

Aus der Klinik für Rheumatologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Jörg Distler

**EXPRESSION UND REGULATION VON TRANSIENT-RECEPTOR-  
POTENTIAL (TRP) KANÄLEN IN SYNOVIALEN FIBROBLASTEN  
AUS PATIENTEN MIT RHEUMATOIDER ARTHRITIS UND ARTH-  
ROSE UNTER KONTROLL- UND ENTZÜNDUNGSBEDINGUNGEN**

Dissertation

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

vorgelegt von  
Julia Zurmahr

2023

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Georg Pongratz

Zweitgutachterin: Jun.-Prof. Dr. rer. nat. Nadine Erlenhardt

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Lowin T, Tingting R, Zurmahr J, Classen T, Schneider M, Pongratz G. Cannabidiol (CBD): a killer for inflammatory rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Cell Death Dis.* 2020 Sep 1;11(8):714. doi: 10.1038/s41419-020-02892-1. PMID: 32873774; PMCID: PMC7463000.

## Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Rolle der TRP-Kanäle hinsichtlich ihres Einflusses auf Inflammation und Antiinflammation in synovialen Fibroblasten (SF) bei Patienten mit rheumatoider Arthritis untersucht. Das Patientenkollektiv aus sechs Patienten wurde mit einer Kontrollgruppe von drei Patienten mit Arthrose verglichen und man ist zu folgenden Ergebnissen gekommen: Die Expression von TRPA1, TRPM3 und TRPM8 auf Genebene wurde durch proinflammatorische Stimuli wie TNF beeinflusst und reguliert. Diese Kanäle wurden bereits im Hinblick auf andere entzündliche Erkrankungen untersucht und spielten eine wichtige Rolle in der Wahrnehmung von Schmerzen und Entzündung. In der RA (rheumatoide Arthritis) und OA (Osteo-Arthrose) fand eine Überexpression von TRPA1 und TRPM8 unter TNF statt, während TRPM3 herunterreguliert wurde. In Hinblick auf die Interleukinproduktion durch die Fibroblasten bei Zugabe von Agonisten und Antagonisten der jeweiligen Kanäle haben wir beobachtet, dass bei Zugabe von PregS (Pregnenolonsulfat) als TRPM3-Agonisten die IL-6-Produktion bei steigender PregS-Konzentration signifikant abnahm, was eine Aktivierung des Kanals und eine anti-entzündliche Funktion nahelegt. Dieser Effekt ließ sich nicht mit Ononetin als Antagonisten des TRPM3 aufheben. TRPM8 wurde unter TNF hochreguliert. Andere Studien bestätigen die Hochregulation in proinflammatorischen Gegebenheiten [89]. In unseren Untersuchungen wurde nach TRPM8-Aktivierung über WS12 eine signifikante Steigerung der IL-8-Sekretion nachgewiesen, was zunächst auf eine proinflammatorische Funktion schließen ließe. Allerdings wurde in Studien zur Kryotherapie gezeigt, dass über Kälte TRPM8 aktiviert wurde und es zu einem Rückgang der Schmerzen und Entzündungsaktivität kam [30]. Durch WS12 mag es möglicherweise zu einer Überexpression von TRPM8 gekommen sein, was dann in einer proinflammatorischen Antwort resultiert und unter regelrechter Aktivierung bspw. durch Kälte kam es dann zu einer antiinflammatorischen Antwort. TRPM4 wurde in dieser Arbeit in der PCR erst nach vielen Zyklen detektiert. Über eine Blockade des Kanals mit dem Antagonisten 9-Phenanthrol kam es zu einer verminderten IL-6-Sekretion. Dies ähnelt Ergebnissen von Bianchi [85], die eine proinflammatorische Funktion des Kanals beobachtet hatten, ebenso wie Feng et. al, welche bei Zugabe von 9-Phenanthrol verminderte Ionenströme des TRPM4 in kardialen Fibroblasten messen konnten [86]. Insgesamt wurde gezeigt, dass einige TRP-Kanäle in der Regulation der RA eine Rolle spielen und dass größere Patientenkollektive nötig wären, um die Effekte zu verifizieren und weiter zu analysieren.

## Summary

In this study, we investigated the role of TRP channels under inflammatory and non-inflammatory conditions in synovial fibroblasts (SF) from patients with rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA). We compared a group of six patients with RA to a group of three patients with OA and obtained the following results: The gene expression of TRPA1, TRPM3 and TRPM8 was influenced and regulated by inflammatory stimuli such as TNF. These channels have been studied in relation to other inflammatory diseases, and they play a significant role in detecting pain and inflammation. We observed a higher expression of TRPA1 and TRPM8 in patients with RA and OA stimulated with TNF, while TRPM3 was expressed at a lower level under TNF treatment. We examined the secretion of Interleukins 6 and 8 (IL-6 and IL-8) under the influence of TRP-agonists or antagonists and observed that when we added Pregnenolone-Sulfate (PregS) as a TRPM3-agonist, the IL-6 secretion was significantly lower under high levels of PregS. This suggests that the activation of TRPM3 may have an anti-inflammatory function. However, this effect could not be reversed by Ononetin, an antagonist of TRPM3.

We also observed a higher expression of TRPM8 under TNF, which has been confirmed in several other studies that showed an upregulation of this channel under inflammatory conditions. We observed a significantly higher secretion of IL-8 after activating TRPM8 via WS12, suggesting that the channel has a pro-inflammatory function. However, studies using cold temperatures to activate TRPM8 showed a reduction in pain and inflammation, indicating that under normal activation, the channel may have an anti-inflammatory function.

