierter Zellmembran aufgenommen. Studien zeigten jedoch, dass PoPo3 auch spezifisch über verschiedene Transportmechanismen aufgenommen wird und daher eignet sich dieser Farbstoff auch als Surrogat-Marker für die Wirkstoffaufnahme kationischer und ungeladener Moleküle (Lowin et al., 2020; Chen et al., 2009). Für die Kalzium-Messung/PoPo3-Aufnahme wurden 200.000 B-Zellen/25 µL/*Well* eingesetzt.

Zunächst wurden die zuvor isolierten B-Zellen in 500 µl HBSS bzw. PBS resuspendiert. Nach Zugabe der beiden Farbstoffe Cal-520 (4 µM Endkonzentration) und PoPo3 (1 µM) wurden die Zellen für eine Stunde bei 37 °C in einem Wärme-*Shaker* belassen und im Anschluss für 30 Minuten bei RT inkubiert. Während der Inkubation der B-Zellen mit

den Farbstoffen wurde die schwarze *96-Well-Cell-Culture-Microplate* für den *Assay* vorbereitet. Dazu wurden 20 µl/*Well* der Antagonisten des TRPA1-Kanals (vgl. Tabelle 7) bzw. Medium (vgl. Tabelle 6) als Kontrollgruppe vorgelegt. Die B-Zellen wurden nach Inkubation bei 300xg für 10 Minuten bei RT zentrifugiert. Die Zellen wurden darauf in 500 µl HBSS bzw. PBS resuspendiert und gewaschen (300xg, 10 Minuten, RT). Anschließend wurden die Zellen auf eine Zellzahl von 200.000/25 µl in HBSS bzw. PBS eingestellt. Dazu wurde mit einer Verdünnung von 1:500 PoPo3-Iodid hinzugegeben. Die B-Zellen (25 µl) wurden nun auf die Platten mit den zuvor bereits pipettierten Antagonisten pipettiert und für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Dann wurde mit Hilfe des *Tecan-Readers* die Messung für vier Zyklen gestartet (*Baseline* ohne Agonisten) und anschließend pausiert. Es folgte die Zugabe von 50 µl der Agonisten des TRPA1-Kanals (vgl. Tabelle 7) bzw. Medium (vgl. Tabelle 6) als Kontrollgruppe. Danach wurde die Messung fortgesetzt.

2.2.7 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe von *GraphPad Prism 6.0* durchgeführt. Bei dem Vergleich zweier Gruppen wurde ein t-Test berechnet. Bei dem Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) mit *post-hoc* Test (*Tukey´s multiple comparisons Test*) verwendet. Als statistisch signifikant wurden p-Werte $*p \leq 0{,}05$ angenommen. Die Graphen zu den statistischen Analysen wurden ebenfalls mit *GraphPad Prism 6.0* erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis des TRPA1/TRPV2-Kanals mittels Western-Blot sowie Veränderung der relativen Proteinmenge von TRPA1/TRPV2 unter Kontroll- und Stimulationsbedingungen

Der TRPA1-Kanal wurde in synovialen Fibroblasten nachgewiesen (Lowin et al., 2018) und in B-Zellen gibt es indirekte Hinweise auf das Vorhandensein und den funktionellen Einfluss dieses Ionenkanals (Pereira et al., 2017). Darauf basierend erfolgte in dieser Arbeit die Untersuchung der Expression des TRPA1-Kanals in humanen sowie in murinen B-Zellen mit dem *Western-Blot*-Verfahren. Da als TRPA1-Ligand unter anderem Cannabidiol (CBD) verwendet wurde, wurde außerdem an murinen CD19-pos. B-Zellen TRPV2 nachgewiesen, da dieser ebenfalls ein bekannter Zielrezeptor für CBD ist (Luo et al., 2019). Neben dem Nachweis des TRPA1/TRPV2-Kanals mittels *Western-Blot* wurden die Proteinlevel CpG/anti-IgM stimulierter B-Zellen mit naiven B-Zellen verglichen. Bei den humanen Proben wurden sowohl CD19-positive als auch IgD-positive B-Zellen untersucht, bei den murinen B-Zellen nur CD19-positive B-Zellen.

3.1.1 TRPA1 in humanen B-Zellen

Humane B-Zellen wurden entweder über anti-IgD- oder anti-CD19-*Beads* magnetisch isoliert und mit CpG/anti-IgM stimuliert oder naiv belassen. Unabhängig von der Isolationsmethode und Stimulation wurde TRPA1-Protein in B-Zellen nachgewiesen (Abb. 4.A). Es zeigten sich drei Banden entsprechend der Ergebnisse von Egan et al. (2016) und Yu et al. (2009). Für die statistische Auswertung der Proteinlevel der einzelnen Banden wurde GAPDH als Referenzprotein bestimmt. Der Nachweis von GAPDH (~37 kDa) war in allen Proben möglich (vgl. Abb. 4.B).

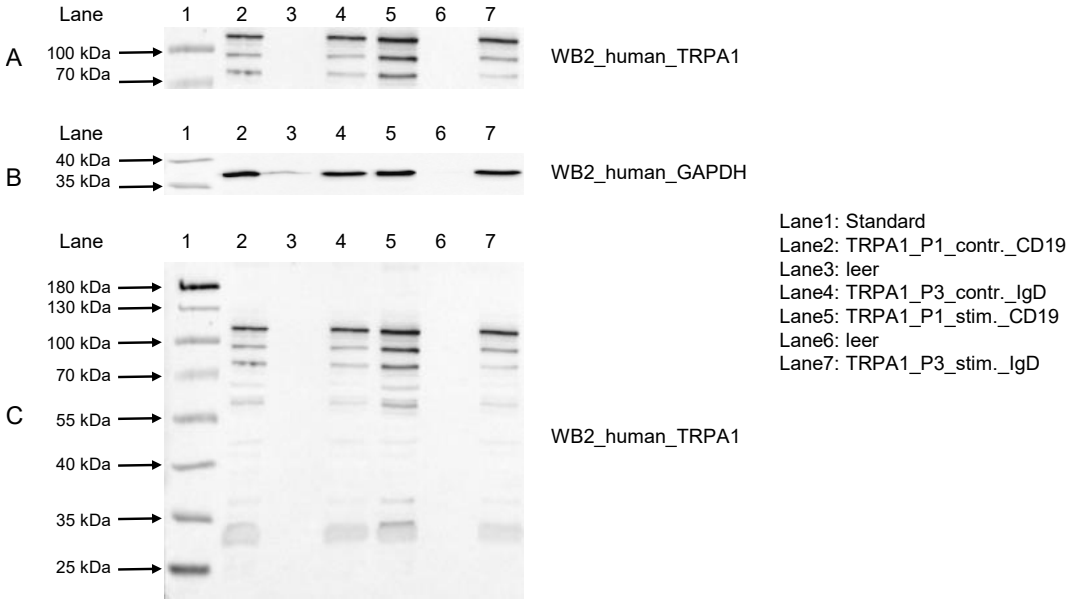
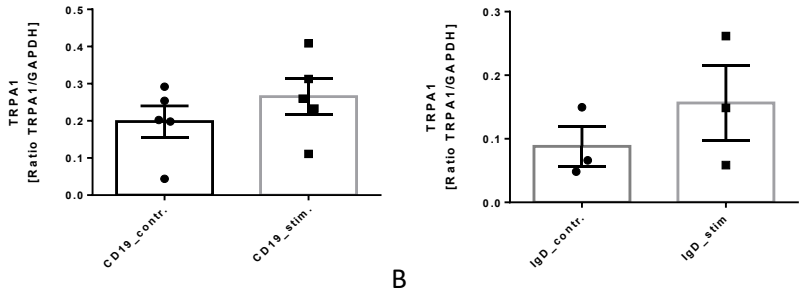


Abb. 4: Western-Blot gegen humanes TRPA1 (A) und GAPDH (B)
(A) Nachweis des TRPA1-Kanals in humanen B-Zellen bei ca. 110 kDa.
(B) Nachweis von GAPDH als Housekeeper bei ca. 37 kDa
(C) Darstellung des vollständigen Western-Blots zum Nachweis von TRPA1

a) Vergleich der TRPA1-Proteinmenge bei humanen B-Zellen unter Kontroll- und Stimulationsbedingungen

Abb. 5 stellt das relative Proteinlevel des TRPA1-Kanals in B-Zellen nach einer Stimulation mit CpG/anti-IgM über Nacht (24 h) im Vergleich zur Kontrollgruppe dar. Dieser Vergleich erfolgte sowohl an CD19-pos. B-Zellen als auch an IgD-pos. B-Zellen. In beiden Gruppen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den stimulierten Zellen nachgewiesen werden (A: $p = 0{,}3294$; B: $p = 0{,}3632$). Somit liegt kein Nachweis einer Überexpression des Kanals in stimulierten B-Zellen vor.



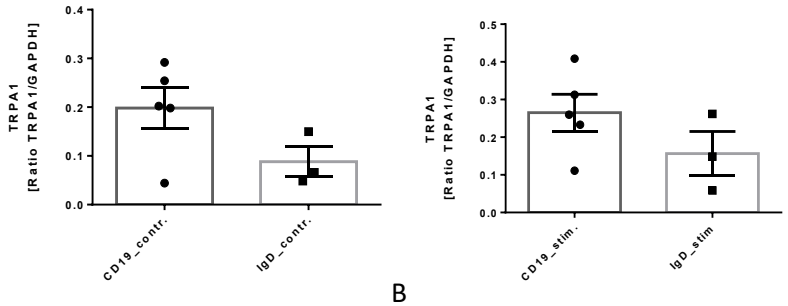
A B

Abb. 5: Vergleich der TRPA1-Proteinmenge bei humanen B-Zellen unter Kontroll- und Stimulationsbedingungen

(A) Vergleich CD19-pos. B-Zellen unter Kontroll- und Stimulationsbedingungen. Dargestellt sind Proteinlevel fünf unabhängiger Versuche (N = 5). Die Proben wurden mittels t-Test verglichen. Die Ergebnisse beziehen sich auf die statistische Auswertung der obersten Bande. Die Fehlerbalken zeigen den Mittelwert (Mean) ± SEM. Das Signifikanzniveau war *p = 0,05.
(B) Vergleich IgD-pos. B-Zellen unter Kontroll- und Stimulationsbedingungen. Dargestellt sind Proteinlevel drei unabhängiger Versuche (N = 3). Die Proben wurden mittels t-Test verglichen. Die Ergebnisse beziehen sich auf die statistische Auswertung der obersten Bande. Die Fehlerbalken zeigen den Mittelwert (Mean) ± SEM. Das Signifikanzniveau war *p = 0,05.

b) Vergleich der Proteinmenge zwischen CD19-pos. B-Zell-Isolation und IgD-pos. B-Zell-Isolation

Der Vergleich zwischen den unterschiedlichen Zell-Isolationen CD19-pos. B-Zellen und IgD-pos. B-Zellen ist in Abb. 6 dargestellt. Ein statistisch signifikanter Unterschied lag weder im Vergleich zwischen den Kontrollgruppen beider Zell-Isolationen noch zwischen den stimulierten Zellen vor (A: p = 0,1201; B: p = 0,2124).



A B

Abb. 6: Vergleich der TRPA1 Proteinmenge zwischen CD19-pos. B-Zell Isolation und IgD-pos. B-Zell-Isolation

A) Vergleich der beiden verschiedenen B-Zell-Isolationen innerhalb der Kontrollgruppe. Die Proben wurden mittels t-Test verglichen. Die Ergebnisse beziehen sich auf die statistische Auswertung der obersten Bande. Die Fehlerbalken zeigen den Mittelwert (Mean) ± SEM. Das Signifikanzniveau lag bei *p = 0,05.
(B) Vergleich der unterschiedlichen B-Zell-Isolationen innerhalb der stimulierten B-Zellen. Der Vergleich der Proben erfolgte mittels t-Test. Die Ergebnisse beziehen sich auf die statistische Auswertung der obersten Bande. Die Fehlerbalken zeigen den Mittelwert (Mean) ± SEM. Das Signifikanzniveau war *p = 0,05.

3.1.2 TRPA1 in murinen B-Zellen

a) Nachweis des TRPA1-Kanals in murinen B-Zellen

Murine B-Zellen wurden analog zu den humanen B-Zellen isoliert und stimuliert. TRPA1 wurde in stimulierten und naiven murinen B-Zellen nachgewiesen, jedoch mit einem etwas niedrigeren Molekulargewicht im Vergleich zum humanen Protein (Abb. 7.A). Der Nachweis von GAPDH bei ca. 37 kDa war in beiden Proben möglich (vgl. Abb. 7.B)

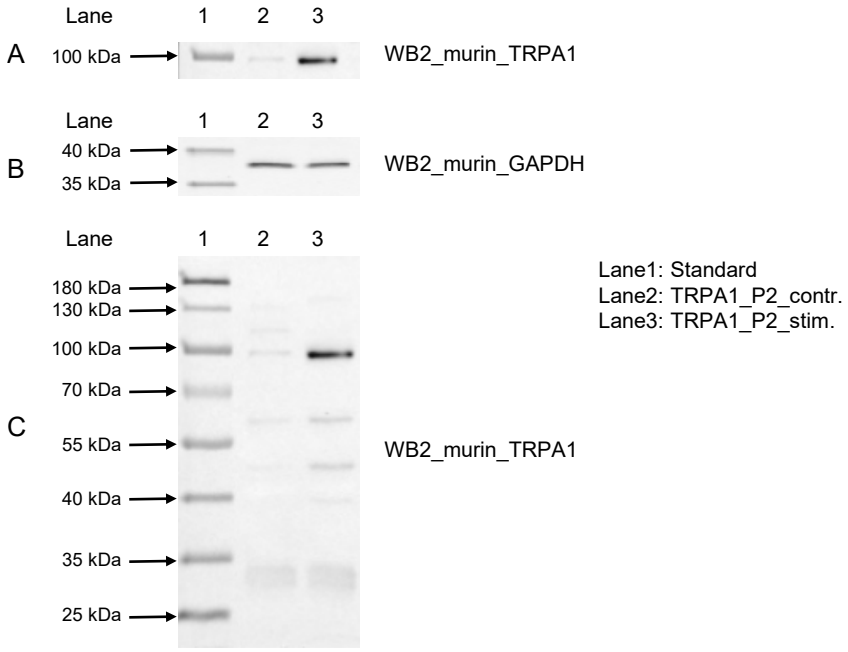


Abb. 7: Western-Blot gegen murines TRPA1 (A) und GAPDH (B)
(A) Nachweis des TRPA1-Kanals bei ca. 110 kDa in B-Zellen aus Maus-Milzen.
(B) Nachweis von GAPDH bei ca. 37 kDa.
(C) Darstellung des vollständigen Western-Blots zum Nachweis von TRPA1

b) Vergleich der TRPA1-Proteinmenge zwischen Kontrollgruppe und stimulierter Zellen von CD19-pos. B-Zellen der Maus

Abb. 8 zeigt einen Vergleich verschiedener TRPA1-Proteinlevel CD19-pos. B-Zellen, die aus Maus-Milzen isoliert wurden. Verglichen wurden B-Zellen, die über Nacht (24 h) mit CpG/anti-IgM stimuliert wurden (stim.), mit einer Kontrollgruppe (contr.). Das Proteinlevel zwischen der Kontrollgruppe und der stimulierten B-Zell-Gruppe verhielt sich nahezu gleich. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen festgestellt werden ($p = 0{,}3696$).

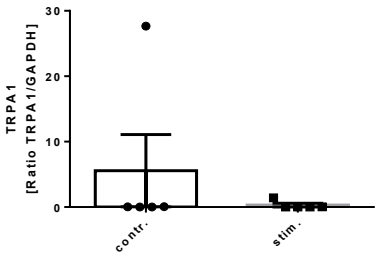


Abb. 8: Vergleich der TRPA1-Proteinmenge zwischen Kontrollgruppe und stimulierter Zellen von CD19-pos. B-Zellen der Maus
Dargestellt sind Proteinlevel fünf unabhängiger Versuche (N = 5). Die Proben wurden mit Hilfe des t-Tests verglichen. Die Fehlerbalken zeigen den Mittelwert (Mean) ± SEM. Das Signifikanzniveau lag bei *p = 0,05.

3.1.3 TRPV2 in murinen B-Zellen

a) Nachweis des TRPV2-Kanals in murinen B-Zellen

Neben TRPA1 wurde in den murinen Proteinlysaten der Ionenkanal TRPV2 nachgewiesen (Abb. 9). TRPV2 wurde sowohl in stimulierten als auch in naiven B-Zellen bei einer Größe von ~72 kDa detektiert (vgl. Abb. 9.A). Als positive Kontrollgruppe (Abb. 9.A, Spur 4) fungierte eine Probe von synovialen Fibroblasten, die bekannterweise TRPV2 exprimieren (Laragione et al., 2015). Als Referenzprotein diente GAPDH (Abb. 9.B).

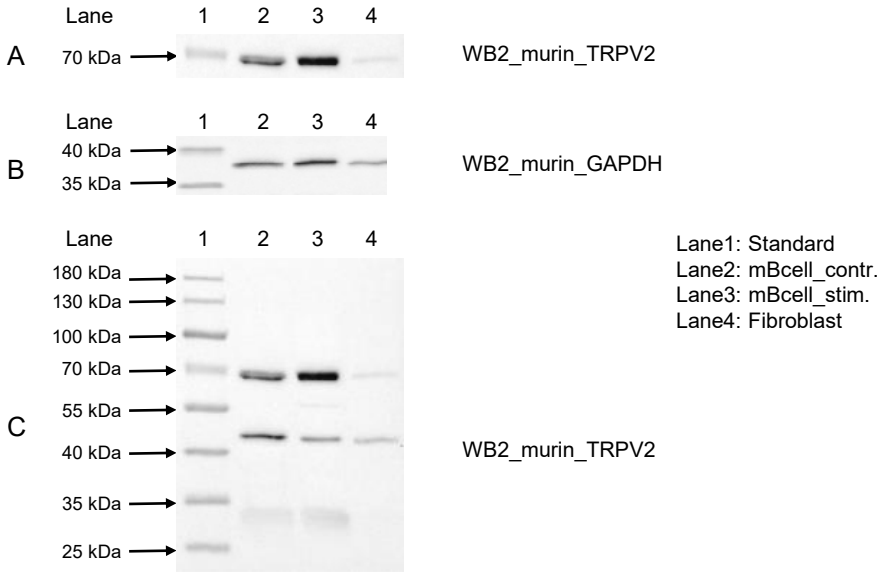


Abb. 9: Western-Blot gegen murines TRPV2 (A) und GAPDH (B)
(A) Nachweis des TRPV2-Kanals in murinen B-Zellen aus der Milz bei ca. 70 kDa
(B) Nachweis von GAPDH bei ca. 37 kDa
(C) Darstellung des vollständigen Western-Blots zum Nachweis des TRPV2-Kanals

b) Vergleich der TRPV2-Proteinlevel zwischen Kontrollgruppe und stimulierter CD19-pos. B-Zellen der Maus

Für den Vergleich der TRPV2-Proteinlevel wurden aus der Maus-Milz isolierte CD19-pos. B-Zellen verwendet (vgl. Abb. 10). Verglichen wurden die TRPV2-Proteinlevel stimulierter Zellen (stim.) mit einer Kontrollgruppe (contr.). Analog zum TRPA1-Kanal konnte bei der Untersuchung des TRPV2-Kanals kein statistisch signifikanter Unterschied in der Proteinmenge des TRPV2-Kanals zwischen nicht stimulierten und stimulierten B-Zellen nachgewiesen werden (p = 0,8140).

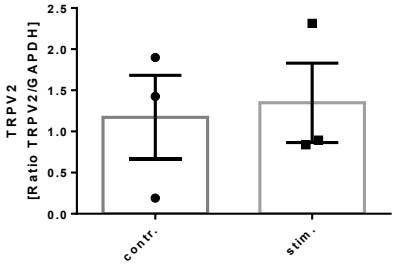


Abb. 10: Vergleich der TRPV2-Proteinlevel zwischen Kontrollgruppe und stimulierter CD19-pos. B-Zellen der Maus
Dargestellt sind Proteinlevel drei unabhängiger Versuche (N= 3). Die Fehlerbalken stellen den Mittelwert (Mean) ± SEM dar. Das Signifikanzniveau lag bei * p = 0,05.

3.2 TNF- und IL-10-Produktion von B-Zellen unter dem Einfluss von TRPA1-Liganden

Alle Zytokine wurden aus murinen B-Zellüberständen gemessen (vgl. Kapitel 2.2.4). Für die Versuche wurden Agonisten bzw. Antagonisten genutzt, die bereits spezifisch für den TRPA1-Kanal beschrieben wurden (Soutar et al., 2017). Als für den TRPA1-Kanal spezifische Agonisten dienten Cannabidiol (CBD), Zimtaldehyd (CIN) sowie Polygodial, als Antagonisten A967079 und Capsazepine (Soutar et al., 2017). Letztere Verbindung bindet als Antagonist an den Chili-Rezeptor TRPV1, dessen Einfluss hier ausgeschlossen werden sollte (Walker et al., 2003). Die Ausschüttung von TNF-alpha und IL-10 wurde mit dem ELISA-Verfahren gemessen. Zum einen sollte der Einfluss der Agonisten je nach Konzentration auf die Ausschüttung der Zytokine untersucht werden und zum anderen eine mögliche Inhibition des Effekts der Agonisten durch Antagonisten gezeigt werden. Da naive B-Zellen kaum Zytokine produzieren, wurden in diesen Versuchen nur mit CpG/anti-IgM stimulierte B-Zellen verwendet.