TRPM4 was detected in a late cycling stage of the PCR, suggesting low expression. When the channel was inhibited by the antagonist 9-Phenanthrol, we detected a significantly lower secretion of IL-6, indicating that the channel had a pro-inflammatory function, consistent with findings from other studies.

Overall, our study highlights the importance of TRP channels in regulating inflammation in RA, but further research involving more patients is needed to verify and analyze the observed effects in detail.

## Abkürzungsverzeichnis

ACR = American College of Rheumatology

ADPR = Adenosindiphosphat-Rezeptor

AK = Antikörper

ANA = antinukleäre Antikörper

APCA = anti-Parietalzell-Antikörper

BSG = Blutsenkungsgeschwindigkeit

CCP = Antikörper gegen zyklisch citrullinierte Peptide

Ctr = controle

DMARD = disease modifying anti rheumatic drugs

DNA = deoxyribonucleic acid

ELISA = enzyme linked immunosorbent assay

EULAR = European League Against Rheumatism

FCS = Fetales Kälberserum

Hyp= Hypoxie

IFN/ IFN- $\gamma$  = Interferon gamma

IL 2/6/8 = Interleukin 2/6/8

MTX = Methotrexat

NADP = Nicotinamidadenindinukleotidphosphat

NO = Stickstoffmonoxid

Norm= Normoxie

OA = osteoarthritis = Arthrose

OASF = synoviale Fibroblasten aus Patienten mit Arthrose

PAF = Plättchenaktivierender Faktor

PCR = Polymerase chain reaction

PregS = Pregnenolonsulfat

RA = rheumatoid arthritis = rheumatoide Arthritis

RASF = synoviale Fibroblasten aus Patienten mit rheumatoider Arthritis

RNA= Ribonucleinacid

TBP = Tatabox-binding-protein

TNF/ TNF- $\alpha$  = Tumornekrosefaktor alpha

TRPA1 = Transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1, TRPM1/2/3/4/8=  
Transient receptor potential cation channel subfamily M member 1/2/3/4/8

TRPV1/2/3/4 = transient receptor potential cation channel subfamily V member 1/2/3/4

RPM I= roswell park memorial institute (Medium für Leukozyten und andere humane oder tierische Zellen)

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Zielsetzung.....	1
1.1 Rheumatoide Arthritis.....	1
1.2 Das Immunsystem bei rheumatoider Arthritis .....	6
1.3 Transient Receptor Potential Kanäle.....	7
1.4 Ziele der Promotionsarbeit .....	14
2. Material und Methoden .....	14
2.1 Patientencharakteristika .....	14
2.2 Materialien und (Bio-)Chemikalien .....	15
2.3 Zellen und Zellkultur.....	19
2.4 RNA-Extraktion .....	20
2.5 cDNA-Synthese.....	20
2.6 Polymerase chain reaction – PCR .....	20
2.7 ELISA.....	22
2.7.1 Zellstimulation für den ELISA .....	23
2.7.2 Durchführung des IL-8-ELISA.....	23
2.7.3 Durchführung des IL-6-ELISA.....	25
2.8 Statistische Auswertung.....	25
3. Ergebnisse.....	25
3.1 Einfluss der Zytokinstimulationen auf die TRP-Produktion.....	25
3.2 Ergebnisse der ELISA.....	44
4. Diskussion .....	62
5. Ausblick .....	72
6. Literaturverzeichnis.....	73

## 1. Einleitung und Zielsetzung

### 1.1 Rheumatoide Arthritis

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung, für die das Auftreten von Knochen- und Knorpeldestruktionen typisch ist [1]. Wie viele andere chronisch-entzündliche Erkrankungen auch, wird die RA von einer systemischen Reaktion des Körpers begleitet [2].

In der Literatur wird sie als die häufigste chronisch entzündliche Gelenkerkrankung beschrieben. In Deutschland sind etwa 0,5 – 1% der Bevölkerung davon betroffen, wobei Frauen dreimal so häufig erkranken wie Männer [3]. Die jährliche Inzidenz in Deutschland beträgt 20-40 Personen pro 100.000 Einwohner, wobei das Lebenszeitrisiko für eine entzündlich-rheumatische Erkrankung nach amerikanischen Daten für Frauen auf 8% und Männer auf 5% geschätzt wird [4].

Die RA zeichnet sich meistens durch einen plötzlichen Beginn mit symmetrischem Gelenkbefall aus. Die Erkrankung ist chronisch fortschreitend und führt unbehandelt zu einer irreversiblen Knochen- und Knorpeldestruktion. Zudem können auch innere Organe, Sehnen und Gefäße betroffen sein [3]. Die Lebenserwartung ist bei unbehandelter RA deutlich reduziert, was vor allem durch ein erhöhtes Atherosklerose-Risiko bedingt ist [5]. Die Erkrankung tritt typischerweise zwischen dem 35. und 50. Lebensjahr auf, kann aber generell in jedem Lebensalter auftreten [3]. Generell beobachtet man eine Zunahme der Diagnosen autoimmuner Erkrankungen seit dem 2. Weltkrieg, worunter auch die RA fällt. Zudem wird ebenfalls ein Nord-Süd-Gefälle bezüglich der Häufigkeit des Auftretens der rheumatoiden Arthritis beobachtet [6].

Oftmals wird die Erkrankung als persönliche und soziale Bürde beschrieben. Patienten mit einer hohen Krankheitsaktivität und bestehenden Handdeformitäten erzeugen zudem hohe Kosten für das Gesundheitssystem, weshalb die RA eine große sozioökonomische Relevanz hat [7].

Obwohl viel in diesem Bereich geforscht wird, weiß man immer noch nicht genau, was die Ursachen dieser Erkrankung sind. Es wird davon ausgegangen, dass es durch verschiedene Faktoren bedingt zu einer Fehlregulation des Immunsystems kommt, welche sich gegen körpereigenes Gewebe richtet. Als Auslöser für diese Fehlregulation wird eine erbliche Komponente in Kombination mit verschiedenen Umweltfaktoren, wie bestimmten Giften, aber auch Rauchen diskutiert [4], [1]. Bei Zigarettenrauchern werden oft schwerere Verläufe der RA beobachtet, wobei eine erhebliche Risikoreduktion nach Einstellen des Rauchens beobachtet wurde [8]. Auch eine Infektion als Ursache wird immer wieder in Betracht gezogen, da reaktive Arthritiden beispielsweise durch Infekte ausgelöst werden, wobei bei diesen selten Gelenkschäden oder ein chronischer Verlauf beobachtet werden. Besonders diskutiert werden hier Erreger wie Parvovirus, Proteus mirabilis und Mycobacterium tuberculosis u.a., jedoch ist noch kein gesicherter Erregernachweis erbracht worden. Überaus wahrscheinlich wäre zudem eine Kreuzreaktion des Immunsystems auf virale Antigene, die Ähnlichkeit mit autologen Strukturen des Gelenks haben. Man nimmt auch an, dass der Rheumafaktor infolge bestimmter Infektionen vermehrt produziert wird [3]. Rheumafaktoren sind Antikörper vom IgG- oder IgM- Typ, die von Plasmazellen in der Synovialis produziert werden und sich gegen den Fc-Teil von IgG richten [9], [10]. Eine genetische Komponente wird ebenfalls in Betracht gezogen. Beispielsweise ist eine genetische Disposition für die RA bei DR4-Subtypen der humanen Leukozytenantigene beobachtet worden. Diejenigen HLA-DRB-Allele, die mit einer RA assoziiert sind, kodieren bestimmte Aminosäureabfolgen, sog. Shared Epitope, deren Vorhandensein mit einem höheren Risiko assoziiert ist, an RA zu erkranken [6]. Allerdings wurde beobachtet, dass eineiige Zwillinge nur in ~15% beide erkranken und ein großer Teil der Erkrankungsfälle durch Umweltvariationen bedingt sind [8]. Trotz der vermutlich multifaktoriellen Genese der Erkrankung erkrankt ein eineiiger Zwilling eines an RA erkrankten fünfmal häufiger, als ein zweieiiger Zwilling [11].

Die European League Against Rheumatism (EULAR) entwickelte nach dem Vorbild des American College of Rheumatology (ACR) gemeinsam mit diesem 2010 neue Kriterien, um eine RA zu klassifizieren. Nach der neuen Klassifikation werden hier Patienten betrachtet, die mindestens an einem Gelenk eine entzündliche

Schwellung aufweisen und solche, deren Synovitis durch keine andere Erkrankung erklärt werden könnte, was dann einer Ausschlussdiagnose gleichkommt. Nach den EULAR-Kriterien betrachtet man serologische Parameter, die Gelenkbeteiligung, Entzündungswerte und die Dauer der Beschwerden (< oder > sechs Wochen). Je nach Antwort werden unterschiedlich viele Punkte vergeben. Bei einem Score ab sechs von zehn Punkten gilt die Diagnose einer RA als nahezu gesichert [12].

ACR/ EULAR-Kriterium	Punkte
Gelenkbeteiligung	0-5
1 mittleres bzw. großes Gelenk	0
2-10 mittlere bzw. große Gelenke	1
1-3 kleine Gelenke (mit oder ohne Beteiligung von großen Gelenken)	2
4-10 kleine Gelenke (mit oder ohne Beteiligung von großen Gelenken)	3
>10 Gelenke (mit zumindest einem kleinen Gelenk)	5
Serologie	0-3
Negativer RF und negative APCA	0
Niedrig positiver RF oder niedrig positive APCA	2
Hoch positiver RF oder hoch positive APCA	3
Entzündungsparameter	0-1
Normales CRP und normale BSG	0
abnormales CRP oder abnormale BSG	1
Dauer der Symptome	0-1
< 6 Wochen	0
> 6 Wochen	1

Abbildung 1: 2010 Klassifikationskriterien für die RA nach ACR/EULAR

Wie oben bereits erwähnt, greift man bei der Diagnostik auf einige laborchemische Parameter zurück, die im Rahmen der Entzündung bei der RA auftreten. Im Blut von RA-Patienten werden häufig Antikörper gegen gelenkspezifische und systemische Antigene detektiert, u.a. Rheumafaktoren. Diese Antikörper werden in 90% der Patienten mit RA detektiert, aber auch in 1-4% gesunder Individuen. Außerdem können diese Faktoren auch während infektiöser Erkrankungen oder maligner Geschehnisse gebildet werden [10]. Als weitere serologische Screening-Parameter eignen sich ebenfalls Antikörper gegen zyklisch citrullinierte Peptide (CCP), gegen Kollagen Typ II, sowie antinukleäre Antikörper (ANA) [6]. Diese Antikörper werden von Plasmazellen gebildet, die auf ein bisher unbekanntes Antigen reagieren. Häufig findet sich auch ein erhöhter Wert für das C-reaktive Protein (CRP) und eine beschleunigte Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) [3]. Sinnvoll sind ebenfalls Röntgenaufnahmen der Knochen, um die Progression der Erkrankung einschätzen zu können. Zusätzliche Informationen über den Gelenkstatus können mit dem Ultraschall gewonnen werden, z.B. über den Nachweis eines Gelenkergusses oder eine entzündlich verdickte Synovialis [13].