3.2.1 Einfluss von TRPA1-Liganden auf die TNF-alpha-Produktion

TNF-alpha spielt bei entzündlichen Prozessen eine wesentliche Rolle und ist bei der Entstehung sowie der Behandlung der rheumatoiden Arthritis ein wichtiges Zielmolekül (Bradley, 2008).

a) Einfluss von CBD auf die TNF-alpha-Produktion

CBD reduzierte die TNF-alpha-Produktion in B-Zellen signifikant ($p = 0{,}05$ für CBD [c] = 20 µM, 10 µM und 5 µM) (Abb. 11.A). Diese Reduktion konnte nicht mit dem spezifischen TRPA1-Antagonisten A967079 inhibiert werden (Abb. 11.B). Da CBD auch an TRPV1 bindet (Lowin et al., 2016; Lowin und Straub, 2015), wurde CBD zusammen mit dem TRPV1-Antagonisten Capsazepine inkubiert. Hier zeigte sich keine Hemmung der Effekte von CBD (Abb. 11.C). Die einzelnen Gruppen wurden zwecks besserer Vergleichbarkeit innerhalb einer Grafik dargestellt (Abb. 11.D).

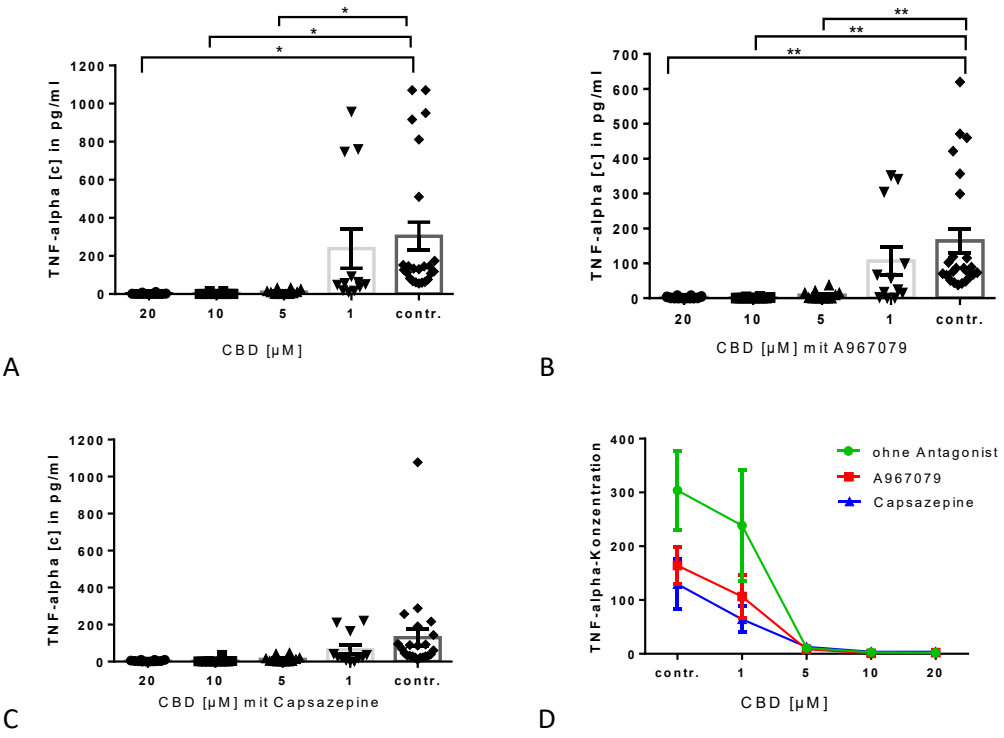
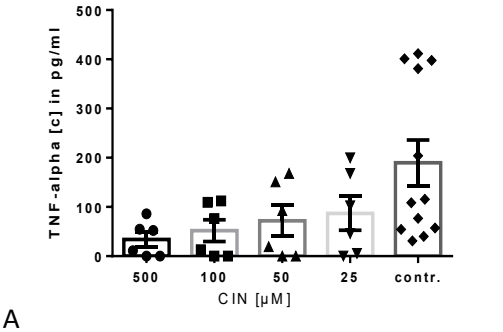


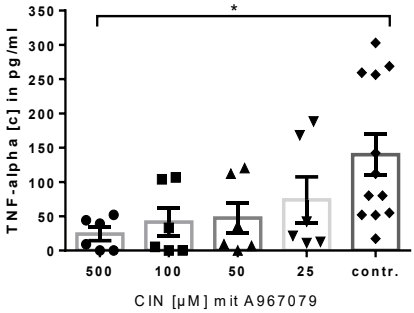
Abb. 11: Einfluss von CBD auf die TNF-alpha-Produktion
Untersucht wurden TNF-alpha-Konzentrationen in vier unabhängigen Versuchen (N = 4) mit je drei Replikaten pro Konzentration des Agonisten bzw. der Kontrollgruppen (n = 3). Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der one-way ANOVA sowie dem Tukey's multiple comparisons Test. Das Signifikanzniveau war *p = 0,05. Die Fehlerbalken zeigen den Mittelwert (Mean) ± SEM.
(A–C) TNF-alpha-Konzentration in Abhängigkeit der CBD-Konzentration (CBD [c] = 1–20 µM) ohne Hinzugabe von Antagonisten (A), mit Hinzugabe der Antagonisten A967079 (B) und Capsazepine (C).
(D) Liniengrafik zum direkten Vergleich der drei Bedingungen aus A, B, und C (Mean ± SEM).

b) Einfluss von CIN auf die TNF-alpha-Produktion

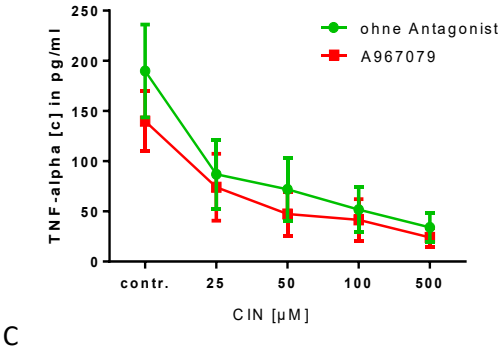
Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen CIN-Konzentrationen zur Kontrollgruppe ($p > 0,05$) (vgl. Abb. 12.A). Allerdings zeigte die ANOVA einen statistisch signifikanten, inhibierenden Einfluss von CIN auf die TNF-alpha-Produktion unabhängig der eingesetzten Konzentrationen ($p = 0,0333$). Dieser Effekt konnte mit dem Antagonisten A967079 nicht inhibiert werden (vgl. Abb. 12.B). Der Graph C verdeutlicht den Vergleich der beiden Gruppen.



A



B



C

Abb. 12: Einfluss von CIN auf die TNF-alpha-Produktion
Untersucht wurden TNF-alpha-Konzentrationen in drei unabhängigen Versuchen (N = 3) mit je zwei Replikaten pro Konzentration des Agonisten bzw. der Kontrollgruppen (n = 2). Es wurden im Tukey's multiple comparisons Test die einzelnen CIN-Konzentrationen mit der Kontrollgruppe verglichen, als auch eine ANOVA berechnet. Das Signifikanzniveau lag bei *p = 0,05. Die Fehlerbalken zeigen den Mittelwert (Mean) ± SEM.
(A, B) TNF-alpha-Konzentration in Abhängigkeit der CIN-Konzentration (CIN [c] = 25–500 µM) ohne Hinzugabe eines Antagonisten (A) und unter Hinzugabe des Antagonisten A967079 (B).
(C) Liniengrafik zum direkten Vergleich der zwei Bedingungen aus A und B (Mean ± SEM).

c) Einfluss von Polygodial auf die TNF-alpha-Produktion

Polygodial nahm keinen Einfluss auf die TNF-alpha-Produktion, da in der ANOVA kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Polygodial-Konzentrationen und der Kontrollgruppe nachgewiesen wurde ($p = 0,9255$) (vgl. Abb. 13.A). Die Inkubation der B-Zellen mit den Antagonisten A967079 ($p = 0,7138$) und Capsazepine ($p = 0,5961$)

zeigten keinen gegenteiligen Effekt auf die TNF-alpha-Produktion (vgl. Abb. 13.B und C). Aufgrund besserer Vergleichbarkeit wurden die TNF-alpha-Konzentrationen unter Hinzugabe der beiden Antagonisten für alle Polygodial-Konzentrationen im Graph D dargestellt.

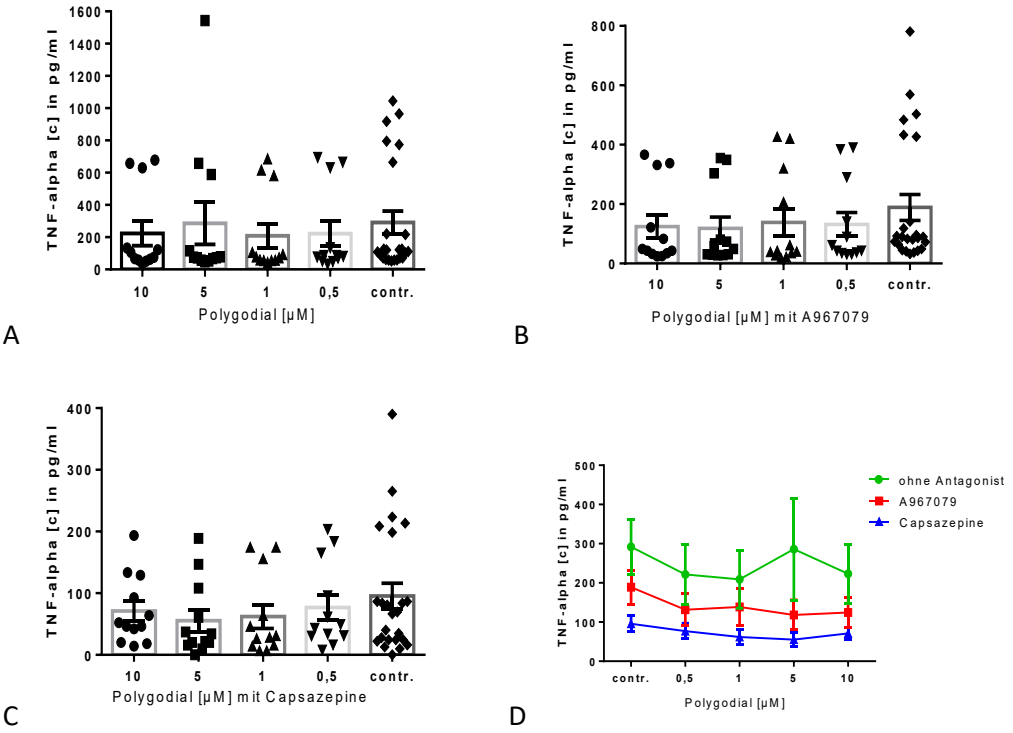


Abb. 13: Einfluss von Polygodial auf die TNF-alpha-Produktion
Untersucht wurden TNF-alpha-Konzentrationen in vier unabhängigen Versuchen (N = 4) mit je drei Replikaten pro Konzentration des Agonisten bzw. der Kontrollgruppen (n = 3). Es wurden im Tukey's multiple comparisons Test die einzelnen Polygodial-Konzentrationen mit der Kontrollgruppe verglichen, als auch eine ANOVA berechnet. Das Signifikanzniveau war *p = 0,05. Die Fehlerbalken zeigen den Mittelwert (Mean) ± SEM.
(A–C) TNF-alpha-Konzentration in Abhängigkeit der Polygodial-Konzentration (Polygodial [c] = 0,5–10 µM) ohne Hinzugabe eines Antagonisten (A) und unter Hinzugabe der Antagonisten A967079 (B) und Capsazepine (C).
(D) Liniengrafik zum direkten Vergleich der drei Bedingungen aus A, B, und C (Mean ± SEM).

d) Vergleich der Agonisten untereinander in Bezug auf die Modulation der TNF-alpha-Produktion

Beim Vergleich der höchsten eingesetzten Konzentrationen von CBD, Polygodial und CIN in Bezug auf die Modulation der TNF-Produktion, zeigten sich nur zwischen CBD und Polygodial statistisch signifikante Unterschiede (Abb. 14, p = 0,01). Die Behandlung mit Polygodial wies im Vergleich zu CBD höhere TNF-alpha-Konzentrationen auf (CBD: Mean = 1,8; Poly: Mean = 223,2).

Insgesamt ließ sich in der ANOVA grundsätzlich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zeigen (p = 0,0085).

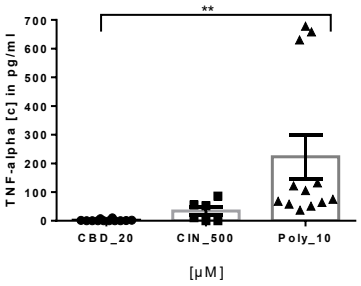


Abb. 14: Vergleich der Agonisten untereinander in Bezug auf die TNF-alpha-Produktion
Die Daten wurden mithilfe einer one-way ANOVA und eines Tukey's multiple comparisons Test statistisch ausgewertet. Das Signifikanzniveau war *p = 0,05. Die Fehlerbalken zeigen den Mittelwert (Mean) ± SEM.
Der Vergleich zwischen CBD (20 µM) und Polygodial (10 µM) zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied in der TNF-alpha-Konzentration (p = 0,01).

e) Einfluss der Antagonisten A967079 und Capsazepine auf die TNF-alpha-Produktion

Der Vergleich der Antagonisten zur Kontrollgruppe zeigte, dass sowohl A967079 als auch Capsazepine die TNF-alpha-Produktion signifikant senkten (A967079: p = 0,05; Capsazepine: p = 0,01).

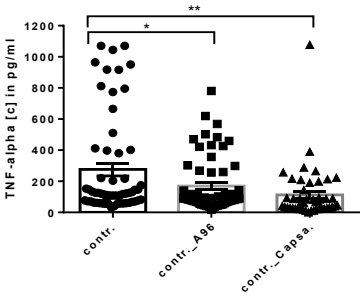


Abb. 15: Einfluss der Antagonisten A967079 und Capsazepine auf die TNF-alpha-Produktion
Vergleich der TNF-alpha-Produktion zwischen der Kontrollgruppe und der Kontrollgruppe mit Inkubation eines Antagonisten. Untersucht wurden TNF-alpha-Konzentrationen in vier unabhängigen Versuchen (N = 4) mit je neun Replikaten pro Bedingung (n = 9). Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe der one-way ANOVA und dem Tukey's multiple comparisons Test. Das Signifikanzviveau lag bei *p = 0,05. Die Fehlerbalken zeigen den Mittelwert (Mean) ± SEM.

3.2.2 Einfluss der Agonisten und Antagonisten auf die IL-10-Produktion

Neben der TNF-alpha-Konzentration wurde im gleichen Versuchsaufbau die IL-10-Ausschüttung gemessen. Das Zytokin IL-10 stellt in der rheumatoiden Arthritis (RA) eine zentrale Rolle in der Pathogenese dar. So konnte bei seropositiven RA-Patienten ein erhöhter IL-10-Spiegel gemessen werden (Hernández-Bello et al., 2017). IL-10 nimmt Einfluss auf die Regulation verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine, die in der RA zur Entzündungsreaktion beitragen. Außerdem konnten IL-10-Proteine in immunhistologischen Untersuchungen von Biopsien aus der Synovialmembran nachgewiesen werden (Katsikis et al., 1994). Aufgrund des bekannten Einflusses von IL-10 auf RA wurden in dieser Arbeit die Zusammenhänge der IL-10-Konzentrationen durch Behandlung der B-Zellen mit Liganden des TRPA1-Kanals untersucht.

a) Einfluss von CBD auf die IL-10-Produktion

CBD reduzierte die IL-10-Produktion von B-Zellen signifikant (vgl. Abb. 16.A) ($p = 0{,}0001$ für CBD [c] = 20 µM, 10 µM und 5 µM; $p = 0{,}05$ für CBD [c] = 1 µM).

Dieser Effekt konnte mit den Antagonisten A967079 und Capsazepine nicht inhibiert werden (vgl. Abb. 16.B und C). Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Ergebnisse in einer Grafik dargestellt (vgl. Abb. 16.D).

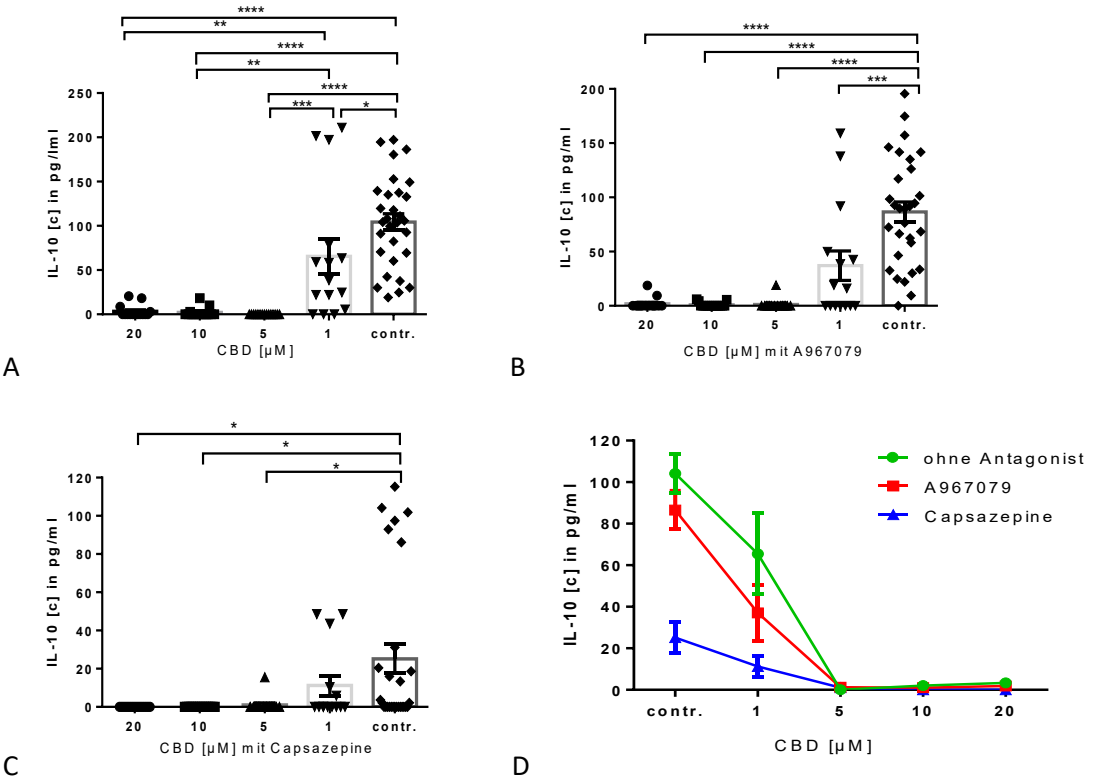
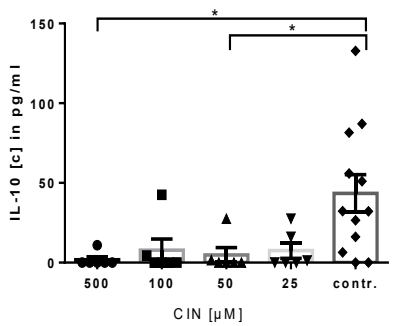


Abb. 16: Einfluss von CBD auf die IL-10-Produktion

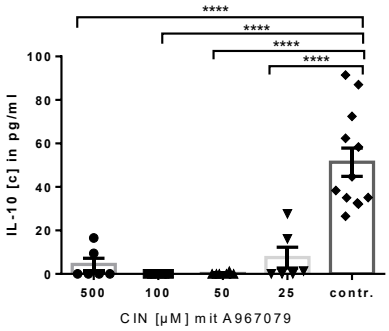
Untersucht wurden IL-10-Konzentrationen in vier unabhängigen Versuchen (N = 4) mit je drei Replikaten pro Konzentration des Agonisten bzw. der Kontrollgruppen (n = 3). Der Vergleich zwischen den unterschiedlichen CBD-Konzentrationen zur Kontrollgruppe erfolgte mittels einer one-way ANOVA und Tukey's multiple comparisons Test. Das Signifikanzniveau lag bei *p = 0,05. Die Fehlerbalken zeigen den Mittelwert (Mean) ± SEM.
(A–C) Vergleich der IL-10-Konzentrationen zwischen CBD-Konzentrationen (CBD [c] = 1–20 µM) und der Kontrollgruppe ohne Antagonisten (A) und mit den Antagonisten A967079 (B) und Capsazepine (C).
(D) Liniengrafik zum direkten Vergleich der drei Bedingungen aus A, B, und C (Mean ± SEM).

b) Einfluss von CIN auf die IL-10-Produktion

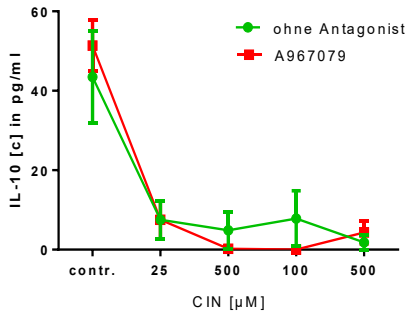
CIN senkte die IL-10-Produktion im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant (p = 0,05 für CIN [c] = 500 µM und 50 µM) (vgl. Abb. 17.A). Bei einer CIN-Konzentration von 100 µM bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle. Dies kann allerdings durch den einzelnen nicht erklärbaren Ausreißer beeinflusst sein. Der Antagonist des TRPA1-Kanals A967079 inhibierte den Effekt von CIN nicht (vgl. Abb. 17.B). In Abb. 17.D wurden die Ergebnisse zur besseren Vergleichbarkeit gegenübergestellt.