Symptomatisch zeichnet sich die RA durch Morgensteifigkeit bis zu mehreren Stunden und Gelenkschmerz aus. Die Erkrankung verläuft schubweise und es kann zwischen den Phasen der Entzündung immer wieder zu einer Remission kommen. Zu Beginn der Erkrankung kommt es zu einer verminderten Beweglichkeit aufgrund von Entzündung und Schwellung, in späteren Stadien durch Gelenkdestruktion, Deformierung, Muskelabbau und Tendopathien [3]. Die häufigsten betroffenen Gelenke in der frühen rheumatoiden Arthritis sind die Handgelenke, die Metacarpophalangeal-Gelenke, die proximalen Interphalangealgelenke der Finger, das Interphalangealgelenk der Daumen und die Metatarsalphalangealgelenke der Füße. Als typische Gelenkveränderung für die fortgeschrittene RA sind Schwanenhals- und Knopflochdeformitäten zu beobachten, sowie eine ulnare Deviation der Finger und eine Knopflochdeformität des Daumens. Im Verlauf kann es zudem zur volaren Subluxation des Handgelenkes mit Stufenbildung und zu einer Dislokation des distalen Endes von Radius und Ulna kommen [3].

Bei Krankheitsprogression sind häufiger größere Gelenke wie Knie, Schultern oder Ellenbogen betroffen, wohingegen das Sternoclaviculargelenk oder die Halswirbelgelenke eher selten involviert sind. Oftmals sind auch systemische Symptome bemerkbar, wie Fieber, Gewichtsverlust und Fatigue-Syndrom. Zudem berichten Patienten über allgemeine Schwäche und alltägliche Probleme beim Ankleiden, Türen öffnen etc. [10]. Da sich die Erkrankung bei mehr als 50% der Patienten auch extraartikulär manifestiert, sind regelmäßige Organkontrollen sinnvoll, die in einem bestimmten Abstand oder bei Zustandsänderungen durchgeführt werden sollten. Die häufigste extraartikuläre Manifestation ist das Sjögren-Syndrom, welches sich mit einer Keratokonjunktivitis sicca und einem trockenen Mund manifestiert und in 35% der RA-Patienten auftritt. Bei einem Viertel der Patienten sind Rheumaknoten vorzufinden, was damit die zweithäufigste extraartikuläre Manifestation wäre. Diese Rheumaknoten entstehen an Druckpunkten am Körper, etwa den Ellenbogen, den Fingern oder der Achillessehne [10].

Bei Diagnosestellung einer RA sollte nach EULAR-Empfehlungen eine Therapie mit DMARDs (disease-modifying anti-rheumatic drugs) begonnen werden, wobei das Therapieziel eine Remission sein sollte. In erster Linie sollte bei aktiver RA Methotrexat (MTX) als primäres DMARD gegeben werden, ggf. in Kombination mit Glukokortikoiden in der Induktionstherapie. Falls ein Grund gegen die Einnahme von MTX spricht, sollte ein anderes DMARD wie Leflunomid oder Sulfasalazin verabreicht werden. Wenn die dosisoptimierte Monotherapie eines DMARD nicht ausreicht, sollte man ggf. zwei DMARDs als Kombinationstherapie verabreichen oder bei hoher Krankheitsaktivität ein DMARD in Kombination mit einem Biologikum geben. Sollte ein Patient nach der Gabe von zwei klassischen DMARDs (als Mono- oder Kombinationstherapie) nicht darauf ansprechen, wird die Umstellung auf ein Biologikum empfohlen. Ist das erste Biologikum ein TNF-Hemmer und spricht der Patient nicht genügend darauf an, kann entweder die Umstellung auf einen anderen TNF-Hemmer oder ein Biologikum einer anderen Gruppe erfolgen. Bei anhaltender Remission von mindestens 6 Monaten sollte zwischen Arzt und Patient die schrittweise Reduktion der DMARDs erwogen werden [14]. Wichtig für den Remissionserhalt ist eine individuelle Absprache von Arzt und Patient unter Berücksichtigung aller Komorbiditäten sowie der sozialen

Faktoren. Bereits 2014 gab es fünf TNF- $\alpha$  Antagonisten (u.a. Etanercept, Adalimumab), einen IL6-Rezeptor-Antagonisten (Tocilizumab), einen IL1-Rezeptor-Antagonisten (Anakinra) und einen B-Zell-depletierenden Antikörper (Rituximab), sowie einen Antikörper, der die Co-Stimulation der T-Zellen inhibiert (Abatacept), die zur Therapie bei der RA zugelassen sind [15].

## 1.2 Das Immunsystem bei rheumatoider Arthritis

Eine essenzielle Eigenschaft des menschlichen Immunsystems ist körpereigenes Material von Körperfremdem zu unterscheiden. Während der Entwicklung von Lymphozyten, werden autoreaktive Lymphozyten durch Negativselektion im Knochenmark (B Zellen) oder Thymus (T Zellen) deletiert. Trotzdem entgehen einige Lymphozyten dieser Selektion im Thymus und können, sofern sie aktiviert werden, Autoimmunität begünstigen. Infolgedessen kann es dann zur Produktion von Autoantikörpern und Aktivierung autoreaktiver Effektorzellen kommen. Bei der Reaktion gegen körpereigene Antigene kann es dann zur Entstehung verschiedener Autoimmunerkrankungen kommen. Die unterschiedlichen Erkrankungen unterscheiden sich in der Ausprägung der Symptome, dem jeweiligen Wirkungs-ort und den Effektormechanismen [16].

Im Gegensatz zu gewöhnlichen Hypersensitivitätsreaktionen spielen IgE-vermittelte Reaktionen vom Typ 1 bei Autoimmunerkrankungen kaum eine Rolle. Was jedoch eine Rolle bei der Entstehung von Gewebeschäden im Rahmen von Autoimmunerkrankungen spielt, sind Reaktionen, die ähnlich einer allergischen Reaktion des Typs II ablaufen. In diesem Falle reagieren IgG oder IgM auf Autoantigene an der Zelloberfläche oder der extrazellulären Matrix und verursachen Schäden, oft über Komplementaktivierung [17] oder Bindung an Fc Rezeptoren auf Immunzellen, z.B. Makrophagen [18]. In anderen Formen autoimmuner Erkrankungen wie einiger Vaskulitiden können aber auch Typ-III-Reaktionen die Schädigung verursachen, indem Immunkomplexe mit Antikörpern gegen lösliche Autoantigene an diese binden und eine Reaktion auslösen. Diese Autoimmunerkrankungen sind systemisch und durch eine Entzündung der Blutgefäße gekennzeichnet. Beispielsweise beim systemischen Lupus erythematodes werden die Schäden über Typ-II- und Typ-III-Reaktionen ausgelöst [16].

Bei der RA wird davon ausgegangen, dass es vor Beginn der manifesten Symptome schon eine präklinische Phase gibt, in der sich bereits Veränderungen der Laborparameter zeigen können. Aho et. al. haben in ihrer Studie gezeigt, dass der Rheumafaktor bereits mehr als vier Jahre vor Beginn einer RA im Blut der Patienten nachweisbar war, wobei ein hoher Titer das Auftreten einer RA wahrscheinlicher machte [19]. In der Studie von Dahlqvist et al. wurde herausgefunden, dass u.a. CCP-AK und RF bereits mehr als eineinhalb Jahre vor Auftreten einer RA bei noch gesunden Patienten im Blut nachweisbar waren, wobei besonders CCP-AK und IgA-RF mit hoher Signifikanz eine RA prognostizierten [20].

### 1.3 Transient- Receptor- Potential Kanäle

Transient-Receptor-Potential (TRP) Kanäle sind nicht spannungsgesteuerte, überwiegend kalziumionenleitfähige Kationenkanäle mit vier Untereinheiten und je sechs Transmembrandomänen, wobei S5 und S6 die Porenregion bilden [21]. TRP-Kanäle wurden initial in der *Drosophila melanogaster* beschrieben, wo sie eine tragende Rolle bei der Phototransduktion spielen [22]. Aufgrund ihrer strukturellen Homologie kann man sie in sieben Subgruppen unterteilen: TRPC 1-7 Canonical, TRPV 1-6 Vanilloid, TRPM 1-8 Melastatin, TRPP 2,3,5 Polycystin, TRPML 1-3 Mucolipin, TRPA1 Ankyrin und TRPN NO- Mechanotransduktionspotential C, wobei letzterer in Säugetieren nicht exprimiert wird. Die TRP-Proteine bilden Ionenkanäle, die meistens unselektiv durchlässig für mono- und bivalente Kationen sind, wobei einige Kanäle diesbezüglich Ausnahmen darstellen [23]. Diese Kanäle spielen eine wichtige Rolle als Transduktionsmoleküle, die auf eine Reihe chemischer und physikalischer Stimuli im intra- und extrazellulären Milieu reagieren [24]. Sie sorgen durch den Kationeneinstrom für eine Depolarisation der Zellmembran und dadurch in der Regel für die Aktivierung von Kalzium-abhängigen zellulären Mechanismen. Die wichtigsten Kalzium-abhängigen Wege, die von TRPs reguliert werden und den Zellzyklus beeinflussen, werden unter anderem von der Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängigen Kinase reguliert [23].