A



B



C

Abb. 17: Einfluss von CIN auf die IL-10-Produktion

Untersucht wurden IL-10-Konzentrationen in drei unabhängigen Versuchen (N = 3) mit je zwei Replikaten pro Konzentration des Agonisten bzw. der Kontrollgruppen (n = 2). Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der one-way ANOVA sowie dem Tukey's multiple comparisons Test. Das Signifikanzniveau war *p = 0,05. Die Fehlerbalken zeigen den Mittelwert (Mean) ± SEM.
(A, B) Vergleich der produzierten IL-10-Menge nach Inkubation mit verschiedenen CIN-Konzentrationen (CIN [c] = 25–500 µM) zur Kontrollgruppe (contr.) ohne Antagonisten (A) und mit dem Antagonisten A967079 (B).
(C) Liniengrafik zum direkten Vergleich der zwei Bedingungen aus A und B (Mean ± SEM).

c) Einfluss von Polygodial auf die IL-10-Produktion

Polygodial nahm keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die IL-10-Produktion ($p = 0{,}8244$) (vgl. Abb. 18.A). Es zeigten sich zudem keine Veränderungen in der produzierten IL-10-Menge bei gleichzeitiger Inkubation der B-Zellen mit den Antagonisten A967079 und Capsazepine (vgl. Abb. 18.B und C). Diese Ergebnisse wurden zur besseren Darstellbarkeit in Abb. 18.D verglichen.

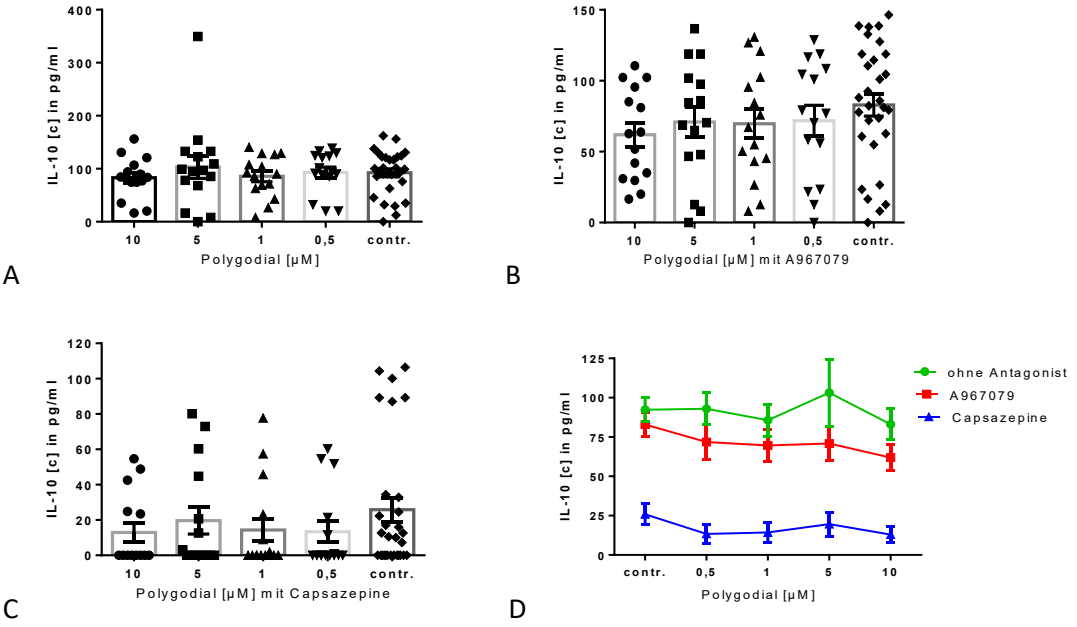


Abb. 18: Einfluss von Polygodial auf die IL-10-Produktion
Untersucht wurden IL-10-Konzentrationen in vier unabhängigen Versuchen (N = 4) mit je drei Replikaten pro Konzentration des Agonisten bzw. der Kontrollgruppen (n = 3). Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels one-way ANOVA und Tukey's multiple comparisons Test. Das Signifikanzniveau lag bei *p = 0,05. Die Fehlerbalken zeigen den Mittelwert (Mean) ± SEM.
(A-C) Vergleich der IL-10-Konzentrationen zwischen der Inkubation der B-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Polygodial (Polygodial [c] = 0,5–10 µM) zur Kontrollgruppe ohne Hinzugabe von Antagonisten (A) und unter Hinzugabe der Antagonisten A967079 (B) und Capsazepine (C).
(D) Liniengrafik zum direkten Vergleich der drei Bedingungen aus A, B, und C (Mean ± SEM).

d) Vergleich der Agonisten untereinander in Bezug auf die Modulation der IL-10-Produktion

Wurden die höchsten eingesetzten Konzentrationen der Agonisten CBD, CIN und Polygodial bezüglich des Einflusses auf die IL-10-Produktion verglichen, so zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen CBD und Polygodial sowie CIN und Polygodial ($p = 0{,}0001$) (vgl. Abb. 19). Dabei konnten bei Polygodial im Vergleich zu CBD und CIN höhere IL-10-Konzentrationen gemessen werden (CBD: Mean = 3,352; CIN:

Mean = 1,815; Poly: Mean = 83,06). Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen CBD [c] = 20 µM und CIN [c] = 500 µM (p > 0,05) gezeigt werden.

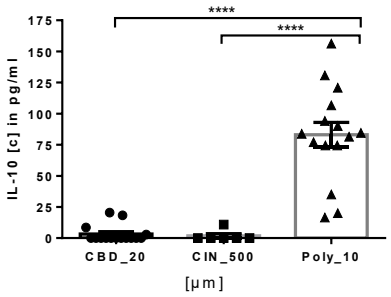


Abb. 19: Vergleich der Agonisten untereinander in Bezug auf Modulation der IL-10-Produktion
Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA und Tukey's multiple comparisons Test. Das Signifikanzniveau war *p = 0,05. Die Fehlerbalken zeigen den Mittelwert (Mean) ± SEM.

e) Einfluss der Antagonisten A967079 und Capsazepine auf die IL-10-Produktion

Der Antagonist Capsazepine senkte die IL-10-Produktion im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant (p = 0,0001). Im Gegensatz dazu nahm der Antagonist A967079 keinen Einfluss auf die IL-10-Produktion (p > 0,05).

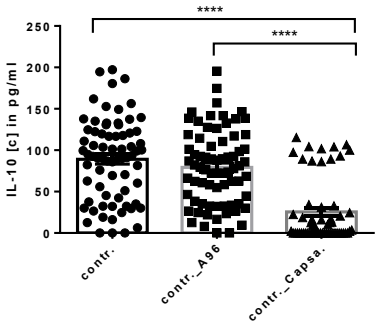


Abb. 20: Einfluss der Antagonisten A967079 und Capsazepine auf die IL-10-Produktion
Vergleich der IL-10-Produktion der Antagonisten A967079 und Capsazepine mit der Kontrollgruppe. Es wurde eine ANOVA sowie ein Tukey's multiple comparisons Test berechnet. Untersucht wurden IL-10-Konzentrationen in vier unabhängigen Versuchen (N = 4) mit je neun Replikaten pro Bedingung (n = 9). Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe einer one-way ANOVA und Tukey's multiple comparisons Test. Das Signifikanzniveau lag bei *p = 0,05. Die Fehlerbalken zeigen den Mittelwert (Mean) ± SEM.

3.3 Einfluss der TRPA1-Liganden auf das Überleben von CD19-positiven B-Zellen

In diesem Versuch wurde der Einfluss von TRPA1 auf das Überleben von murinen CD19-pos. B-Zellen getestet. Durch Färbung der B-Zellen mit Annexin V/PI konnten lebende

von früh-apoptotischen, spät-apoptotischen und nekrotischen Zellen unterschieden werden. In den nachfolgenden Kapiteln 3.3.1–3.3.3 sind in den Graphen A–D die Anteile der lebenden, früh-apoptotischen, spät-apoptotischen sowie nekrotischen CD19-pos. B-Zellen an der Gesamt-Population der gemessenen CD19-pos. B-Zellen nach den unterschiedlichen Konzentrationen der Agonisten CBD, CIN und Polygodial dargestellt.

In der statistischen Auswertung wurden die unterschiedlichen Konzentrationen der Agonisten in einer Gruppe zusammengefasst und mit der Kontrollgruppe verglichen (vgl. Graph E–H). In der Gruppe mit Inkubation der Agonisten ist die vierfache Anzahl an Messergebnissen (vier verschiedene Konzentrationen) vorzufinden, verglichen mit der Kontrollgruppe (n = 4). Es lagen Ergebnisse von sieben unabhängigen Versuchen vor (N = 7). In den Graphen wurde jeweils der prozentuale Anteil der lebenden, früh-apoptotischen, spät-apoptotischen und nekrotischen Zellen an der Gesamt-Population der CD19-pos. B-Zellen dargestellt.

3.3.1 Einfluss von CBD auf das Überleben CD19-pos. B-Zellen

Es konnte nachgewiesen werden, dass CBD konzentrationsunabhängig das Überleben der CD19-pos. B-Zellen reduziert (p = 0,0141) (vgl. Abb. 21.E grüner Graph).

Der größte Anteil CD19-pos. B-Zellen zeigte sich in der früh-apoptotischen Phase (vgl. Abb. 21.F: CBD: Mean ± SEM: 72,84 ± 1,61; contr.: Mean ± SEM: 64,31 ± 4,13). In dieser Gruppe war der Anteil der B-Zellen, die mit CBD inkubiert wurden, größer als der der Kontrollgruppe (p = 0,0114) (vgl. Abb. 21.F). In der späten Apoptose befand sich der zweitgrößte Anteil der B-Zellen (Abb. 21.G: CBD: Mean ± SEM: 19,28 ± 1,11; contr.: Mean ± SEM: 19,04 ± 1,90). Dabei bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen CBD und der Kontrollgruppe in der Phase der späten Apoptose (p = 0,3986). Sowohl in der CBD-behandelten Population der B-Zellen als auch in der Kontrollgruppe konnte nur ein geringer Teil nekrotischer Zellen nachgewiesen werden (Abb. 21.H: CBD: Mean ± SEM: 0,70 ± 0,14; contr.: Mean ± SEM: 0,75 ± 0,17). Auch hier bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den mit CBD-inkubierten B-Zellen und der Kontrollgruppe (p = 0,7952).

Im Hinblick auf die Antagonisten konnte keine Inhibition des Effekts von CBD nachgewiesen werden. Die Graphen, die die B-Zell-Populationen mit Inkubation der Antagonisten darstellen (rot, blau, orange) verlaufen annähernd parallel zu dem Graphen der B-Zell-Population ohne Antagonist (grün) (vgl. Abb. 21.E–H).

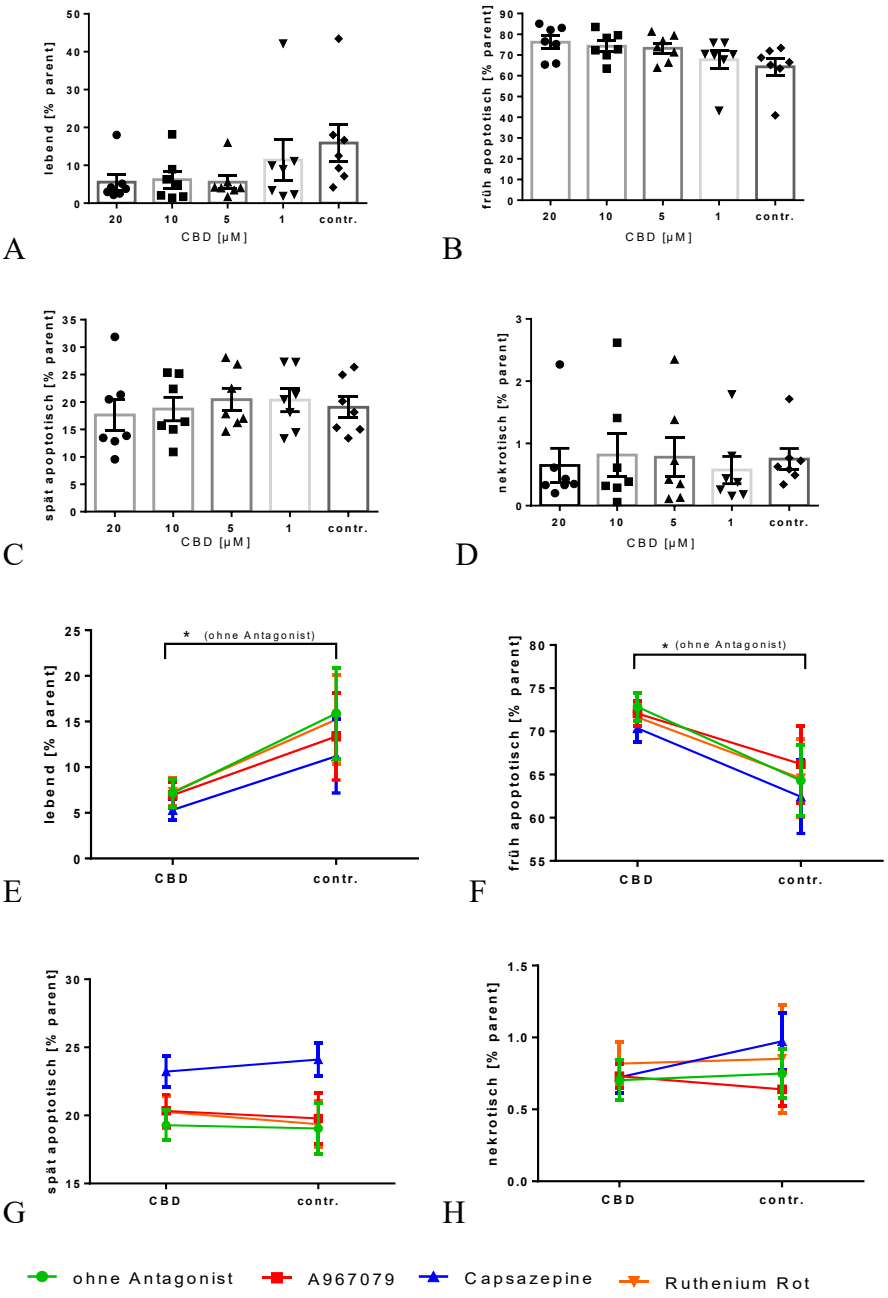


Abb. 21: Einfluss von CBD auf das Überleben CD19-pos. B-Zellen

(A–D) Anteil lebender (A), früh-apoptotischer (B), spät-apoptotischer (C) und nekrotischer (D) B-Zellen unter dem Einfluss von CBD (0–20µM). Gezeigt sind die Ergebnisse von sieben unabhängigen Versuchen (n = 7). Die Fehlerbalken zeigen den Mittelwert (Mean) ± SEM.

(E–H) Vergleich der prozentualen Anteile der lebenden (E), früh-apoptotischen (F), spät-apoptotischen (G) und nekrotischen (H) B-Zellen unter Kontrollbedingungen, CBD Stimulation (Konzentrationen 1µM-20 µM zusammengefasst) und unter Zugabe der angezeigten Antagonisten (farbkodiert). Der Vergleich zwischen Agonisten und Kontrollgruppe erfolgte über einen t-Test, der Vergleich der Antagonisten zur Kontrollgruppe über eine one-way ANOVA und einem Tukey's multiple comparisons Test. Das Signifikanzniveau war *p = 0,05. Die Fehlerbalken zeigen den Mittelwert (Mean) ± SEM.

3.3.2 Einfluss von CIN auf das Überleben von CD19-pos. B-Zellen

Es konnte nachgewiesen werden, dass CIN den Anteil lebender CD19-pos. B-Zellen reduzierte ($p = 0,0273$) (vgl. Abb. 22.E). Der größte Anteil der CD19-pos. B-Zellen zeigte sich in der früh-apoptotischen Population (Abb. 22.F: CIN: Mean ± SEM: 70,24 ± 1,72; contr.: Mean ± SEM: 64,31 ± 4,13). In dieser Gruppe war der Anteil der B-Zellen, die mit CIN inkubiert wurden, größer als der der Kontrollgruppe, auch wenn nicht auf einem statistisch signifikanten Niveau ($p = 0,1159$). Der zweitgrößte Anteil der CD19-pos. B-Zellen befand sich in der späten Apoptose (Abb. 22.G: CIN: Mean ± SEM: 20,56 ± 0,88; contr.: Mean ± SEM: 18,36 ± 1,66). In dieser Gruppe bestand ein signifikanter Unterschied zwischen CIN und der Kontrollgruppe ($p = 0,0132$). Allgemein konnte nur ein geringer Anteil der B-Zellen in der Nekrose nachgewiesen werden (Abb. 22.H: CIN: Mean ± SEM: 1,02 ± 0,34; contr.: Mean ± SEM: 0,75 ± 0,17). In der nekrotischen-Population waren keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen CIN und der Kontrollgruppe auszumachen ($p = 0,6946$)).

In Bezug auf den Antagonisten des TRPA1-Kanals A967079 konnten die Effekte von CIN nicht inhibiert werden. In allen vier Gruppen zeigten sich ähnliche Tendenzen zwischen der B-Zell-Population mit und ohne Inkubation des Antagonisten A967079. Ein gegenteiliger Effekt bestand nicht.

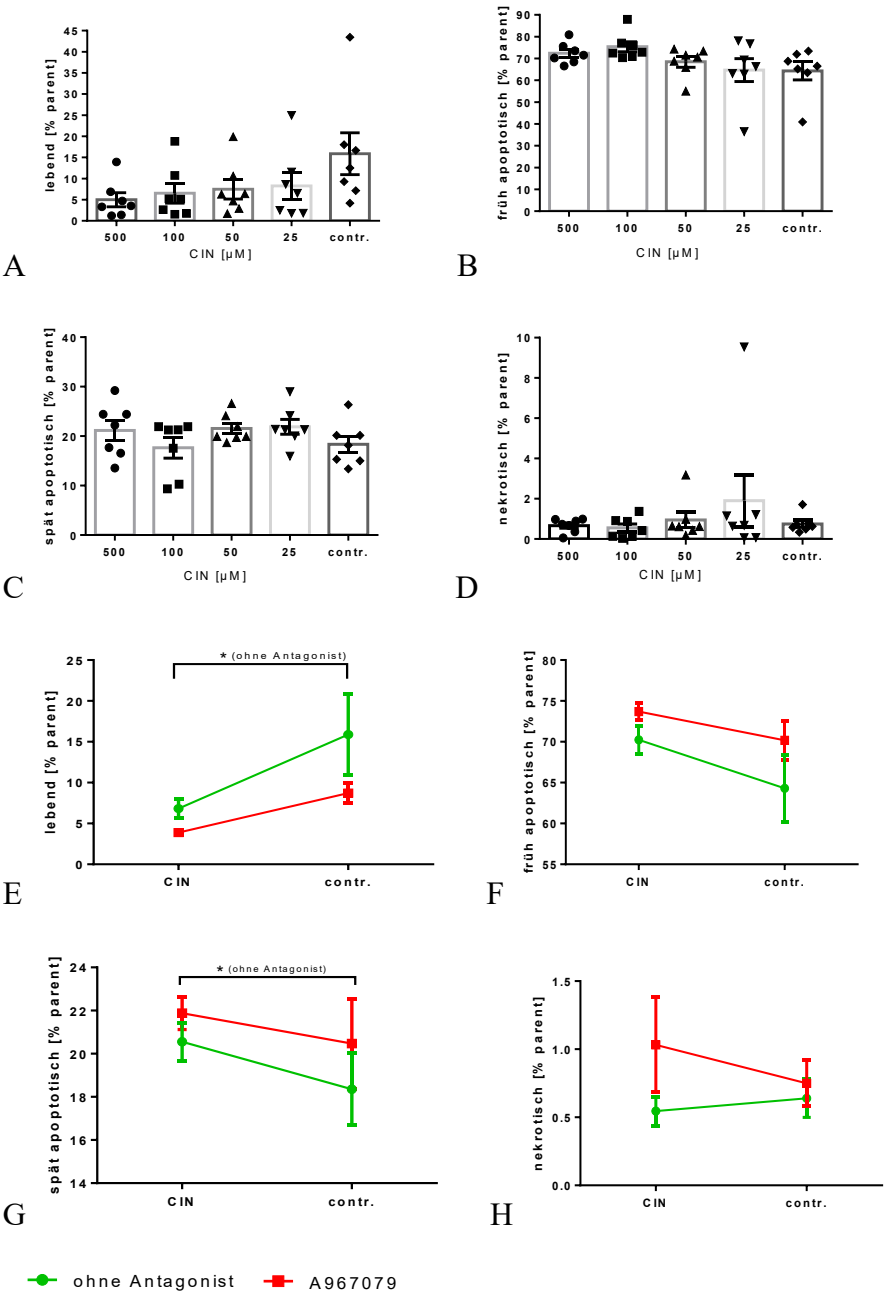


Abb. 22: Einfluss von CIN auf das Überleben CD19-pos. B-Zellen

(A–D) Anteil lebender (A), früh-apoptotischer (B), spät-apoptotischer (C) und nekrotischer (D) B-Zellen unter dem Einfluss von CIN (0–500 µM). Gezeigt sind die Ergebnisse von sieben unabhängigen Versuchen (n = 7). Die Fehlerbalken zeigen den Mittelwert (Mean) ± SEM.