Folgende Tabelle gibt einen Überblick über die in der Dissertation untersuchten TRP-Kanäle:

Name	Aufbau	Vorkommen	Ligand	Wirkung
TRPA1	Tetramer, Ankyrin-Repeats am C-Terminus	Nozizeptoren, Makrophagen, Mastzellen, Monozyten	Inflammatorische Liganden, Phtalat-Ester, Cannabinoide	Inhibition der NO-Produktion, Antwort auf Hyperthermie
TRPV1	Homotetramerer, nicht selektiver Kationenkanal;	Nervensystem: Dorsale Ganglien, afferente Fasern; murine CD4+ T-Zellen	Lipophile Moleküle, Protonen, Endocannabinoide, Capsaicin, pH, Spannung; Temp. >42°C	Apoptose, Resistenz ggü. oxidativem Stress, höhere Erregbarkeit von Nervenzellen, synapt. Plastizität; T-Zell-Aktivierung, Kälte-/Schmerzwahrnehmung
TRPV2	Nicht selektiver Kationenkanal, vermittelt einen Kationen-Einwärtsstrom	Dorsale Hinterwurzel-Ganglien, Makrophagen, Monozyten, CD19+ B-Lymphozyten, synoviale Fibroblasten	Hitze >52°C, Änderungen der Osmolarität und Membranspannung, Cannabinoide	Stimuliert Phagozytose, Migration, Zytokin-Produktion, Kalzium-Freisetzung in der Entwicklung von B-Lymphozyten
TRPV3	Nicht selektiver Kationenkanal	Sensorische Neurone in der Haut und dem Dünndarm	Temperaturen zwischen 22 und 40 °C, Thymian, Oregano, Cannabidiol	Thermosensation, Haarwachstum
TRPV4	Nicht selektiver Kationenkanal	Neutrophile Granulozyten	Proinflammatorische Stimuli; PAF	Beeinflussung der neutrophilen gesteuerten Reaktion, Chemotaxis, Zelladhäsion
TRPM1	Nicht selektiver Kationenkanal	Melanozyten, B-Zellen, Mastzellen	Negativ reguliert über Aktivierung von mGluR6-Rezeptor in ON-Bipolarzellen	Tumorsuppressoren; Überexpression: Zellzyklusarrest in G0/1, Apoptose, Proliferationsstop
TRPM2	Kalziumpermeabler Kationenkanal, Enzym, da C-	T-Zellen, Dendritische Zellen, neutrophile Granulozyten,	ADPR, NADP, Nikotinsäure, pH, Wasserstoffperoxid	Zytokinproduktion, Insulinsekretion, Apoptose (durch Fragmentierung der Mitochondrien)

	Terminus enzymatisch aktives ADPR enthält	Makrophagen, Mastzellen		
TRPM3	Kalziumpermeabler Kationenkanal	Dorsale Hinterwurzelganglien	Temperaturen >45°C, PregS, CIM0216	Kalziumeinstrom, Aktivierung von Transkriptionsfaktoren c-Jun und c-Fos
TRPM4	Kationenkanal mit starker Sensitivität für Natrium vs. Kalzium	T-Zellen, dendritische Zellen, Makrophagen, Mastzellen	Erhöhtes Kalzium, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat	Na-Einstrom, IL2-Produktion, Aktivierung von Makrophagen und Phagozytose
TRPM8	Kalziumpermeabler Kationenkanal, hochreguliert in Prostatakrebs; ionotroper Testosteronrezeptor in normaler Prostata	Kälterezeptoren	Kälte, Menthol	Bei Inhibition: Zelltod in Krebs, bei Überexpression: Apoptose synovialer Fibroblasten

Tab. 2: In dieser Arbeit untersuchte TRP-Kanäle. Sämtliche Angaben stammen aus [23], [24], [25], [26].

Einige TRP-Kanäle, wie z.B. TRPV1 und TRPA1 scheinen eine Rolle im Entzündungsgeschehen zu spielen. Wie obige Tabelle zeigt, ist TRPA1 zuständig für die Wahrnehmung von Kälteschmerz, TRPV1 für die Detektion von Wärmeschmerz und auch Inflammation, TRPM8 für die Detektion von Kälteschmerz. Während alle drei Kanäle temperaturreguliert sind, wird die Aktivität von TRPV1 und TRPA1 auch unter proinflammatorischen Bedingungen hochreguliert. Sie wird u.a. beeinflusst von saurem oder basischem pH, Bradykinin, ATP, Leukotrienen und weiteren Faktoren [27]. Zudem spielen sie eine Rolle bei der kutanen neurogenen Inflammation [1].

TRPA1 ist weiterhin wichtig bei der Detektion des Sauerstoffgehalts der Umgebung und bei der Detektion reaktiver Chemikalien [28].

TRPV1 ist ein wichtiger Teil des endogenen Cannabinoid-Systems und kann von Arachidonylethanolamin aktiviert werden und vermittelt u.a. neuropathischen Schmerz [29].

Die TRPM8-Aktivität hingegen wird vor allem über Kälte und Menthol hochreguliert. Die Anwendung von Kryotherapie, lokal und am ganzen Körper, bewirkt in

RA-Patienten eine signifikante Reduktion der Gelenkschmerzen, Schwellung und auf molekularer Ebene eine Reduktion von Entzündungsmediatoren und Gelenkzerstörung [30]. Dieser Effekt liegt eventuell an TRPM8, durch welchen die Kälte wahrgenommen wird, und eine mögliche antiinflammatorische Signalkaskade, welche a.e. via Sympathikusaktivierung [31] initiiert wird. TRPM8 ist zudem entscheidend bei der Wahrnehmung von moderaten Temperaturniedrigungen zwischen 28 und 18°C [27]. Bei TRPM8-Aktivierung durch Kälte kommt es im Mausmodell zu einer Steigerung der Körpertemperatur, wohingegen bei Knockout-Mäusen oder Mäusen, die mit einem TRPM8-Antagonisten behandelt wurden, die Körperkerntemperatur verringert war [32]. Bei der Wahrnehmung von Kälteschmerz hingegen soll TRPA1 vor allem von Bedeutung sein. Im Mausmodell wurde an Neuronen eine Aktivitätssteigerung von TRPA1 sowie eine Kalziumfreisetzung bei Temperaturen unter 18°C beobachtet, was darauf schließen lässt, dass TRPA1 bei Unterkühlung aktiviert wird [33]. Neuere Studien zeigten jedoch, dass bei extremen Temperaturen unter 5°C vor allem TRPM8 und nicht TRPA1 involviert sei [34]. Diese Diskrepanzen wurden von einer anderen Arbeitsgruppe untersucht, welche sie TRPA1-Varianten zusprach, die in verschiedenen Spezies verschiedene Funktionen haben [35].

TRPV1 und -A1 scheinen im Vergleich zu TRPM8 in afferenten Neuronen gegensätzliche Effekte zu haben. TRPM8 benötigt zum Signalisieren Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, wohingegen dieses die Signalkaskade durch TRPV1 Aktivierung unterdrückt. Während die Phosphatidylinositol-3-Kinase und Proteinkinase C die TRPV1-Aktivität hochregulieren, wird die TRPM8-Aktivität unterdrückt [27].

In der akuten Entzündung bewirkt eine TRPV1-Aktivierung die Aktivierung von dendritischen Zellen, die dann zur Migration in den Lymphknoten stimuliert werden. Auch TRPA1 spielt eine tragende Rolle in der lokalen Inflammation, wo der Kanal durch das proinflammatorische Bradykinin, aber auch andere Entzündungsmediatoren wie z.B. TNF sensibilisiert wird und infolgedessen ein proinflammatorisches Signal an das Gehirn weiter geleitet wird [27]. In TRPV1-/- Mäusen wurde nach Injektion von Freund'schem Adjuvans keine maßgebliche Entzündungsreaktion beobachtet, was unterstreicht, dass TRPV1 wichtig zur Detektion lokaler Entzündung ist. Zudem wurde bei ebendiesen Mäusen nach Endotoxin-Injektion keine adäquate Reaktion in Form von Fieber beobachtet. Auch in

der chronischen Inflammation ist TRPV1 von Bedeutung. Im Mausmodell der Arthritis wurde unter TNF eine vermehrte Expression von TRPV1 in dorsalen Nervenwurzeln beobachtet [27].

Auch bei der kutanen neurogenen Inflammation ist, wie oben erwähnt, TRPV1 maßgeblich am Entzündungsgeschehen beteiligt, u.a. sorgt seine Aktivierung mit für die Entstehung von Pruritus und Ödemen. Bei wiederholter Aktivierung von TRPV1 mit chemischen Stimuli kommt es auf Dauer zu einer Desensibilisierung des Kanals [1].

Weitere Studien fanden, dass bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) das endogene Cannabinoid-System verändert ist und es zu Veränderungen in der Rezeptor-Expression im Vergleich zu Gesunden kommt. TRPV1 wurde dabei bei der RA unter proinflammatorischen Bedingungen (TNF $\alpha$ ) hochreguliert [36].

TRPV2 wird vor allem mechanosensitiv durch Membrandehnung und Zellschwellung aktiviert, aber auch durch stärkere Hitze als TRPV1, nämlich  $> 52^{\circ}\text{C}$  [37]. Der Kanal wird vor allem im peripheren und zentralen Nervensystem exprimiert und ist involviert in die Entwicklung von Neuronen und Axonwachstum. Im braunen Fettgewebe ist TRPV2 an der Thermoregulation und dem Energiemetabolismus beteiligt. In TRPV2-Knockout-Mäusen wurden größere weiße Fettzellen und mehr Lipidablagerungen, sowie bei einer fettreichen Diät ein signifikanter Anstieg des Körpergewichts beobachtet [32]. Bei TRPV2 gibt es Evidenz, dass dieser in der antiinflammatorischen Antwort bei Gelenkentzündungen eine Rolle spielt. TRPV2 wird unter anderem von synovialen Fibroblasten exprimiert. *In vitro* wurde nach Zugabe eines TRPV2-Agonisten (LER13) eine Reduktion der Invasivität der Fibroblasten nachgewiesen. Weiterhin scheint der Agonist die Schwere der Erkrankung in zwei etablierten Modellen der RA zu reduzieren. Es wurde ein Rückgang der Gelenkzerstörung, synovialer Inflammation und synovialer Angiogenese beobachtet. Für mögliche therapeutische Ansätze wurde der TRPV2-Agonist auch *in vivo* verwendet und es gab keinen Anhalt für Toxizität [38].

Bei TRPV4 wird bisher davon ausgegangen, dass dieser Kanal eine Rolle bei mechanischer Schmerz Wahrnehmung in Gelenken spielt. Bei intraartikulärer Injektion des TRPV4-Antagonisten RN-1734 in murine Kniegelenke wurde ein

Rückgang der Aktivität der C-Fasern in Reaktion auf mechanische Belastung eines entzündeten Gelenkes beobachtet, sowie ein Rückgang der Aktivität bei schädigender Belastung eines gesunden Gelenkes [39]. TRPV4 spielt zudem eine Rolle bei der Thermoregulation und im Energie-Metabolismus. Der Kanal wird in braunem und weißem Fettgewebe exprimiert. Bei verminderter Expression des Kanals wird die Expression thermogenetischer Gene wie PGC1- $\alpha$  und UCP1 verbessert, ohne die Adipogenese in Adipozyten zu verändern. TRPV4-Aktivierung hingegen unterdrückt die Expression thermogenetischer Gene. In TRPV4-Knockout-Mäusen wurde eine erhöhte oxidative Muskelkapazität, sowie eine Resistenz gegenüber ernährungsinduzierter Fettleibigkeit beobachtet [32].