(E–H) Vergleich der prozentualen Anteile der lebenden (E), früh-apoptotischen (F), spät-apoptotischen (G) und nekrotischen (H) B-Zellen unter Kontrollbedingungen, CIN Stimulation (Konzentrationen 25–500 µM zusammengefasst) und unter Zugabe der angezeigten Antagonisten (farbkodiert). Der Vergleich zwischen Agonisten und Kontrollgruppe erfolgte über einen t-Test, der Vergleich der Antagonisten zur Kontrollgruppe über eine one-way ANOVA und einem Tukey's multiple comparisons Test. Das Siginfikanzniveau war *p < 0,05. Die Fehlerbalken zeigen den Mittelwert (Mean) ± SEM.

3.3.3 Einfluss von Polygodial auf das Überleben CD19-pos. B-Zellen

Polygodial nahm keinen Einfluss auf das Überleben CD19-pos. B-Zellen. Es wurden in keiner der vier Gruppen statistisch signifikante Unterschiede zwischen der B-Zell-Population unter Inkubation mit Polygodial zur Kontrollgruppe gemessen (vgl. Abb. 23: E: $p = 0{,}7791$; F: $p = 0{,}8365$; G: $p = 0{,}7932$; H: $p = 0{,}7870$). Der größte Anteil der gemessenen CD19-pos. B-Zellen befand sich in der frühen Apoptose (Abb. 23.F: Poly: Mean ± SEM: 63,15 ± 2,13, contr.: Mean ± SEM: 64,19 ± 4,09). Nur ein sehr geringer Anteil war in der Nekrose vorzufinden (Abb. 23.H: Poly: Mean ± SEM: 0,82 ± 0,12; contr.: Mean ± SEM: 0,75 ± 0,17). Die restlichen B-Zellen der CD19-pos. Zell-Population waren ungefähr zur Hälfte in der Lebend-Population und der spät-apoptotischen-Population aufgeteilt (vgl. Abb. 23.E und G).

Im Hinblick auf die Antagonisten wurde kein gegenteiliger Effekt zur reinen Inkubation der B-Zellen mit den Agonisten gezeigt. Lediglich in der Population der spät-apoptotischen B-Zellen mit Polygodial-Stimulation zeigte sich ein größerer Anteil der B-Zellen bei gleichzeitiger Inkubation mit Capsazepine im Vergleich zu den B-Zellen ohne Antagonisten (vgl. Graph G; $p = 0{,}05$).

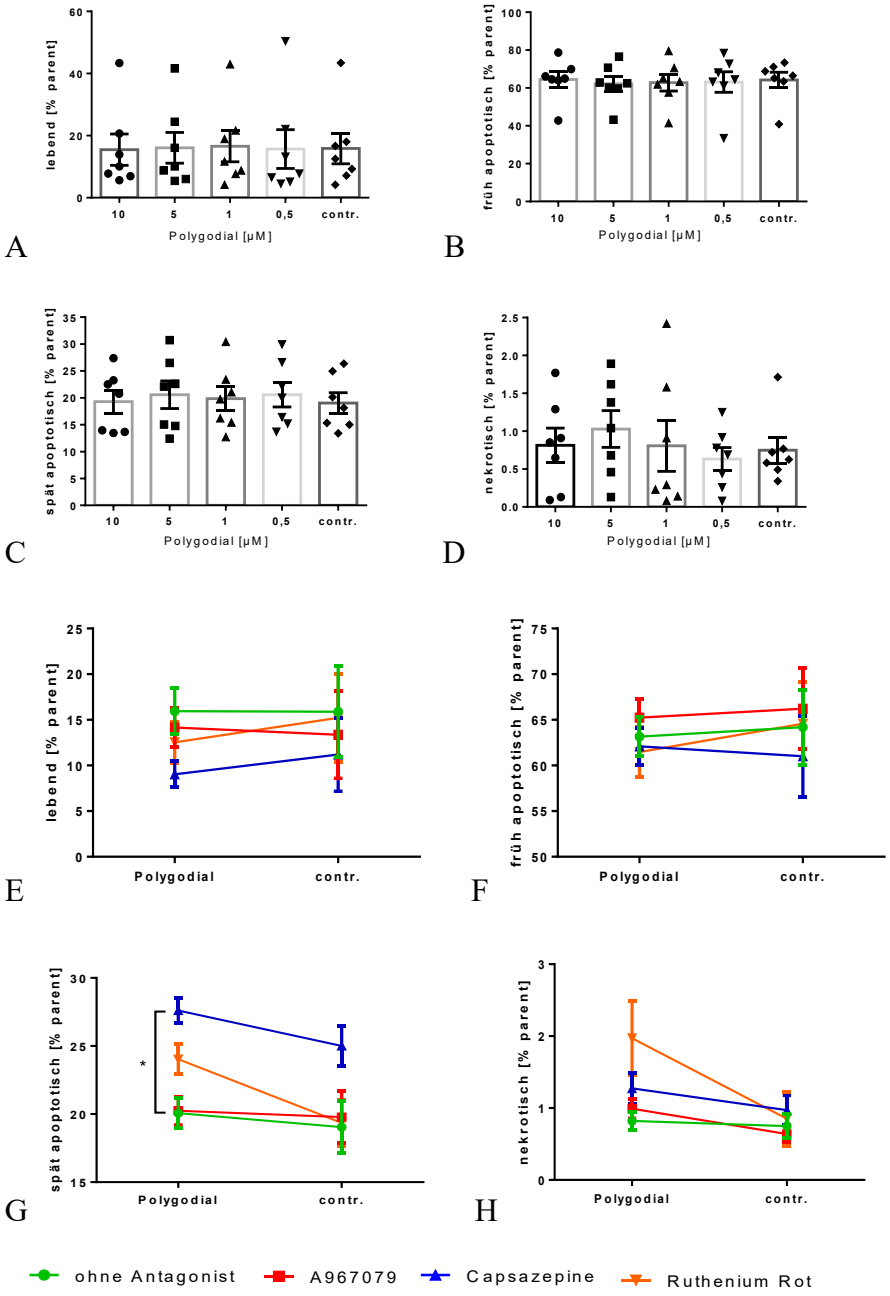


Abb. 23: Einfluss von Polygodial auf das Überleben von CD19-pos. B-Zellen
(A–D) Anteil lebender (A), früh-apoptotischer (B), spät-apoptotischer (C) und nekrotischer (D) B-Zellen unter dem Einfluss von Polygodial (0–10 µM). Gezeigt sind die Ergebnisse von sieben unabhängigen Versuchen (n = 7). Die Fehlerbalken zeigen den Mittelwert (Mean) ± SEM.
(E–H) Vergleich der prozentualen Anteile der lebenden (E), früh-apoptotischen (F), spät-apoptotischen (G) und nekrotischen (H) B-Zellen unter Kontrollbedingungen, Polygodial-Stimulation (Konzentrationen 0,5–10 µM zusammengefasst) und unter Zugabe der angezeigten Antagonisten (farbkodiert). Der Vergleich zwischen Agonisten und Kontrollgruppe erfolgte über einen t-test, der Vergleich der Antagonisten zur Kontrollgruppe über eine one-way ANOVA und einem Tukey's multiple comparisons Test. Das Signifikanzniveau war *p = 0,05. Die Fehlerbalken zeigen den Mittelwert (Mean) ± SEM.

3.3.4 Einfluss der Antagonisten auf das Überleben CD19-pos. B-Zellen

In einem letzten Vergleich wurden B-Zellen, die rein mit Antagonisten behandelt wurden, mit unbehandelten B-Zellen verglichen (Abb. 24). Es zeigte sich, dass der TRPA1-Antagonist A967079, der pan-TRP-Antagonist Ruthenium Rot sowie der Antagonist des TRPV1-Kanals Capsazepine per se keinen direkten Einfluss auf das Überleben der CD19-pos. B-Zellen nahmen ($p > 0,05$).

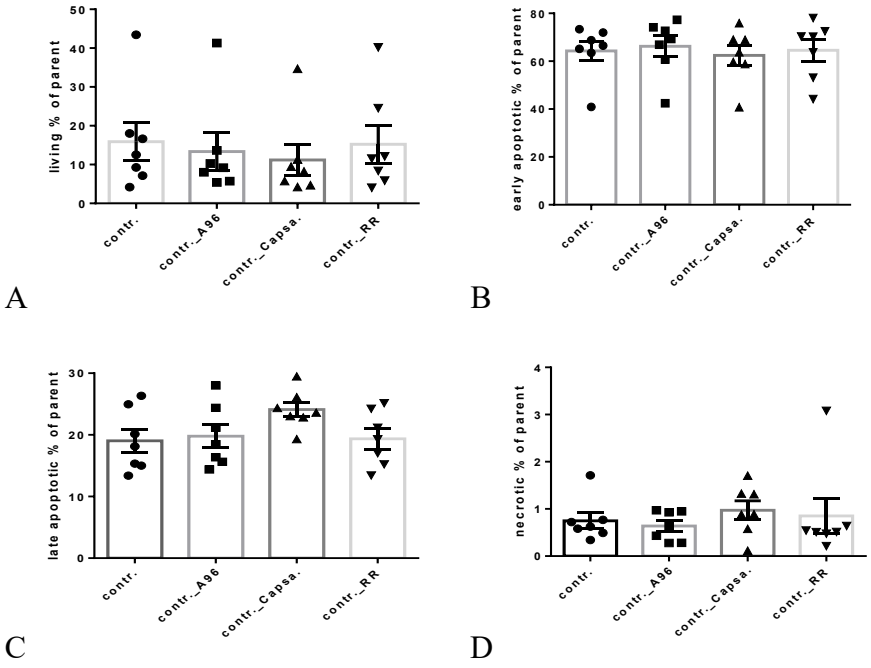


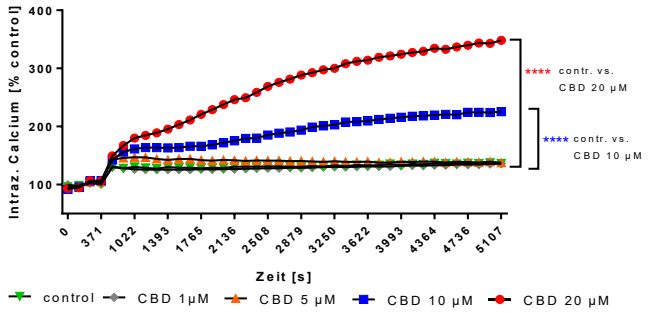
Abb. 24: Einfluss der Antagonisten auf das Überleben CD19-pos. B-Zellen
In die statistische Analyse gingen Ergebnisse sieben unabhängiger Versuche (N = 7) ein. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer one-way ANOVA sowie mit Tukey's multiple comparisons Tests. Verglichen wurden die Kontrollgruppen miteinander, die ohne oder mit Antagonisten stimuliert wurden. Das Signifikanzniveau war *p = 0,05. Die Fehlerbalken zeigen den Mittelwert (Mean) ± SEM.
(A–D) Anteil der lebenden (A), früh-apoptotischen (B), spät-apoptotischen (C) und nekrotischen B-Zellen (D) an der Gesamt-Population der CD19-pos. B-Zellen.

3.4 Messung des intrazellulären Kalziums nach Stimulation der B-Zellen mit TRPA1-Liganden

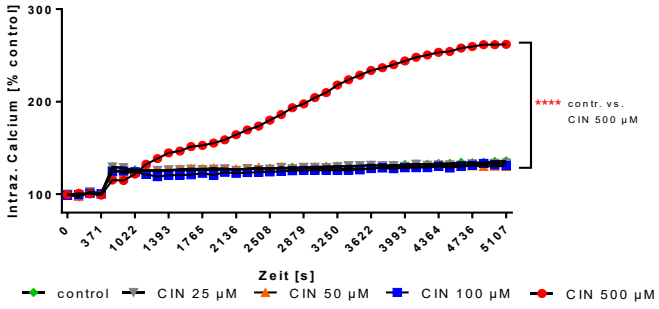
TRPA1 ist ein Ionen-Kanal, der für Kalzium permeabel ist (Horváth et al., 2016). Bei Fibroblasten wurde bereits gezeigt, dass eine Stimulation der Fibroblasten mit TRPA1-Agonisten zu einer Erhöhung des intrazellulären (intraz.) Kalziums führt (Lowin et al., 2020). In dieser Arbeit erfolgte die Untersuchung des intraz. Kalziums nach Stimulation mit TRPA1-Liganden an CpG/anti-IgM stimulierten CD19-pos. B-Zellen.

3.4.1 Beeinflussung des intraz. Kalziums durch TRPA1-Liganden

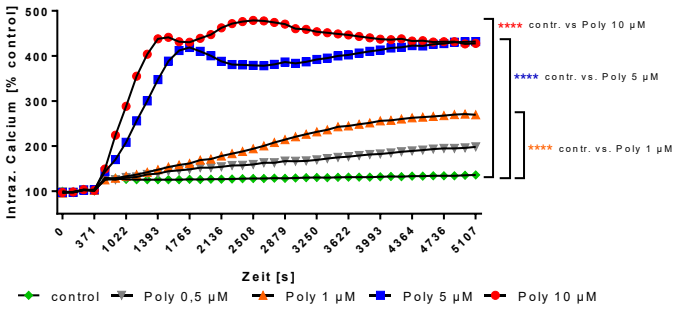
In CD19-pos. B-Zellen erhöhte CBD die intraz. Ca^{2+}-Spiegel in den Konzentration 10 µM und 20 µM signifikant ($p = 0{,}0001$; Abb. 25.A), während geringere CBD-Konzentrationen keinen signifikanten Einfluss zeigten. Bei CIN wurde ab einer Konzentration von 500 µM eine signifikante Erhöhung des intraz. Ca^{2+}-Spiegels gemessen ($p = 0{,}0001$) (vgl. Abb. 25.B). Geringere CIN-Konzentrationen wiesen keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe auf. Bei Polygodial wurden bei Konzentrationen über 1 µM signifikant höhere intraz. Ca^{2+}-Spiegel untersucht ($p = 0{,}0001$) und ab 5 µM stellte sich ein Plateau ein (vgl. Abb. 25.C).



A



B



C

Abb. 25: Beeinflussung des intraz. Kalziums durch TRPA1-Liganden
Einfluss von CBD (A), Zimtaldehyd (B) und Polygodial (C) auf die intraz. Kalziumspiegel in B-Zellen. Für die Versuche wurden CpG/Anti-IgM stim. B-Zellen in HBSS-Puffer (1 mM Ca^{2+}) verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer one-way ANOVA sowie Tukey's multiple comparisons Tests. Verglichen wurden die unterschiedlichen Konzentrationen der Agonisten zur Kontrollgruppe. Das Signifikanzniveau lag bei *$p = 0{,}05$.

3.4.2 Bestimmung des intrazellulären Ca^{2+}-Spiegels bei naiven vs. CpG/anti-IgM stimulierten B-Zellen sowie Einfluss von extrazellulärem Ca^{2+}

Im Vergleich zwischen CpG/anti-IgM stimulierten und naiven B-Zellen zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied bei den intraz. Ca^{2+}-Spiegeln bei Vorhandensein von extrazellulärem Ca^{2+} (HBSS). Dies galt sowohl für die Kontrollgruppe, als auch für die B-Zell-Populationen, die mit CBD, CIN und Polygodial inkubiert wurden (vgl. Abb. 26.A, C, E und G) (contr.: $p = 0{,}2337$; CBD: $p = 0{,}3235$; CIN: $p = 0{,}2573$; Polygodial: $p = 0{,}5695$).

Ohne das Vorhandensein von extrazellulärem Ca^{2+} (PBS) wurden signifikant geringere intraz. Ca^{2+}-Spiegel bei naiven B-Zellen im Vergleich zu stim. B-Zellen nachgewiesen (vgl. Abb. 26.B und D) (contr.: $p = 0{,}0006$; CBD: $p = 0{,}0439$). Dies galt bei B-Zell-Populationen der Kontrollgruppe sowie nach Inkubation mit CBD. Bei der Inkubation der B-Zellen mit CIN und Polygodial ergab sich kein signifikanter Unterschied im intraz. Ca^{2+}-Spiegel zwischen naiven und stim. B-Zellen (vgl. Abb. 26.F und H) (CIN: $p = 0{,}9727$; Polygodial: $p = 0{,}4634$).

Generell zeigte sich, dass der intraz. Ca^{2+}-Spiegel auch bei Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} (PBS) sowohl in der Kontrollgruppe als auch in den B-Zell-Populationen, die mit CBD, CIN und Polygodial inkubiert wurden, stieg (vgl. Abb. 26.B.D.E und F).

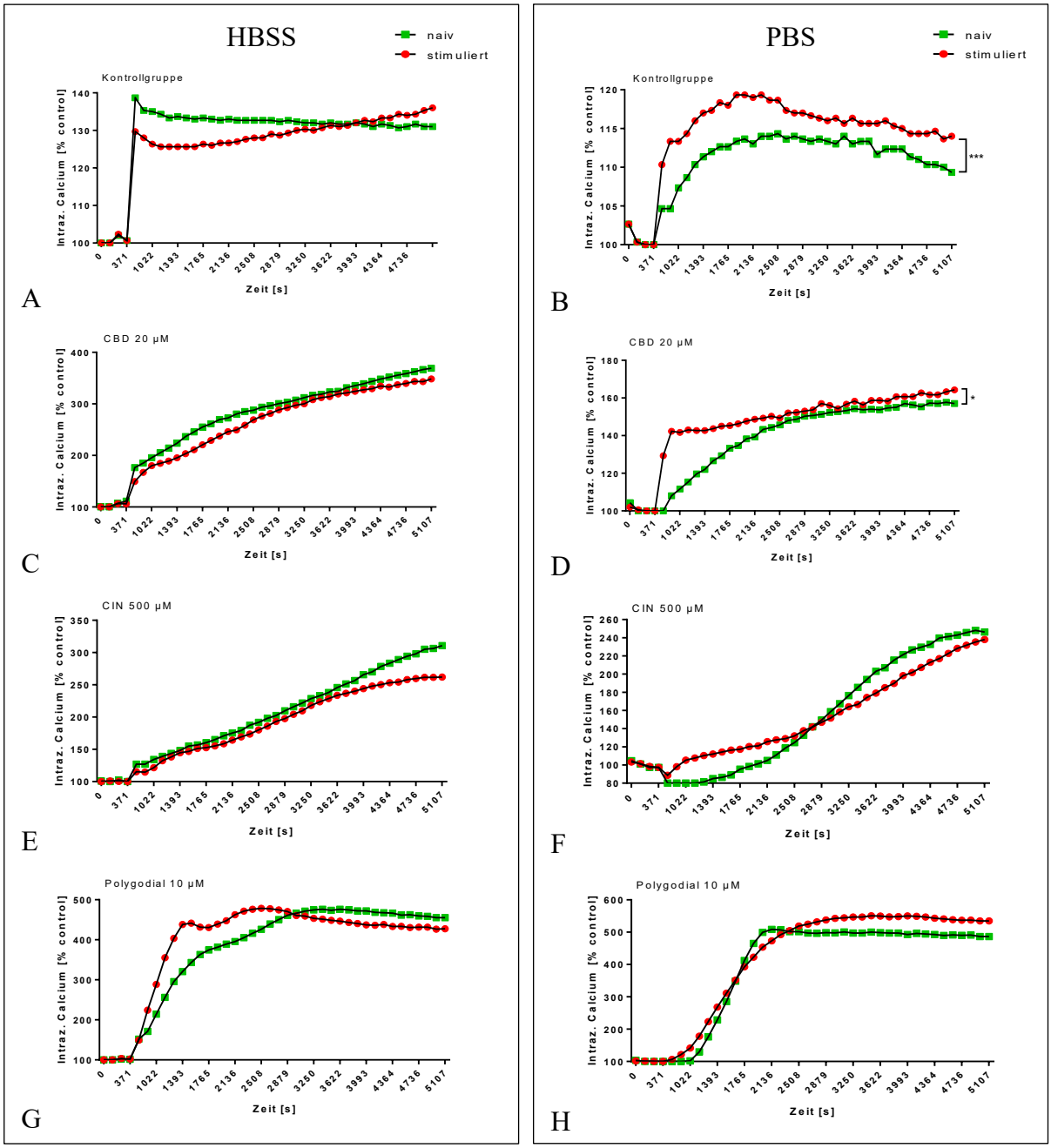


Abb. 26: Einfluss von extrazellulärem Ca^{2+} auf die intraz. Ca^{2+}-Spiegel bei naiven und CpG/anti-IgM stimulierten B-Zellen

Für die statistische Analyse wurde der t-Test verwendet. Das Signifikanzniveau war *p = 0,05.

(A, B) Vergleich des intraz. Ca^{2+} zwischen CpG/anti-IgM stimulierten und naiven B-Zellen unter Einfluss von extrazellulärem Ca^{2+} (HBSS, A) oder ohne extrazellulärem Ca^{2+} (PBS, B).

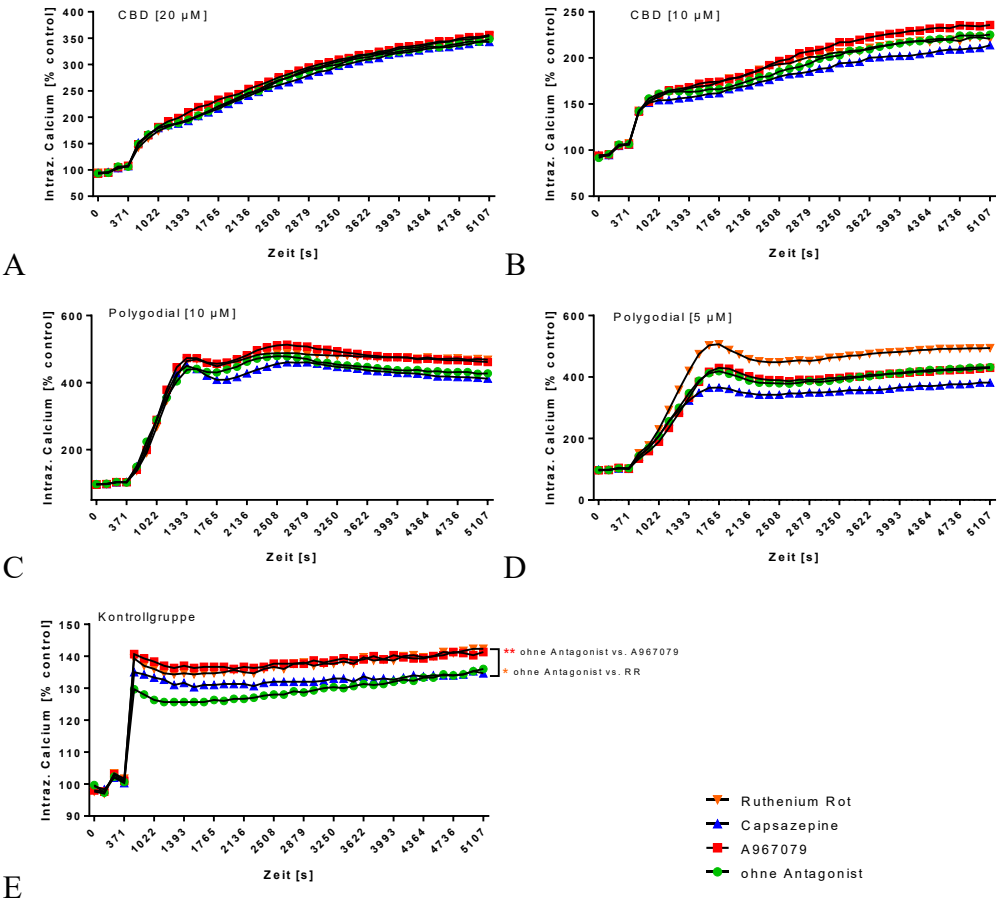
(C, D) Vergleich des intraz. Ca^{2+} zwischen CpG/anti-IgM stimulierten und naiven B-Zellen unter Einfluss von extrazellulärem Ca^{2+} (HBSS, C) oder ohne extrazellulärem Ca^{2+} (PBS, D) bei gleichzeitiger Inkubation mit CBD 20 µM.

(E, F) Vergleich des intraz. Ca^{2+} zwischen CpG/anti-IgM stimulierten und naiven B-Zellen unter Einfluss von extrazellulärem Ca^{2+} (HBSS, E) oder ohne extrazellulärem Ca^{2+} (PBS, F) bei gleichzeitiger Inkubation mit CIN 500 µM.

(G, H) Vergleich des intraz. Ca^{2+} zwischen CpG/anti-IgM stimulierten und naiven B-Zellen unter Einfluss von extrazellulärem Ca^{2+} (HBSS, G) oder ohne extrazellulärem Ca^{2+} (PBS, H) bei gleichzeitiger Inkubation mit Polygodial 10 µM.

3.4.3 Einfluss der TRPA1/TRPV1-Antagonisten auf das intraz. Kalzium

In diesen Versuchen sollte der Einfluss spezifischer Antagonisten gegen TRPA1 und TRPV1 auf die CBD/Polygodial induzierten Veränderungen des intraz. Ca^{2+}-Spiegels untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Antagonisten A967079, Capsazepine und Ruthenium Rot den Effekt von CBD (Abb. 27.A und B) und Polygodial (Abb. 27.C und D) auf die intraz. Ca^{2+}-Spiegel nicht inhibieren konnten. Im Vergleich mit der unstimulierten Kontrollgruppe führten die Antagonisten A967079 und Ruthenium Rot allein zu einer Erhöhung des intraz. gemessenen Kalziums (A967079: $p = 0{,}01$; Ruthenium Rot: $p = 0{,}05$) (vgl. Abb. 27.E), während Capsazepine keinen Einfluss auf das intraz. gemessene Kalzium zeigte.



A B C D E

Abb. 27: Einfluss der TRPA1/TRPV1-Antagonisten auf das intraz. Kalzium

Vergleich zwischen B-Zellen, die ohne und mit Antagonisten (A967079, Capsazepine, Ruthenium Rot) inkubiert wurden. Für die Vergleiche wurden CpG/anti-IgM stimulierte B-Zellen in HBSS herangezogen. Die statistische Analyse erfolgte mittels einer one-way ANOVA sowie des Tukey multiple comparisons Tests. Das Signifikanzniveau lag bei $*p = 0{,}05$.

(A–E) Vergleich der Antagonisten zur Kontrollgruppe bei gleichzeitiger Inkubation der B-Zellen mit CBD 20 µM (A) bzw. 10 µM (B), mit Polygodial 10 µM (C) bzw. 5 µM (D) oder ohne Inkubation eines Agonisten (E).

3.5 PoPo3-Aufnahme nach Stimulation der B-Zellen mit TRPA1-Liganden

PoPo3 wird als Leben-/Todfarbstoff vermarktet, dessen Aufnahme an Zellmembranschädigung z.B. bei Nekrose geknüpft ist. Neue Erkenntnisse zeigen, dass PoPo3 auch über spezifische Transportmechanismen aufgenommen wird (Lowin et al., 2020; Bukhari et al., 2016; Chen et al., 2009; Hayer-Zillgen et al., 2002; McCoy et al., 2017). In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit die TRPA1-Liganden die PoPo3-Aufnahme in B-Zellen beeinflussen.

3.5.1 Einfluss der TRPA1-Agonisten auf die PoPo3-Aufnahme in CD19-pos. B-Zellen

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Stimulation mit CBD oder CIN die intrazelluläre PoPo3-Menge abnahm (vgl. Abb. 28.A, B). Polygodial hingegen förderte die Aufnahme von PoPo3 in CD19-pos. B-Zellen (vgl. Abb. 28.C). Bei Polygodial-Konzentrationen von 10 µM und 5 µM stieg das gemessene PoPo3 im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant und erreichte ein Plateau (p = 0,0001).

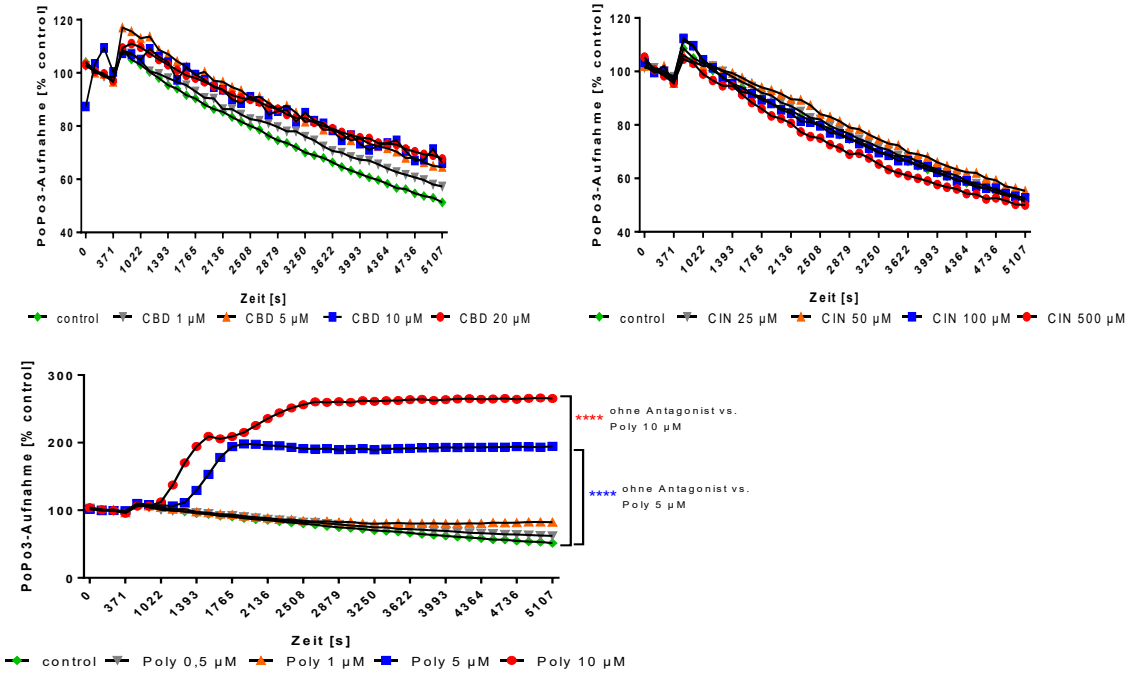


Abb. 28: Einfluss der TRPA1-Agonisten auf die PoPo3-Aufnahme in CD19-pos. B-Zellen

(A–C) PoPo3–Aufnahme in B-Zellen nach Stimulation mit CBD (A), CIN (B) oder Polygodial (C). Für den Vergleich wurden CpG/anti-IgM stimulierte B-Zellen in HBSS genutzt. Die statistische Analyse erfolgte mittels one-way ANOVA sowie mit dem Tukey's multiple comparisons Test. Das Signifikanzniveau war *p = 0,05.

3.5.2 Unterschied zwischen PoPo3 bei CpG/anti-IgM stimulierten und naiven B-Zellen bzw. bei HBSS-inkubierten und PBS-inkubierten B-Zellen

Der Vergleich zwischen CpG/anti-IgM stimulierten und naiven B-Zellen ergab in der B-Zell-Population, die mit CBD inkubiert wurde sowie in der Kontrollgruppe, keinen signifikanten Unterschied der PoPo3-Aufnahme bei Vorhandensein von extrazellulärem Ca^{2+} (HBSS) (vgl. Abb. 29.A und C) (contr.: p = 0,0609; CBD: p = 0,3216). Bei den B-Zell-Populationen, die mit CIN und Polygodial inkubiert wurden, zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der PoPo3-Aufnahme zwischen stimulierten und naiven B-Zellen (vgl. Abb. 29.E und G) (p = 0,0001). CIN bewirkte, dass PoPo3 in der stim. B-Zell-Population stärker abnahm als bei den naiven B-Zellen. Bei Polygodial wurden in der stim. B-Zell-Population höhere PoPo3-Spiegel erreicht als in der naiven B-Zell-Population.

Bei Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} (PBS) ergaben sich stets signifikante Unterschiede in der PoPo3-Menge zwischen stimulierten und naiven B-Zell-Populationen (vgl. Abb. 29.B, D, F und H). In der naiven B-Zell-Population wurden geringere PoPo3-Spiegel gemessen als in der stim. Population (contr.: p = 0,0010; CBD, CIN, Polygodial: p = 0,0001).

Bei der Inkubation mit Polygodial und Behandlung mit PBS wird im Vergleich zur Behandlung mit HBSS eine höhere PoPo3-Aufnahme gemessen (Maximum_stimuliert: HBSS: 266,0; PBS: 461,3; Maximum_naiv: HBSS: 137,7; PBS: 211,3) (vgl. Graph G und H).

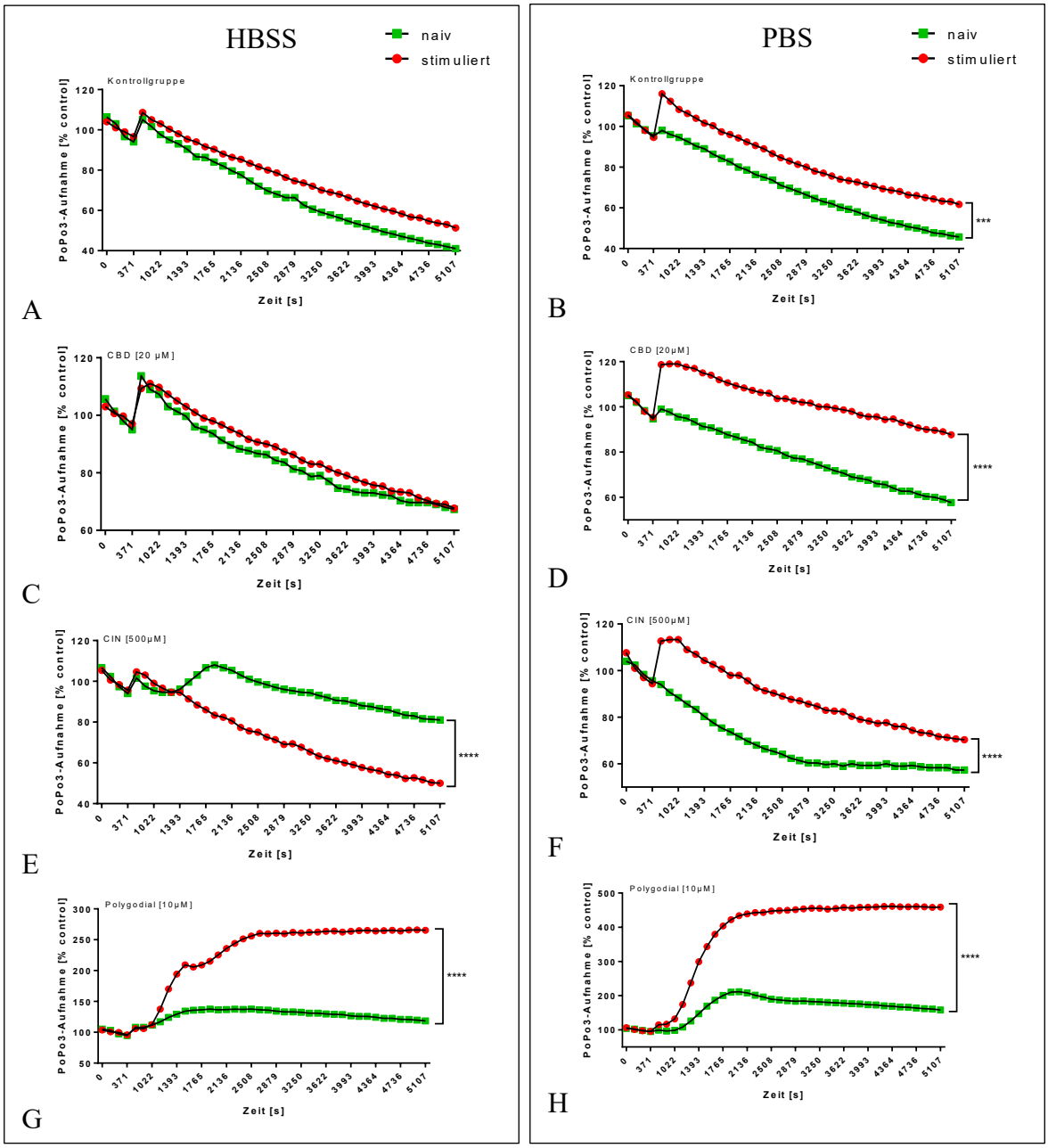


Abb. 29: Unterschied zwischen PoPo3 bei CpG/anti-IgM stimulierten und naiven B-Zellen bzw. bei HBSS-inkubierten und PBS-inkubierten B-Zellen?

(A, B) Vergleich des intraz. gemessenen PoPo3 zwischen CpG/anti-IgM stimulierten und naiven B-Zellen unter Einfluss von extrazellulärem Ca^{2+} (HBSS, A) oder ohne extrazellulärem Ca^{2+} (PBS, B).
(C, D) Vergleich des intraz. gemessenen PoPo3 zwischen CpG/anti-IgM stimulierten und naiven B-Zellen unter Einfluss von extrazellulärem Ca^{2+} (HBSS, C) oder ohne extrazellulärem Ca^{2+} (PBS, D) bei gleichzeitiger Inkubation mit CBD 20 µM.
(E, F) Vergleich des intraz. gemessenen PoPo3 zwischen CpG/anti-IgM stimulierten und naiven B-Zellen unter Einfluss von extrazellulärem Ca^{2+} (HBSS, E) oder ohne extrazellulärem Ca^{2+} (PBS, F) bei gleichzeitiger Inkubation mit CIN 500 µM.
(G, H) Vergleich des intraz. gemessenen PoPo3 zwischen CpG/anti-IgM stimulierten und naiven B-Zellen unter Einfluss von extrazellulärem Ca^{2+} (HBSS, G) oder ohne extrazellulärem Ca^{2+} (PBS, H) bei gleichzeitiger Inkubation mit Polygodial 10 µM.
Für die statistische Analyse wurde der t-Test verwendet. Das Signifikanzniveau lag bei *p = 0,05.

3.5.3 Beeinflussung des gemessenen PoPo3 durch TRPA1/TRPV1-Antagonisten

Sowohl A967079 als auch Capsazepine und Ruthenium Rot konnten die Effekte von CBD in den Konzentrationen 20 µM und 10 µM sowie von Polygodial in den Konzentrationen 10 µM und 5 µM nicht inhibieren (vgl. Abb. 30.A–D). Außerdem zeigte sich, dass die Antagonisten selbst keinen Einfluss auf das gemessene PoPo3 nahmen (vgl. Abb. 30.E).

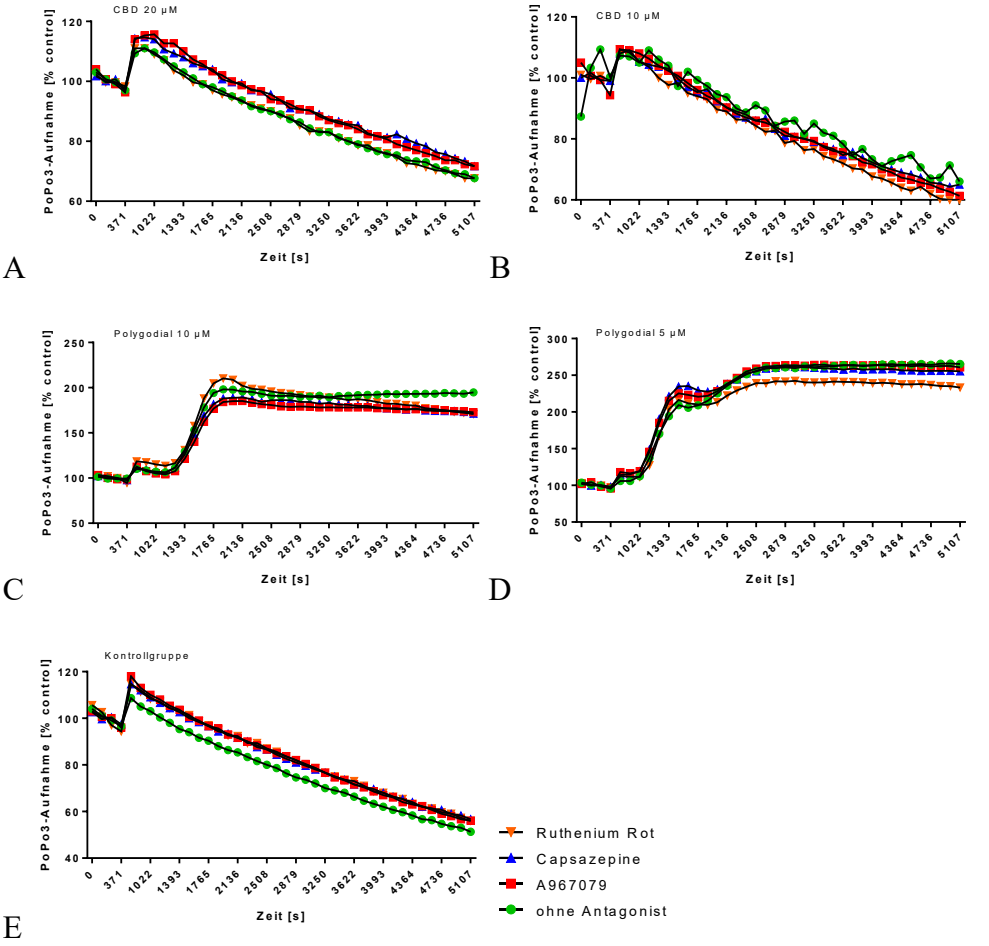


Abb. 30: Beeinflussung des gemessenen PoPo3 durch TRPA1/TRPV1-Antagonisten

(A–E) Vergleich der Antagonisten (A967079, Capsazepine, Ruthenium Rot) zur Kontrollgruppe bei gleichzeitiger Inkubation der B-Zellen mit CBD 20 µM (A) bzw. 10 µM (B), mit Polygodial 10 µM (C) bzw. 5 µM (D) oder ohne Inkubation eines Agonisten (E). Für den Vergleich wurden CpG/anti-IgM stimulierte B-Zellen in HBSS genutzt. Die statistische Analyse erfolgte mittels one-way ANOVA sowie mit dem Tukey's multiple comparisons Test. Das Signifikanzniveau war *p = 0,05.

4 Diskussion

4.1 Nachweis des TRPA1-/TRPV2-Kanals auf B-Zellen

Mit Hilfe des *Western-Blot*-Verfahrens wurde zunächst der TRPA1-/TRPV2-Kanal in humanen sowie in murinen B-Zellen nachgewiesen. Dies erfolgte sowohl an CpG/anti-IgM stimulierten als auch an naiven B-Zellen, sodass eine mögliche Hochregulation der Kanäle auf stimulierten B-Zellen analysiert werden konnte. Darüber hinaus wurde der TRPA1-Kanal auf humanen CD19-pos. sowie auf IgD-pos. B-Zellen nachgewiesen und deren Proteinmengen verglichen.

Nach Herstellerangaben des Antikörpers ist TRPA1 bei 110 kDa zu erwarten (Novus Biologicals, 2020a). Bei den Proben der humanen B-Zellen zeigten sich in den Versuchen drei Banden bei ca. 100 kDa. Diese entsprechen wahrscheinlich verschiedenen Glykosylierungsmustern an dem TRPA1-Kanal. Bereits Egan et al. (2016) beschrieben zwei Banden, die einer partiellen und einer hoch glykosylierten Form von TRPA1 entsprechen. Die dritte Bande könnte aus einer unglykosylierten Form des TRPA1 resultieren. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits an Fibroblasten gezeigt (Lowin et al., 2018).

Bei murinen B-Zellen konnte nur eine Bande bei ca. 110 kDa nachgewiesen werden. Die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen humanen und murinen B-Zellen könnten auf die Isolation der B-Zellen zurückzuführen sein. Die humanen B-Zellen wurden aus Blut isoliert, in dem hauptsächlich reife B-Zellen vorkommen (Sigvardsson, 2018). Die murinen B-Zellen wurden jedoch aus der Milz der Maus isoliert, in der sich B-Zellen mit verschiedenen Reifestadien befinden (Perez-Andres et al., 2010). Außerdem ist vorstellbar, dass der TRPA1-Antikörper bei murinen Proben weniger gut bindet als an humanen Proben, da das Immunogen aus einer Region innerhalb des N-Terminus des menschlichen TRPA1-Proteins hergestellt wird (Novus Biologicals, 2020a). Die Sequenzhomologie zur Maus beträgt 69 % (Novus Biologicals, 2020a). Eine weitere Hypothese ist, dass die murinen B-Zellen den TRPA1-Kanal schwächer exprimieren als die humanen B-Zellen. Wahrscheinlich ist, dass sich die Unterschiede in den *Western-Blots* auf verschiedene Glykosylierungsmuster des murinen und humanen TRPA1-Kanals zurückführen lassen.

Neben TRPA1 erfolgte an murinen Proben der Nachweis von TRPV2, ein bekannter Zielrezeptor von CBD, der bereits auf Fibroblasten nachgewiesen wurde (Laragione et al., 2015). Der Nachweis von TRPV2 in B-Zellen bei ca. 72 kDa (Novus Biologicals, 2020b)

begründet den Verdacht, dass in den nachfolgend durchgeführten Funktionsanalysen an murinen B-Zellen der TRPV2-Kanal involviert sein könnte.

Neben dem reinen Nachweis der Kanäle wurde zusätzlich untersucht, ob in CpG/anti-IgM stimulierten B-Zellen eine Hochregulation des TRPA1- sowie des TRPV2-Kanals erfolgt. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl in humanen als auch in murinen Proben TRPA1 und TRPV2 (nur murin) in B-Zellen nach Aktivierung nicht hochreguliert wurde. Im Gegensatz dazu konnte in synovialen Fibroblasten gezeigt werden, dass nach Aktivierung mit dem pro-inflammatorischen Mediator TNF die TRPA1-Proteinmenge anstieg (Lowin et al., 2018).

In humanen B-Zellen wurde zusätzlich der Vergleich zwischen der TRPA1-Menge in CD19-pos. und IgD-pos. B-Zellen durchgeführt. Den Oberflächenmarker CD19 exprimieren pro-/prä-/unreife und reife B-Zellen, wohingegen IgD hauptsächlich auf reifen B-Zellen vorzufinden ist (Hardy und Hayakawa, 2001). Trotz der unterschiedlichen Reifungsstadien der B-Zellen zeigte sich kein Unterschied in der Proteinmenge von TRPA1.

4.2 Beeinflussung der Zytokinproduktion durch TRPA1-Agonisten

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von CBD, CIN und Polygodial auf die Produktion von TNF-alpha und IL-10 in CD19-pos. B-Zellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass CIN und CBD in hohen Konzentrationen die Produktion von TNF-alpha und IL-10 in CD19-pos. B-Zellen senkten. CBD reduzierte ab einer Konzentration von 5 µM die TNF-alpha-Produktion und bereits bei 1 µM die IL-10-Produktion. CIN zeigte konzentrationsunabhängig eine leichte Reduktion der TNF-alpha-Produktion, während die IL-10-Produktion ab einer CIN-Konzentration von 50 µM signifikant reduziert wurde. Es konnte kein hemmender Effekt von Polygodial auf die Zytokinproduktion in B-Zellen festgestellt werden.

Lowin et al. (2018) zeigten bereits an Fibroblasten, dass TRPA1-Agonisten Einfluss auf die Zytokinproduktion nehmen. Sie beschrieben, dass Polygodial und CBD zu einer Reduktion des gemessenen IL-6 und IL-8 führten (Lowin et al., 2020). Auch Mateen et al. (2019b) untersuchten den Einfluss von CIN in der Pathogenese der RA und zeigten eine Reduktion pro-inflammatorischer Zytokine im Plasma arthritischer Ratten nach Behandlung mit CIN (Mateen et al., 2019b). Darüber hinaus konnten Lowin et al. eine Reduktion der IL-6, IL-8 und MMP-3 Produktion in synovialen Fibroblasten nach Inkubation mit

dem synthetischem Cannabinoid WIN55,212-2 nachweisen, die teilweise auf Aktivierung von TRPA1 zurückzuführen war (Lowin et al., 2016). Soutar et al. (2017) untersuchten die Wirkung von Piperin auf die Zytokinproduktion von B-Zellen. Piperin ist ein scharfer Alkaloidbestandteil von Pfeffer und als Agonist von TRPA1 und TRPV1 beschrieben (Soutar et al., 2017), dem unter anderem anti-entzündliche Eigenschaften zugesprochen werden (Meghwal und Goswami, 2013). In der Studie von Soutar et al. (2017) wurde gezeigt, dass B-Zellen, die mit LPS, anti-CD40 und anti-BCR in Gegenwart von 100 µM Piperin stimuliert wurden, eine verminderte Synthese von IL-6 und IL-10 aufwiesen.

Die verminderte Zytokinproduktion nach Stimulation der B-Zellen mit CBD und CIN könnte auf eine erhöhte Sterblichkeit der Zellen durch die Substanzen zurückzuführen sein. Lowin et al. (2018) zeigten an synovialen Fibroblasten den Zusammenhang zwischen vermindertem Zellüberleben und einer Reduktion in der Produktion von IL-6 und IL-8 nach Stimulation mit Polygodial, CIN und AITC. Da sich in dieser Arbeit die Effekte von CBD und CIN jedoch stärker auf die Reduktion der Zytokine als auf die Apoptose auswirkten, ist es unwahrscheinlich, dass die Reduktion der Zytokinproduktion auf eine erhöhte Sterblichkeit der B-Zellen zurückzuführen ist.

Zur Identifikation möglicher Rezeptoren, die die Wirkung von CBD, CIN und Polygodial vermitteln, wurden diese mit den Antagonisten A967079 (TRPA1), Ruthenium Rot (TRPV1-6, TRPA1) und Capsazepine (TRPV1) kombiniert. Keiner der Antagonisten inhibierte die Effekte von CBD, CIN oder Polygodial auf die Zytokinproduktion. Capsazepine allein senkte die Produktion von TNF-alpha und IL-10, während A967079 und Ruthenium Rot keinen Einfluss auf die Zytokinproduktion zeigten. Aufgrund der fehlenden Inhibition der Effekte der Agonisten, können TRPA1, TRPV1 und TRPV2 als Zielstrukturen ausgeschlossen werden.

4.3 Wirkung von TRPA1-Agonisten auf das Überleben CD19-pos. B-Zellen

Da bereits in früheren Untersuchungen an Fibroblasten gezeigt wurde, dass CBD, CIN und Polygodial das Zellüberleben vermindern und Nekrose induziert (Lowin et al., 2018), sollte in dieser Arbeit die Auswirkung auf B-Zellen untersucht werden. Die B-Zelle ist ein wichtiges therapeutisches Ziel in der RA, da in Studien gezeigt wurde, dass eine B-Zell-Depletion zu einem signifikanten Rückgang von Autoantikörperspiegeln führte, was

sich positiv auf das Erkrankungsbild auswirkte (Cambridge et al., 2003). Um herauszufinden, ob CBD, CIN und Polygodial das Überleben der CD19-pos. B-Zellen beeinflussen, wurde eine Annexin V/PI-Färbung durchgeführt. Die Annexin V/PI-Färbung ermöglichte die Bestimmung der lebenden, früh-apoptotischen, spät-apoptotischen und nekrotischen Anteile innerhalb der gemessenen CD19-pos. B-Zell-Population.

Während Polygodial keinen Einfluss auf die Apoptose oder Nekrose in B-Zellen zeigte, reduzierte CBD die Zahl überlebender B-Zellen zugunsten früh-apoptotischer B-Zellen. Bei Stimulation der B-Zellen mit CIN sank der Anteil lebender zugunsten spät-apoptotischer B-Zellen. Diese Ergebnisse sprechen für eine Sensibilisierung der B-Zellen gegenüber einer Apoptose bei Stimulation mit CBD und CIN.

Auch bei dieser Untersuchung konnte kein inhibierender Effekt der Antagonisten A967079, Capsazepine und Ruthenium Rot auf die Einflüsse der Agonisten auf das Überleben der B-Zellen gezeigt werden. So kann der Übergang in die Apoptose durch Inkubation der B-Zellen mit CBD und CIN nicht spezifisch auf einen TRP-Kanal zurückgeführt werden.

4.4 Erhöhung der intraz. Kalzium-Konzentration durch TRPA1-Aktivierung

Es konnte gezeigt werden, dass CBD, CIN und Polygodial die intraz. Kalzium-Konzentration erhöhten, unabhängig davon, ob naive oder CpG/anti-IgM stimulierte B-Zellen verwendet wurden. Die nahezu ausgeglichene intraz. Kalzium-Konzentration zwischen stim. und naiven B-Zellen ist durch die fehlende Hochregulation von TRPA1 in stimulierten B-Zellen, wie im *Western-Blot* analysiert wurde, zu erklären. Lowin et al. (2020) zeigten, dass sich eine Hochregulation des TRPA1-Proteins in Fibroblasten in einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber TRPA1-Liganden niederschlägt.

Um herauszufinden, ob Kalzium auch aus intraz. Speichern freigesetzt wird, wurde PBS im gleichen Versuchsaufbau anstelle von HBSS eingesetzt. Da in PBS kein Kalzium enthalten ist, muss bei einer intraz. Steigerung der Kalziummenge ein intraz. Kalziumspeicher mobilisiert werden. Die intraz. gemessenen Kalziumspiegel erhöhten sich auch bei einem Einsatz von PBS, sodass CBD, CIN und Polygodial Kalzium vermutlich aus einem intrazellulären Speicherorganell wie dem endoplasmatischen Retikulum, den Lysosomen oder den Mitochondrien mobilisieren.

In vorherigen Studien wurde der Zusammenhang zwischen einem Anstieg des intraz. Kalziums und des verstärkten Übergangs der Zellen in den Zelltod beschrieben (Fliniaux et al., 2018). Dabei sind neben der Beteiligung von TRP-Kanälen vor allem mitochondriale Kalzium-sensible Proteine/Transporter beteiligt (Fliniaux et al., 2018; Kim et al., 2003). Die Studie von Lowin et al. (2020) zeigte hierbei, dass der CBD-vermittelte Zelltod hauptsächlich durch Öffnung der mitochondrialen Membran-Transitionspore (mPTP) vermittelt wird. Dabei wird Kalzium initial durch TRPA1-Aktivierung sowie durch bisher nicht geklärte Mechanismen freigesetzt. Bei einem Kalzium-Anstieg im Zytosol wird dieses schließlich von Mitochondrien aufgenommen, was im Verlauf zu einer mitochondrialen Ca^{2+}-Überlastung führt. Diese bewirkt dann die Zusammensetzung der mPTP, wodurch es zur Einleitung des Zelltods kommt (Kim et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit führten CBD, CIN und Polygodial zu erhöhten Ca^{2+}-Spiegeln, jedoch kam es kaum zum Zelltod bzw. zur Nekrose. Dies könnte an einer zu kurzen Inkubation (24 h) der B-Zellen mit den Substanzen liegen. Eine längere Inkubation (> 24 h) könnte die B-Zellen in den Zelltod führen. Darüber hinaus ist zu überlegen, ob hohe Ca^{2+}-Spiegel nur in bestimmten Mikrodomänen den Zelltod auslösen, die von den Substanzen nicht erreicht werden (Barry et al., 2009; Zhang et al., 2016).

Eine Inhibition der Effekte von CBD, CIN und Polygodial konnte nicht durch die Antagonisten A967079, Capsazepine und Ruthenium Rot erzielt werden. Es ist daher zu vermuten, dass CBD, CIN und Polygodial ihre Wirkung nicht über TRP-Kanäle vermitteln.

4.5 Veränderung des intraz. PoPo3 nach TRPA1-Aktivierung

Im gleichen Versuchsaufbau der Ca^{2+}-Messung wurde ein weiterer Farbstoff, PoPo3-Iodid, eingesetzt, der an Nukleinsäure gebunden fluoresziert (Invitrogen, 2020). Aufgrund dieser Eigenschaft wird PoPo3 als Leben-/Todfarbstoff verwendet, da nur durchlässige Zellmembranen wie z.B. bei Nekrose dessen Aufnahme ermöglichen. Untersuchungen zeigten jedoch, dass PoPo3 und verwandte Verbindungen über spezifische Transporter in die Zelle geschleust werden können (Stueber et al., 2016; Schilling et al., 1999; Bukhari et al., 2016).

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass auch in B-Zellen die PoPo3-Aufnahme nicht mit dem Zelltod korreliert. Es konnte in den Annexin V/PI-Färbungen analysiert werden, dass hauptsächlich die Zahl der früh-apoptotischen (PI negativ) und nicht der nekrotischen (PI positiv) Zellen bei Stimulation mit CBD und CIN anstieg, wohingegen

mit Polygodial das Überleben der B-Zellen unbeeinflusst blieb. Des Weiteren konnte eine Abnahme der PoPo3-Menge in B-Zellen (naiv und CpG/anti-IgM stimuliert) nach Behandlung mit CBD und CIN festgestellt werden, während Polygodial ab einer Konzentration von 5 µM die Aufnahme begünstigte. Dies legt die Vermutung nahe, dass CBD und CIN den Transport des Farbstoffs aus der Zelle über Aktivierung eines dezidierten Exportmechanismus begünstigen. Eine mögliche Zielstruktur sind die ABC-Transporter (*ATP binding cassette transporter*), die verschiedene Substrate unter ATP-Verbrauch aus der Zelle pumpen (Song et al., 2020; Stefková et al., 2004). Ein weiterer möglicher Mechanismus ist die Inhibition der PoPo3-Aufnahme durch CBD und CIN. Die Aufnahme von kationischen und ungeladenen Molekülen wird durch organische Kationen-Transporter (OCT) geregelt, deren Aktivität über intrazelluläres Kalzium reguliert wird (Hayer-Zillgen et al., 2002). Darüber hinaus fungieren verschiedene Moleküle (u.a. auch Steroide) als Inhibitoren dieser Transporter, die die Wirkstoffaufnahme modulieren (Hayer-Zillgen et al., 2002). Daher ist es denkbar, dass auch CBD und CIN die Kationenaufnahme also auch die PoPo3-Aufnahme über OCT beeinflussen.

Da unter Polygodial kein Einfluss auf das Überleben der B-Zellen jedoch eine Aufnahme von PoPo3 in B-Zellen festgestellt wurde, kann PoPo3 als Surrogat-Marker für die Wirkstoffaufnahme von chemischen Verbindungen/Medikamenten genutzt werden (Lowin et al., 2020). Eine direkte Aufnahme von Medikamenten in B-Zellen über OCT könnte durch Stimulation der B-Zellen mit Polygodial gefördert werden.

4.6 Wirkung der Antagonisten auf murine CD19-pos. B-Zellen

Die Funktionsanalysen zeigen, dass die Antagonisten A967079, Capsazepine und Ruthenium Rot die Effekte von CBD, CIN und Polygodial nicht inhibieren konnten. Eine mögliche Erklärung sind die in der Literatur beschriebenen Spezies-Unterschiede bei der Aktivierung von TRPA1 (Nagatomo und Kubo, 2008). Diese unterschiedliche Aktivierung lässt sich auf die relativ niedrige Sequenzhomologie zwischen Menschen und Nagern zurückführen. Chen und Kym (2009) beschrieben, dass TRPA1 von Menschen und Nagetieren zu 79 % identisch seien, verglichen mit 94 % für TRPM8, 86 % für TRPV1, 93 % für TRPV3 und 95 % für TRPV4. Aufgrund dieser strukturellen Unterschiede lassen sich die verschiedenen Wirkungen von TRPA1-Liganden in murinen und humanen Zellen erklären. An unterschiedlichen Versuchen mit Mäusen wurde bereits die antagonistische Wirkung von A967079, Capsazepine und Ruthenium Rot beschrieben (Ritter et al., 2020;

Antoniazzi et al., 2019; Santos und Calixto, 1997). Daher ist wahrscheinlicher, dass die beobachteten Effekte von CBD, CIN und Polygodial nicht über den TRPA1-Kanal in murinen B-Zellen vermittelt werden. Studien zeigten, dass CBD an mitochondriale Zielstrukturen binden kann, die auch Ca^{2+} beeinflussen. Lowin et al. untersuchten vier mögliche Zielstrukturen für CBD: den Natrium/Kalzium-Austauscher (NCLX), den mitochondrialen Kalzium-Uniporter (MCU), den spannungsgesteuerten Anionenkanal (VDAC) und die mitochondriale Membran-Permeabilitäts-Übergangspore (mPTP), wobei CBD-induzierte Ca^{2+}-Spiegel am stärksten durch mPTP-Inhibitoren (Cyclosporin A) beeinflusst wurden (Lowin et al., 2020). Für Polygodial ist in Studien, die antimykotische aber auch krebsbekämpfende Eigenschaften von Polygodial untersuchten, eine Bindung an ATPasen beschrieben (Castelli et al., 2005; Garcia et al., 2018). Studien an Makrophagen und Monozyten zeigten, dass die immunmodulatorische Wirkung von CIN TRP-unabhängig über Thiolierung von Cysteinresten der PI3K (Phospho-inositid-3-Kinasen) oder PDK1 (*3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1*) vermittelt wird (Kim et al., 2010). Außerdem kann diskutiert werden, ob die Dosis der Antagonisten zu gering oder die Halbwertszeit zu kurz waren, um den Effekt der Agonisten zu blockieren. Im *Western-Blot* wurde neben TRPA1 auch TRPV2 nachgewiesen, sodass dieser Kanal ebenfalls als Zielstruktur für die Agonisten vorstellbar ist. Ruthenium Rot als Pan-TRP-Antagonist blockt ebenfalls TRPV2, zeigte in den Versuchen jedoch keinen inhibierenden Effekt. Dies könnte an einer zu gering eingesetzten Dosis (2 µM) von Ruthenium Rot liegen.

5 Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal das TRPA1-Protein in B-Zellen detektiert. Die Funktion wurde über Inkubation mit den bekannten Agonisten CBD, CIN und Polygodial untersucht. Es ergab sich jedoch, dass CBD und CIN TRPA1-unabhängig sowohl die intrazellulären Kalzium-Spiegel erhöhten als auch die Zytokinproduktion reduzierten. Die rheumatoide Arthritis ist eine autoimmune Erkrankung, die gekennzeichnet ist durch eine chronische Entzündung der Gelenke mit einhergehenden Schmerzen. CBD und CIN wurden bereits anti-entzündliche Eigenschaften in der RA zugeschrieben (Mateen et al., 2019a; Mateen et al., 2019b; Lowin et al., 2020). CBD vereint die Möglichkeit einer Wirkung gegen Schmerzen sowie gegen entzündliche Prozesse (Malfait et al., 2000; Hammell et al., 2016; Philpott et al., 2017). TRPA1 und TRPV1 sind bekannte Kanäle in der Entwicklung einer gesteigerten Schmerzempfindlichkeit bei entzündlichen Prozessen (Ruparel et al., 2008), an denen CBD bereits analgetische Wirkung zeigte (Petrocellis et al., 2011; De et al., 2008). Diese Arbeit ergab, dass die anti-entzündliche Wirkung von CBD an B-Zellen TRPA1-unabhängig vermittelt wird.

Die Erkenntnis einer Reduktion pro-inflammatorischer Zytokine sowie die Sensibilisierung der B-Zellen gegenüber Apoptose mit CBD und CIN eröffnet die Möglichkeit eines potenziellen pharmakologischen Einsatzes bei der RA. Eine Reduktion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF-alpha und IL-6 reduziert die Gewebezerstörung und Entzündung, während eine Reduktion der B-Zellen die Autoantikörperproduktion senkt (McInnes und Schett, 2011; Smolen und Steiner, 2003).

Darüber hinaus zeigte sich in dieser Arbeit die Möglichkeit einer verstärkten Aufnahme von Wirkstoffen in die B-Zelle durch Stimulation mit Polygodial. PoPo3 stellte in dieser Arbeit einen Surrogat-Marker für die Wirkstoffaufnahme dar. Dieser Befund ist für eine künftige, auf B-Zellen zielende Therapie in der RA, aber auch für andere autoimmune oder maligne Erkrankungen relevant. Durch Kombination von Polygodial und einem passenden anti-rheumatischen Wirkstoff wie z.B. Methotrexat könnte durch Ko-Inkubation die Wirkstoffaufnahme gesteigert werden. So könnten spezifische therapeutische Effekte bei gleichzeitiger Wirkstoffreduktion erreicht werden. Mit CBD konnten in Tumorzellen bereits erste erfolgreiche Versuche in vitro durchgeführt werden (Neumann-Raizel et al., 2019).

Offen bleibt in dieser Arbeit, ob die eingesetzten Substanzen CBD, CIN und Polygodial nur über TRPA1 wirken oder ihre Wirkung über andere Kanäle auf B-Zellen entfalten. Da die Rolle und Funktion von TRPA1 in B-Zellen nach wie vor unzureichend geklärt ist, müssen Studien mit spezifischen Agonisten durchgeführt werden. Um die Unterschiede zwischen den Spezies zu analysieren, sollte der Versuchsaufbau dieser Arbeit an humanen B-Zellen umgesetzt werden.

Angesichts der Ergebnisse dieser Arbeit, stellen der TRPA1-Kanal und die untersuchten Liganden einen vielversprechenden Zweig in der Therapie der RA dar und sollten Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Literaturverzeichnis

Abbasi, M.; Mousavi, M. J.; Jamalzehi, S.; Alimohammadi, R.; Bezvan, M. H.; Mohammadi, H.; Aslani, S. (2019): Strategies toward rheumatoid arthritis therapy; the old and the new. In: *Journal of cellular physiology* 234 (7), S. 10018–10031.

Abcam (2020): Cal-520, AM (ab171868). URL: https://www.abcam.com/cal-520-am-ab171868.html?gclsrc=aw.ds|aw.ds&gclid=EAIaIQobChMIw4T3mN2T7AIVBed3Ch3j-ADpEAAYASAAEgI0J_D_BwE, abgerufen am 01.10.2020, zuletzt geprüft am 09.10.2021.

Abhishek, A.; Butt, S.; Gadsby, K.; Zhang, W.; Deighton, C. M. (2010): Anti-TNF-alpha agents are less effective for the treatment of rheumatoid arthritis in current smokers. In: *Journal of clinical rheumatology: practical reports on rheumatic & musculoskeletal diseases* 16 (1), S. 15–18.

Alpízar-Rodríguez, D.; Pluchino, N.; Canny, G.; Gabay, C.; Finckh, A. (2017): The role of female hormonal factors in the development of rheumatoid arthritis. In: *Rheumatology* 56 (8), S. 1254–1263.

Antoniazzi, C. T. D. D.; Nassini, R.; Rigo, F. K.; Milioli, A. M.; Bellinaso, F.; Camponogara, C. et al. (2019): Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) plays a critical role in a mouse model of cancer pain. In: *International journal of cancer* 144 (2), S. 355–365.

Arastéh, K. (2018): Innere Medizin. 4. überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme.

Atoyan, R.; Shander, D.; Botchkareva, N. V. (2009): Non-Neuronal Expression of Transient Receptor Potential Type A1 (TRPA1) in Human Skin. In: *Journal of Investigative Dermatology* 129 (9), S. 2312–2315.

Azuma, Y.; Kaji, K.; Katogi, R.; Takeshita, S.; Kudo, A. (2000): Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (7), S. 4858–4864.

Barry, J.; Fritz, M.; Brender, J. R.; Smith, P. E. S.; Lee, D.-K.; Ramamoorthy, A. (2009): Determining the effects of lipophilic drugs on membrane structure by solid-state NMR spectroscopy: the case of the antioxidant curcumin. In: *Journal of the American Chemical Society* 131 (12), S. 4490–4498.

Bartok, B.; Firestein, G. S. (2010): Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. In: *Immunological reviews* 233 (1), S. 233–255.

Barton, N. J.; McQueen, D. S.; Thomson, D.; Gauldie, S. D.; Wilson, A. W.; Salter, D. M.; Chessell, I. P. (2006): Attenuation of experimental arthritis in TRPV1R knockout mice. In: *Experimental and molecular pathology* 81 (2), S. 166–170.

Bautista, D. M.; Pellegrino, M.; Tsunozaki, M. (2013): TRPA1: A gatekeeper for inflammation. In: *Annual review of physiology* 75, S. 181–200.

Belvisi, M. G.; Dubuis, E.; Birrell, M. A. (2011): Transient receptor potential A1 channels: insights into cough and airway inflammatory disease. In: *Chest* 140 (4), S. 1040–1047.

Bertin, S.; Aoki-Nonaka, Y.; Lee, J.; Jong, P. R. de; Kim, P.; Han, T. et al. (2017): The TRPA1 ion channel is expressed in CD4+ T cells and restrains T-cell-mediated colitis through inhibition of TRPV1. In: *Gut* 66 (9), S. 1584–1596.

Billeter, A. T.; Hellmann, J. L.; Bhatnagar, A.; Polk, H. C. (2014): Transient receptor potential ion channels: powerful regulators of cell function. In: *Annals of surgery* 259 (2), S. 229–235.

Blair, H. A.; Deeks, E. D. (2017): Abatacept: A Review in Rheumatoid Arthritis. In: *Drugs* 77 (11), S. 1221–1233.

Blüml, S.; Scheinecker, C.; Smolen, J. S.; Redlich, K. (2012): Targeting TNF receptors in rheumatoid arthritis. In: *International immunology* 24 (5), S. 275–281.

Bouaziz, J.-D.; Yanaba, K.; Venturi, G. M.; Wang, Y.; Tisch, R. M.; Poe, J. C.; Tedder, T. F. (2007): Therapeutic B cell depletion impairs adaptive and autoreactive CD4+ T cell activation in mice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (52), S. 20878–20883.

Bradley, J. R. (2008): TNF-mediated inflammatory disease. In: *The Journal of pathology* 214 (2), S. 149–160.

Broccolo, F.; Drago, F.; Cassina, G.; Fava, A.; Fusetti, L.; Matteoli, B. et al. (2013): Selective reactivation of human herpesvirus 6 in patients with autoimmune connective tissue diseases. In: *Journal of medical virology* 85 (11), S. 1925–1934.

Brunelle, J. L.; Green, R. (2014): One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE). In: *Methods in enzymology* 541, S. 151–159.

Bugatti, S.; Vitolo, B.; Caporali, R.; Montecucco, C.; Manzo, A. (2014): B Cells in Rheumatoid Arthritis: From Pathogenic Players to Disease Biomarkers. In: *BioMed Research International* (681678).

Bukhari, M.; Burm, H.; Samways, D. S. K. (2016): Ion channel-mediated uptake of cationic vital dyes into live cells: a potential source of error when assessing cell viability. In: *Cell biology and toxicology* 32 (5), S. 363–371.

Bustamante, M. F.; Garcia-Carbonell, R.; Whisenant, K. D.; Guma, M. (2017): Fibroblast-like synoviocyte metabolism in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: *Arthritis research & therapy* 19 (1), S. 110.

Cambridge, G.; Leandro, M. J.; Edwards, J. C. W.; Ehrenstein, M. R.; Salden, M.; Bodman-Smith, M.; Webster, A. D. B. (2003): Serologic changes following B lymphocyte depletion therapy for rheumatoid arthritis. In: *Arthritis and rheumatism* 48 (8), S. 2146–2154.

Castelli, M. V.; Lodeyro, A. F.; Malheiros, A.; Zacchino, S. A.; Roveri, O. A. (2005): Inhibition of the mitochondrial ATP synthesis by polygodial, a naturally occurring dialdehyde unsaturated sesquiterpene. In: *Biochemical pharmacology* 70 (1), S. 82–89.

Chang, K.; Yang, S. M.; Kim, S. H.; Han, K. H.; Park, S. J.; Shin, J. I. (2014): Smoking and rheumatoid arthritis. In: *International journal of molecular sciences* 15 (12), S. 22279–22295.

Chen, J.; Kim, D.; Bianchi, B. R.; Cavanaugh, E. J.; Faltynek, C. R.; Kym, P. R.; Reilly, R. M. (2009): Pore dilation occurs in TRPA1 but not in TRPM8 channels. In: *Molecular pain* 5, S. 3.

Chen, J.; Kym, P. R. (2009): TRPA1: the species difference. In: *The Journal of general physiology* 133 (6), S. 623–625.

Csekő, K.; Beckers, B.; Keszthelyi, D.; Helyes, Z. (2019): Role of TRPV1 and TRPA1 Ion Channels in Inflammatory Bowel Diseases: Potential Therapeutic Targets? In: *Pharmaceuticals (Basel)* 12 (2), S. 48.

Davis, J. M.; Matteson, E. L. (2012): My treatment approach to rheumatoid arthritis. In: *Mayo Clinic proceedings* 87 (7), S. 659–673.

De, P. L.; Vellani, V.; Schiano-Moriello, A.; Marini, P.; Magherini, P. C.; Orlando, P.; Di, M. V. (2008): Plant-derived cannabinoids modulate the activity of transient receptor potential channels of ankyrin type-1 and melastatin type-8. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 325 (3), S. 1007–1015.

Di Giovine, F. S.; Nuki, G.; Duff, G. W. (1988): Tumour necrosis factor in synovial exudates. In: *Annals of the Rheumatic Diseases* 47 (9), S. 768–772.

Draborg, A. H.; Duus, K.; Houen, G. (2013): Epstein-Barr virus in systemic autoimmune diseases. In: *Clinical & developmental immunology*, S. 535738.

Earley, S.; Gonzales, A. L.; Crnich, R. (2009): Endothelium-dependent cerebral artery dilation mediated by TRPA1 and Ca2+-Activated K+ channels. In: *Circulation research* 104 (8), S. 987–994.

Edwards, J. C.; Cambridge, G. (2001): Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes. In: *Rheumatology* 40 (2), S. 205–211.

Egan, T. J.; Acuña, M. A.; Zenobi-Wong, M.; Zeilhofer, H. U.; Urech, D. (2016): Effects of N-Glycosylation of the human cation channel TRPA1 on agonist-sensitivity. In: *Bioscience reports* 36 (5), e00390.

Fernandes, E. S.; Russell, F. A.; Spina, D.; McDougall, J. J.; Graepel, R.; Gentry, C. et al. (2011): A distinct role for transient receptor potential ankyrin 1, in addition to transient receptor potential vanilloid 1, in tumor necrosis factor α-induced inflammatory hyperalgesia and Freund's complete adjuvant-induced monarthritis. In: *Arthritis and rheumatism* 63 (3), S. 819–829.

Finnegan, A.; Ashaye, S.; Hamel, K. M. (2012): B effector cells in rheumatoid arthritis and experimental arthritis. In: *Autoimmunity* 45 (5), S. 353–363.

Firestein, G. S.; McInnes, I. B. (2017): Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. In: *Immunity* 46 (2), S. 183–196.

Fliniaux, I.; Germain, E.; Farfariello, V.; Prevarskaya, N. (2018): TRPs and Ca2+ in cell death and survival. In: *Cell calcium* 69, S. 4–18.

Galindo, T.; Reyna, J.; Weyer, A. (2018): Evidence for Transient Receptor Potential (TRP) Channel Contribution to Arthritis Pain and Pathogenesis. In: *Pharmaceuticals (Basel)* 11 (4), S. 105.

Garcia, D. G.; Gonçalves-de-Albuquerque, C. F.; da Silva, C. I.; Kiss, R.; Dasari, R.; Chandra, S. et al. (2018): Effect of polygodial and its direct derivatives on the mammalian Na+/K+-ATPase activity. In: *European journal of pharmacology* 831, S. 1–8.

Garrison, S. R.; Stucky, C. L. (2014): Contribution of transient receptor potential ankyrin 1 to chronic pain in aged mice with complete Freund's adjuvant-induced arthritis. In: *Arthritis & rheumatology* 66 (9), S. 2380–2390.

Giannini, D.; Antonucci, M.; Petrelli, F.; Bilia, S.; Alunno, A.; Puxeddu, I. (2020): One year in review 2020: pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: *Clinical and experimental rheumatology* 38 (3), S. 387–397.

Gioxari, A.; Kaliora, A. C.; Marantidou, F.; Panagiotakos, D. P. (2018): Intake of ω-3 polyunsaturated fatty acids in patients with rheumatoid arthritis: A systematic review and meta-analysis. In: *Nutrition* 45, 114-124.

Glant, T. T.; Mikecz, K.; Rauch, T. A. (2014): Epigenetics in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: *BMC Medicine* 12, S. 35.

Gourley, M.; Miller, F. W. (2007): Mechanisms of disease: Environmental factors in the pathogenesis of rheumatic disease. In: *Nature clinical practice. Rheumatology* 3 (3), S. 172–180.

Gregersen, P. K.; Silver, J.; Winchester, R. J. (1987): The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. In: *Arthritis and rheumatism* 30 (11), S. 1205–1213.

Guimaraes, M. Z. P.; Jordt, S.-E. (2007): TRPA1: A Sensory Channel of Many Talents. In: Liedtke, W. B. und Heller, S. (Hg.): TRP ion channel function in sensory transduction and cellular signaling cascades. Boca Raton, Fla.: CRC Press (Frontiers in neuroscience), S. 151–161.

Hamel, K.; Doodes, P.; Cao, Y.; Wang, Y.; Martinson, J.; Dunn, R. et al. (2008): Suppression of proteoglycan-induced arthritis by anti-CD20 B Cell depletion therapy

is mediated by reduction in autoantibodies and CD4+ T cell reactivity. In: *Journal of immunology* 180 (7), S. 4994–5003.

Hammell, D. C.; Zhang, L. P.; Ma, F.; Abshire, S. M.; McIlwrath, S. L.; Stinchcomb, A. L.; Westlund, K. N. (2016): Transdermal cannabidiol reduces inflammation and pain-related behaviours in a rat model of arthritis. In: *European journal of pain* 20 (6), S. 936–948.

Hardy, R. R.; Hayakawa, K. (2001): B cell development pathways. In: *Annual review of immunology* 19, S. 595–621.

Harre, U.; Georgess, D.; Bang, H.; Bozec, A.; Axmann, R.; Ossipova, E. et al. (2012): Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. In: *The Journal of clinical investigation* 122 (5), S. 1791–1802.

Hayer-Zillgen, M.; Brüss, M.; Bönisch, H. (2002): Expression and pharmacological profile of the human organic cation transporters hOCT1, hOCT2 and hOCT3. In: *British journal of pharmacology* 136 (6), S. 829–836.

Hernández-Bello, J.; Oregón-Romero, E.; Vázquez-Villamar, M.; García-Arellano, S.; Valle, Y.; Padilla-Gutiérrez, J. R. et al. (2017): Aberrant expression of interleukin-10 in rheumatoid arthritis: Relationship with IL10 haplotypes and autoantibodies. In: *Cytokine* 95, S. 88–96.

Holoshitz, J. (2010): The rheumatoid arthritis HLA-DRB1 shared epitope. In: *Current opinion in rheumatology* 22 (3), S. 293–298.

Hornbeck, P. (2001): Enzyme-linked immunosorbent assays. In: *Current protocols in immunology* Chapter 2 (Unit 2.1).

Horváth, Á.; Tékus, V.; Boros, M.; Pozsgai, G.; Botz, B.; Borbély, É. et al. (2016): Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptor is involved in chronic arthritis: in vivo study using TRPA1-deficient mice. In: *Arthritis research & therapy* 18 (6), S. 1–14.

Invitrogen (2020): POPO™-3 Iodide (534/570) - 1 mM Solution in DMF. URL: https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/P3584#/P3584, abgerufen am 01.10.2020, zuletzt geprüft am 09.10.2021.

Jain, P.; Materazzi, S.; Logu, F. de; Rossi Degl'Innocenti, D.; Fusi, C.; Li Puma, S. et al. (2020): Transient receptor potential ankyrin 1 contributes to somatic pain hypersensitivity in experimental colitis. In: *Scientific Reports* 10 (1), S. 8632.

Karami, J.; Aslani, S.; Tahmasebi, M. N.; Mousavi, M. J.; Sharafat Vaziri, A.; Jamshidi, A. et al. (2020): Epigenetics in rheumatoid arthritis; fibroblast-like synoviocytes as an emerging paradigm in the pathogenesis of the disease. In: *Immunology and cell biology* 98 (3), S. 171–186.

Katsikis, P. D.; Chu, C.-Q.; Brennan, F. M.; Maini, R. N.; Feldmann, M. (1994): Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis. In: *The Journal of Experimental Medicine* 179 (5), S. 1517–1527.

Kay, J.; Upchurch, K. S. (2012): ACR/EULAR 2010 rheumatoid arthritis classification criteria. In: *Rheumatology* 51 (Supplement 6), 5-9.

Kim, B. H.; Lee, Y. G.; Lee, J.; Lee, J. Y.; Cho, J. Y. (2010): Regulatory effect of cinnamaldehyde on monocyte/macrophage-mediated inflammatory responses. In: *Mediators of inflammation*, S. 529359.

Kim, J. S.; He, L.; Lemasters, J. J. (2003): Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 304 (3), S. 463–470.

Klareskog, L.; Rönnelid, J.; Lundberg, K.; Padyukov, L.; Alfredsson, L. (2008): Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. In: *Annual review of immunology* 26, S. 651–675.

Klareskog, L.; Stolt, P.; Lundberg, K.; Källberg, H.; Bengtsson, C.; Grunewald, J. et al. (2006): A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. In: *Arthritis and rheumatism* 54 (1), S. 38–46.

Kleyer, A.; Finzel, S.; Rech, J.; Manger, B.; Krieter, M.; Faustini, F. et al. (2014): Bone loss before the clinical onset of rheumatoid arthritis in subjects with anticitrullinated protein antibodies. In: *Annals of the Rheumatic Diseases* 73 (5), S. 854–860.

Kochukov, M. Y.; McNearney, T. A.; Fu, Y.; Westlund, K. N. (2006): Thermosensitive TRP ion channels mediate cytosolic calcium response in human

synoviocytes. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 291 (3), C424-C432.

Kong, K. F.; Yeap, S. S.; Chow, S. K.; Phipps, M. E. (2002): HLA-DRB1 genes and susceptibility to rheumatoid arthritis in three ethnic groups from Malaysia. In: *Autoimmunity* 35 (4), S. 235–239.

Kremeyer, B.; Lopera, F.; Cox, J. J.; Momin, A.; Rugiero, F.; Marsh, S. et al. (2010): A gain-of-function mutation in TRPA1 causes familial episodic pain syndrome. In: *Neuron* 66 (5), S. 671–680.

Kroot, E.-J. J. A.; Jong, B. A. W. de; van Leeuwen, M. A.; Swinkels, H.; van den Hoogen, F. H. J.; van 't Hof, M. et al. (2000): The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. In: *Arthritis and rheumatism* 43 (8), S. 1831–1835.

Kun, J.; Szitter, I.; Kemény, A.; Perkecz, A.; Kereskai, L.; Pohóczky, K. et al. (2014): Upregulation of the transient receptor potential ankyrin 1 ion channel in the inflamed human and mouse colon and its protective roles. In: *PloS one* 9 (9), e108164.

Laragione, T.; Cheng, K. F.; Tanner, M. R.; He, M.; Beeton, C.; Al-Abed, Y.; Gulko, P. S. (2015): The cation channel Trpv2 is a new suppressor of arthritis severity, joint damage, and synovial fibroblast invasion. In: *Clinical immunology* 158 (2), S. 183–192.

Lawrence, J. S. (1970): Heberden Oration, 1969. Rheumatoid arthritis - nature or nurture? In: *Annals of the Rheumatic Diseases* 29 (4), S. 357–379.

Liao, K. P. (2017): Cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. In: *Trends in cardiovascular medicine* 27 (2), S. 136–140.

Linsley, P. S.; Brady, W.; Urnes, M.; Grosmaire, L. S.; Damle, N. K.; Ledbetter, J. A. (1991): CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. In: *The Journal of Experimental Medicine* 174 (3), S. 561–569.

Lowin, T.; Apitz, M.; Anders, S.; Straub, R. H. (2015): Anti-inflammatory effects of N-acylethanolamines in rheumatoid arthritis synovial cells are mediated by TRPV1 and TRPA1 in a COX-2 dependent manner. In: *Arthritis research & therapy* 17, S. 321.

Lowin, T.; Bleck, J.; Schneider, M.; Pongratz, G. (2018): Selective killing of proinflammatory synovial fibroblasts via activation of transient receptor potential ankyrin (TRPA1). In: *Biochemical pharmacology* 154, S. 293–302.

Lowin, T.; Pongratz, G.; Straub, R. H. (2016): The synthetic cannabinoid WIN55,212-2 mesylate decreases the production of inflammatory mediators in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by activating CB2, TRPV1, TRPA1 and yet unidentified receptor targets. In: *Journal of inflammation* 13, S. 15.

Lowin, T.; Straub, R. H. (2015): Cannabinoid-based drugs targeting CB1 and TRPV1, the sympathetic nervous system, and arthritis. In: *Arthritis research & therapy* 17 (1), S. 226.

Lowin, T.; Tingting, R.; Zurmahr, J.; Classen, T.; Schneider, M.; Pongratz, G. (2020): Cannabidiol (CBD): a killer for inflammatory rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. In: *Cell death & disease* 11 (8), S. 714.

Luo, H.; Rossi, E.; Saubamea, B.; Chasseigneaux, S.; Cochois, V.; Choublier, N. et al. (2019): Cannabidiol Increases Proliferation, Migration, Tubulogenesis, and Integrity of Human Brain Endothelial Cells through TRPV2 Activation. In: *Molecular pharmaceutics* 16 (3), S. 1312–1326.

Ma, L.; Liu, B.; Jiang, Z.; Jiang, Y. (2014): Reduced numbers of regulatory B cells are negatively correlated with disease activity in patients with new-onset rheumatoid arthritis. In: *Clinical rheumatology* 33 (2), S. 187–195.

MacGregor, A. J.; Snieder, H.; Rigby, A. S.; Koskenvuo, M.; Kaprio, J.; Aho, K.; Silman, A. J. (2000): Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. In: *Arthritis and rheumatism* 43 (1), S. 30–37.

Malfait, A. M.; Gallily, R.; Sumariwalla, P. F.; Malik, A. S.; Andreakos, E.; Mechoulam, R.; Feldmann, M. (2000): The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritic therapeutic in murine collagen-induced arthritis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (17), S. 9561–9566.

Mannino, M. H.; Zhu, Z.; Xiao, H.; Bai, Q.; Wakefield; Fang, Y. (2015): The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. In: *Cancer letters* 367 (2), S. 103–107.

Mateen, S.; Rehman, M. T.; Shahzad, S.; Naeem, S. S.; Faizy, A. F.; Khan, A. Q. et al. (2019a): Anti-oxidant and anti-inflammatory effects of cinnamaldehyde and eugenol on mononuclear cells of rheumatoid arthritis patients. In: *European journal of pharmacology* 852, S. 14–24.

Mateen, S.; Shahzad, S.; Ahmad, S.; Naeem, S. S.; Khalid, S.; Akhtar, K. et al. (2019b): Cinnamaldehyde and eugenol attenuates collagen induced arthritis via reduction of free radicals and pro-inflammatory cytokines. In: *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 53, S. 70–78.

McCoy, D. D.; Palkar, R.; Yang, Y.; Ongun, S.; McKemy, D. D. (2017): Cellular permeation of large molecules mediated by TRPM8 channels. In: *Neuroscience letters* 639, S. 59–67.

McInnes, I. B.; Schett, G. (2007): Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: *Nature reviews Immunology* 7 (6), S. 429–442.

McInnes, I. B.; Schett, G. (2011): The pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: *The New England journal of medicine* 365 (23), S. 2205–2219.

Meednu, N.; Zhang, H.; Owen, T.; Sun, W.; Wang, V.; Cistrone, C. et al. (2016): Production of RANKL by Memory B Cells: A Link Between B Cells and Bone Erosion in Rheumatoid Arthritis. In: *Arthritis & rheumatology* 68 (4), S. 805–816.

Meffre, E. (2011): The establishment of early B cell tolerance in humans: lessons from primary immunodeficiency diseases. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1246, S. 1–10.

Meghwal, M.; Goswami, T. K. (2013): Piper nigrum and piperine: an update. In: *Phytotherapy research* 27 (8), S. 1121–1130.

Miltenyi Biotec (2020a): LS Columns - Columns - MACS Cell Separation - Products - Miltenyi Biotec - Deutschland. URL: https://www.miltenyibiotec.com/DE-en/products/ls-columns.html#130-042-401, abgerufen am 01.10.2020, zuletzt geprüft am 09.10.2021.

Miltenyi Biotec (2020b): MS Columns - Columns - MACS Cell Separation - Products - Miltenyi Biotec - Deutschland. URL: https://www.miltenyibiotec.com/DE-en/products/ms-columns.html#130-042-201, abgerufen am 01.10.2020, zuletzt geprüft am 09.10.2021.

Moilanen, L. J.; Laavola, M.; Kukkonen, M.; Korhonen, R.; Leppänen, T.; Högestätt, E. D. et al. (2012): TRPA1 Contributes to the Acute Inflammatory Response and Mediates Carrageenan-Induced Paw Edema in the Mouse. In: *Scientific Reports* 2, 380.

Monach, P. A.; Hueber, W.; Kessler, B.; Tomooka, B. H.; BenBarak, M.; Simmons, B. P. et al. (2009): A broad screen for targets of immune complexes decorating arthritic joints highlights deposition of nucleosomes in rheumatoid arthritis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (37), S. 15867–15872.

Moore, D. K.; Motaung, B.; Du Plessis, N.; Shabangu, A. N.; Loxton, A. G. (2019): Isolation of B-cells using Miltenyi MACS bead isolation kits. In: *PloS one* 14 (3), e0213832.

Murphy, K.; Weaver, C. (2018): Janeway Immunologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Myasoedova, E.; Davis, J. M.; Crowson, C. S.; Gabriel, S. E. (2010): Epidemiology of rheumatoid arthritis: rheumatoid arthritis and mortality. In: *Current rheumatology reports* 12 (5), S. 379–385.

Naciute, M.; Mieliauskaite, D.; Rugiene, R.; Nikitenkiene, R.; Jancoriene, L.; Mauricas, M. et al. (2016): Frequency and significance of parvovirus B19 infection in patients with rheumatoid arthritis. In: *The Journal of general virology* 97 (12), S. 3302–3312.

Nagatomo, K.; Kubo, Y. (2008): Caffeine activates mouse TRPA1 channels but suppresses human TRPA1 channels. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (45), S. 17373–17378.

Neumann-Raizel, H.; Shilo, A.; Lev, S.; Mogilevsky, M.; Katz, B.; Shneor, D. et al. (2019): 2-APB and CBD-Mediated Targeting of Charged Cytotoxic Compounds Into

Tumor Cells Suggests the Involvement of TRPV2 Channels. In: *Frontiers in pharmacology* 10, S. 1198.

Novus Biologicals (2020a): Product Datasheet TRPA1 Antibody NB110-40763. URL: https://www.novusbio.com/products/trpa1-antibody_nb110-40763, zuletzt geprüft am 16.09.2020.

Novus Biologicals (2020b): Product Datasheet VRL1 Antibody NBP1-32096. URL: https://www.novusbio.com/products/vrl1-antibody_nbp1-32096, abgerufen am 16.09.2020, zuletzt geprüft am 09.10.2021.

O'Neill, S. K.; Shlomchik, M. J.; Glant, T. T.; Cao, Y.; Doodes, P. D.; Finnegan, A. (2005): Antigen-specific B cells are required as APCs and autoantibody-producing cells for induction of severe autoimmune arthritis. In: *Journal of immunology* 174 (6), S. 3781–3788.

Patil, M. J.; Jeske, N. A.; Akopian, A. N. (2010): Transient receptor potential V1 regulates activation and modulation of transient receptor potential A1 by Ca2+. In: *Neuroscience* 171 (4), S. 1109–1119.

Patil, M. J.; Salas, M.; Bialuhin, S.; Boyd, J. T.; Jeske, N. A.; Akopian, A. N. (2020): Sensitization of small-diameter sensory neurons is controlled by TRPV1 and TRPA1 association. In: *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 34 (1), S. 287–302.

Pereira, I.; Mendes, S. J. F.; Pereira, D. M. S.; Muniz, T. F.; Colares, V. L. P.; Monteiro, C. R. A. V. et al. (2017): Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Channel Expression on Peripheral Blood Leukocytes from Rheumatoid Arthritic Patients and Correlation with Pain and Disability. In: *Frontiers in pharmacology* 8, S. 53.

Perez-Andres, M.; Paiva, B.; Nieto, W. G.; Caraux, A.; Schmitz, A.; Almeida, J. et al. (2010): Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. In: *Clinical cytometry* 78 (Supplement 1), S. 47–60.

Petrocellis, L. de; Ligresti, A.; Moriello, A. S.; Allarà, M.; Bisogno, T.; Petrosino, S. et al. (2011): Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. In: *British journal of pharmacology* 163 (7), S. 1479–1494.

Philpott, H. T.; O'Brien, M.; McDougall, J. J. (2017): Attenuation of early phase inflammation by cannabidiol prevents pain and nerve damage in rat osteoarthritis. In: *Pain* 158 (12), S. 2442–2451.

Picerno, V.; Ferro, F.; Adinolfi, A.; Valentini, E.; Tani, C.; Alunno, A. (2015): One year in review: the pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: *Clinical and experimental rheumatology* 33 (4), S. 551–558.

Radner, H.; Aletaha, D. (2015): Anti-TNF in rheumatoid arthritis: an overview. In: *Wiener medizinische Wochenschrift* 165 (1-2), S. 3–9.

Redmond, W. J.; Gu, L.; Camo, M.; McIntyre, P.; Connor, M. (2014): Ligand determinants of fatty acid activation of the pronociceptive ion channel TRPA1. In: *PeerJ* 2, e248.

Ries, S.; Hilgenberg, E.; Lampropoulou, V.; Shen, P.; Dang, V. D.; Wilantri, S. et al. (2014): B-type suppression: a role played by "regulatory B cells" or "regulatory plasma cells"? In: *European journal of immunology* 44 (5), S. 1251–1257.

Ritter, C.; Dalenogare, D. P.; de, A. A. S.; Pereira, V. L.; Pereira, G. C.; Fialho, M. F. et al. (2020): Nociception in a Progressive Multiple Sclerosis Model in Mice Is Dependent on Spinal TRPA1 Channel Activation. In: *Molecular neurobiology* 57 (5), S. 2420–2435.

Ross, R. A. (2003): Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. In: *British journal of pharmacology* 140 (5), S. 790–801.

Ruparel, N. B.; Patwardhan, A. M.; Akopian, A. N.; Hargreaves, K. M. (2008): Homologous and heterologous desensitization of capsaicin and mustard oil responses utilize different cellular pathways in nociceptors. In: *Pain* 135 (3), S. 271–279.

Salas, M. M.; Hargreaves, K. M.; Akopian, A. N. (2009): TRPA1-mediated responses in trigeminal sensory neurons: interaction between TRPA1 and TRPV1. In: *The European journal of neuroscience* 29 (8), S. 1568–1578.

Samuels, J.; Ng, Y. S.; Coupillaud, C.; Paget, D.; Meffre, E. (2005): Impaired early B cell tolerance in patients with rheumatoid arthritis. In: *The Journal of Experimental Medicine* 201 (10), S. 1659–1667.

Santos, A. R.; Calixto, J. B. (1997): Ruthenium red and capsazepine antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. In: *Neuroscience letters* 235 (1-2), S. 73–76.

Saxena, A.; Khosraviani, S.; Noel, S.; Mohan, D.; Donner, T.; Hamad, A. R. A. (2015): Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. In: *Cytokine* 74 (1), S. 27–34.

Schett, G.; Emery, P.; Tanaka, Y.; Burmester, G.; Pisetsky, D. S.; Naredo, E. et al. (2016): Tapering biologic and conventional DMARD therapy in rheumatoid arthritis: current evidence and future directions. In: *Annals of the Rheumatic Diseases* 75 (8), S. 1428–1437.

Schilling, W. P.; Wasylyna, T.; Dubyak, G. R.; Humphreys, B. D.; Sinkins, W. G. (1999): Maitotoxin and P2Z/P2X(7) purinergic receptor stimulation activate a common cytolytic pore. In: *The American journal of physiology* 277 (4), C766-C776.

Scott, D. L.; Wolfe, F.; Huizinga, T. W. (2010): Rheumatoid arthritis. In: *Lancet* 376 (9746), S. 1094–1108.

Sigvardsson, M. (2018): Molecular Regulation of Differentiation in Early B-Lymphocyte Development. In: *International journal of molecular sciences* 19 (7), S. 1928.

Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D. et al. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. In: *Analytical biochemistry* 150 (1), S. 76–85.

Smolen, J. S.; Aletaha, D.; McInnes, I. B. (2016): Rheumatoid arthritis. In: *The Lancet* 388 (10055), S. 2023–2038.

Smolen, J. S.; Steiner, G. (2003): Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. In: *Nature Reviews Drug Discovery* 2, 473-488.

Sokolov, A. V.; Shmidt, A. A.; Lomakin, Y. A. (2018): B Cell Regulation in Autoimmune Diseases. In: *Acta Naturae* 10 (3), S. 11–22.

Song, G. G.; Bae, S.-C.; Lee, Y. H. (2012): Association between vitamin D intake and the risk of rheumatoid arthritis: a meta-analysis. In: *Clinical rheumatology* 31 (12), S. 1733–1739.

Song, W.; Li, D.; Tao, L.; Luo, Q.; Chen, L. (2020): Solute carrier transporters: the metabolic gatekeepers of immune cells. In: *Acta pharmaceutica Sinica. B* 10 (1), S. 61–78.

Song, X.; Lin, Q. (2017): Genomics, transcriptomics and proteomics to elucidate the pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: *Rheumatology international* 37 (8), S. 1257–1265.

Sorgato, C. C.; Lins-E-Silva, M.; Leão, J. C.; Vasconcelos, L. R.; Romão, T. P.; Duarte, A. L.; Gueiros, L. A. (2020): EBV and CMV viral load in rheumatoid arthritis and their role in associated Sjögren's syndrome. In: *Journal of oral pathology & medicine* 49 (7), S. 693–700.

Soutar, D. A.; Doucette, C. D.; Liwski, R. S.; Hoskin, D. W. (2017): Piperine, a Pungent Alkaloid from Black Pepper, Inhibits B Lymphocyte Activation and Effector Functions. In: *Phytotherapy research* 31 (3), S. 466–474.

Spagnolo, P.; Lee, J. S.; Sverzellati, N.; Rossi, G.; Cottin, V. (2018): The Lung in Rheumatoid Arthritis: Focus on Interstitial Lung Disease. In: *Arthritis & rheumatology* 70 (10), S. 1544–1554.

Stastny, P. (1976): Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis. In: *The Journal of clinical investigation* 57 (5), S. 1148–1157.

Stefková, J.; Poledne, R.; Hubácek, J. A. (2004): ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. In: *Physiological research* 53 (3), S. 235–243.

Stueber, T.; Eberhardt, M. J.; Hadamitzky, C.; Jangra, A.; Schenk, S.; Dick, F. et al. (2016): Quaternary Lidocaine Derivative QX-314 Activates and Permeates Human TRPV1 and TRPA1 to Produce Inhibition of Sodium Channels and Cytotoxicity. In: *Anesthesiology* 124 (5), S. 1153–1165.

Tanaka, S. (2019): RANKL is a therapeutic target of bone destruction in rheumatoid arthritis. In: *F1000Research* 8 (Faculty Rev-533).

Taylor, S. C.; Posch, A. (2014): The design of a quantitative western blot experiment. In: *BioMed Research International* 2014, S. 361590.

Terato, K.; Waritani, T.; Fukai, R.; Shionoya, H.; Itoh, H.; Katayama, K. (2018): Contribution of bacterial pathogens to evoking serological disease markers and aggravating disease activity in rheumatoid arthritis. In: *PloS one* 13 (2), e0190588.

Theofilopoulos, A. N.; Kono, D. H.; Baccala, R. (2017): The multiple pathways to autoimmunity. In: *Nature immunology* 18 (7), S. 716–724.

Thermo Fisher Scientific (2020): Chemiluminescent Western Blot Detection. URL: https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/western-blotting/detect-proteins-western-blot/western-blot-detection-reagents/chemiluminescent-western-blot-detection.html?gclid=EAIaIQobChMInMbrg4-P7QIVEtd3Ch1a-AAsEAAYASAAEgIx5fD_BwE&ef_id=EAIaIQobChMInMbrg4-P7QIVEtd3Ch1a-AAsEAAYASAAEgIx5fD_BwE:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!322170000425!p!!g!!clarity%20western%20ecl%20substrate&cid=bid_pca_wwr_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_nt_con_con, abgerufen am 19.11.2020, zuletzt geprüft am 09.10.2021.

Tian, C.; Huang, R.; Tang, F.; Lin, Z.; Cheng, N.; Han, X. et al. (2020): Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Contributes to Lysophosphatidylcholine-Induced Intracellular Calcium Regulation and THP-1-Derived Macrophage Activation. In: *The Journal of membrane biology* 253 (1), S. 43–55.

Trinchieri, G. (2007): Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. In: *The Journal of Experimental Medicine* 204 (2), S. 239–243.

van den Hoek, J.; Boshuizen, H. C.; Roorda, L. D.; Tijhuis, G. J.; Nurmohamed, M. T.; van den Bos, G. A. M.; Dekker, J. (2017): Mortality in patients with rheumatoid arthritis: a 15-year prospective cohort study. In: *Rheumatology international* 37 (4), S. 487–493.

van der Helm-van Mil; Verpoort, K. N.; Breedveld, F. C.; Toes, R. E.; Huizinga, T. W. (2005): Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis. In: *Arthritis research & therapy* 7 (5), R949-R958.

Verheul, M. K.; Fearon, U.; La Trouw; Veale, D. J. (2015): Biomarkers for rheumatoid and psoriatic arthritis. In: *Clinical immunology* 161 (1), S. 2–10.

Viatte, S.; Plant, D.; Raychaudhuri, S. (2013): Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis. In: *Nature reviews. Rheumatology* 9 (3), S. 141–153.

Vidard, L.; Kovacsovics-Bankowski, M.; Kraeft, S. K.; Chen, L. B.; Benacerraf, B.; Rock, K. L. (1996): Analysis of MHC class II presentation of particulate antigens of B lymphocytes. In: *Journal of immunology* 156 (8), S. 2809–2818.

Walker, K. M.; Urban, L.; Medhurst, S. J.; Patel, S.; Panesar, M.; Fox, A. J.; McIntyre, P. (2003): The VR1 antagonist capsazepine reverses mechanical hyperalgesia in models of inflammatory and neuropathic pain. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 304 (1), S. 56–62.

Wallberg, F.; Tenev, T.; Meier, P. (2016): Analysis of Apoptosis and Necroptosis by Fluorescence-Activated Cell Sorting. In: *Cold Spring Harbor protocols* (4).

Wardemann, H.; Yurasov, S.; Schaefer, A.; Young, J. W.; Meffre, E.; Nussenzweig, M. C. (2003): Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. In: *Science* 301 (5638), S. 1374–1377.

Wasserman, A. M. (2011): Diagnosis and management of rheumatoid arthritis. In: *American family physician* 84 (11), S. 1245–1252.

Westergaard, M. W.; Draborg, A. H.; Troelsen, L.; Jacobsen, S.; Houen, G. (2015): Isotypes of Epstein-Barr virus antibodies in rheumatoid arthritis: association with rheumatoid factors and citrulline-dependent antibodies. In: *BioMed Research International* (472174).

Yeo, L.; Toellner, K.-M.; Salmon, M.; Filer, A.; Buckley, C. D.; Raza, K.; Scheel-Toellner, D. (2011): Cytokine mRNA profiling identifies B cells as a major source of RANKL in rheumatoid arthritis. In: *Annals of the Rheumatic Diseases* 70 (11), S. 2022–2028.

Yu, S.; Gao, G.; Peterson, B. Z.; Ouyang, A. (2009): TRPA1 in mast cell activation-induced long-lasting mechanical hypersensitivity of vagal afferent C-fibers in guinea pig esophagus. In: *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 297 (1), G34-G42.

Zamanpoor, M. (2019): The genetic pathogenesis, diagnosis and therapeutic insight of rheumatoid arthritis. In: *Clinical genetics* 95 (5), S. 547–557.

Zhang, F.; Wang, C.; Cui, Y.; Li, S.; Yao, Y.; Ci, Y. et al. (2016): Effects of Propofol on Several Membrane Characteristics of Cervical Cancer Cell Lines. In: *Cellular physiology and biochemistry* 40 (1-2), S. 172–182.

Zhou, Y.; Suzuki, Y.; Uchida, K.; Tominaga, M. (2013): Identification of a splice variant of mouse TRPA1 that regulates TRPA1 activity. In: *Nature communications* 4, S. 2399.

Danksagung

Am Ende dieser Arbeit möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Georg Pongratz für die Bereitstellung des Themas sowie der Betreuung bedanken.

Ein herzlicher Dank gilt zudem dem gesamten Team des Labors des Hiller-Forschungszentrums, vor allem Dr. Torsten Lowin für die ausführlichen Erklärungen und die stetige Unterstützung sowie Birgit Opgenoorth für die Hilfe bei technischen Fragen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir im Leben jederzeit zur Seite stehen sowie meinem Freund Leonhard Lösse für den stetigen Rückhalt.