TRPM1 ist ein nicht selektiver Kationenkanal, welcher physiologisch in ON-Bipolarzellen für die Depolarisation eine entscheidende Rolle spielt und pathophysiologisch in vielen Fällen der stationären kongenitalen Nachtblindheit eine Mutation aufweist [38]. Der Kanal ist im Detail für die synaptische Transmission zwischen Photorezeptorzellen und ON-Bipolarzellen via Depolarisation auf einen Lichtreiz verantwortlich [41]. TRPM1 findet sich als mGlu-R6-gekoppelter Kationenkanal in den Dendriten der Stäbchen- und Zapfen-ON-Bipolarzellen, sodass er optimal positioniert auf lichtinduzierte Änderungen des Glutamatspiegels reagieren kann [42]. Weiterhin spielt TRPM1 eine Rolle bei der UV-B-induzierten Melanozytenmigration und Repigmentierung bei Vitiligo [41]. Bei Patienten mit malignem Melanom sind TRPM1-Antikörper unter anderem für die paraneoplastische Retinopathie mit Symptomen wie Nachtblindheit und vermindertem Kontrastsehen verantwortlich. Bereits bei Melanompatienten ohne visuelle Symptome konnten die TRPM1-AK in einem Drittel der Fälle nachgewiesen werden [44].

TRPM2 wird in pankreatischen  $\beta$ -Zellen exprimiert und ist an der glucoseabhängigen, Inkretinpotenzierten Insulinsekretion beteiligt. Glucose bewirkt eine Aktivitätssteigerung in nicht selektiven Kationenkanälen über die Öffnung von TRPM2, da dieser Effekt in Knockout-Mäusen fehlt. Weiterhin wird die Aktivität von TRPM2 über cAMP via Gs-Protein gekoppelte Rezeptoren gesteigert, wobei Gi/Gq vermittelte Inhibierung der cAMP-Produktion eine verminderte TRPM2-Kanal-Aktivität bewirkt [32]. Neueste Untersuchungen haben gezeigt, dass TRPM2 ebenfalls in pyramidalen Neuronen des Hippocampus exprimiert werden. Durch

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wird ein Einwärtsstrom von Ionen via TRPM2 ausgelöst, welcher durch den TRPM2-Antagonisten Clotrimazol blockiert werden kann. Um den Kanal vollständig zu aktivieren ist jedoch ein Kalziumeinstrom durch NMDA-Rezeptoren vonnöten; ADPR als Agonist alleine schafft es nicht, den Kanal suffizient zu aktivieren [45].

TRPM3 ist ein kalziumpermeabler Kationenkanal, der durch Hitze sowie Pregnenolonsulfat (PregS) [46] und CIM0216 aktiviert werden kann [47]. Der Kanal kommt in Mäusen in nozizeptiven Neuronen wie im Trigemini oder dorsalen Nervenwurzelganglien vor [48].

TRPM3 ist gemeinsam mit TRPV1 und TRPA1 für die Detektion von starker Hitze in nozizeptiven Neuronen verantwortlich. In Dreifach-Knockout-Mäusen fehlte die Antwort der nozizeptiven Neuronen auf schädliche Hitze gänzlich, wohingegen in den Zweifach-Knockout-Mäusen und TRPM3-Knockout-Mäusen, bei denen jeweils ein TRP-Kanal der o.g. funktionstüchtig war, eine physiologische Reizantwort auf die Hitze detektiert werden konnte. Auch in Hinsicht auf das Verhalten der Mäuse konnte o.g. bestätigt werden. Die Dreifach-Knockout-Mäuse hielten sich deutlich länger als 60 Sekunden auf einer heißen Platte über 45°C auf und riskierten so Verbrennungen [49]. Im Menschen wurde der Kanal ebenfalls funktionell und molekular in dorsalen Nervenwurzelganglien und aus Stammzellen gezüchteten Neuronen nachgewiesen. Er ließ sich wie im Mausmodell von PregS und CIM0216 stimulieren und durch Primidon sowie Isokuranetin dosisabhängig blockieren [50]. Zudem spielt der Kanal eine Rolle bei der Hitze-Hypersensitivität und Spontanschmerz nach Nervenverletzungen [51].

TRPM4 ist neben TRPM5 einer der zwei TRP-Kanäle, welche impermeabel für Kalziumionen sind und nur monovalente Kationen transportieren [52]. Beide Kanäle werden durch hohe, intrazelluläre Kalziumkonzentrationen aktiviert. Durch direkte Bindung von ATP an den Kanal wird die Kalziumsensitivität von TRPM4 aufrecht erhalten [53]. Unter physiologischen Bedingungen kommt es durch TRPM4-Aktivierung zu einem Natriumioneneinstrom und infolgedessen zur Zelldepolarisation. Unter pathologischen Bedingungen kommt es zur Natriumüberladung der Zelle, dadurch zur Zunahme des Zellvolumens, Zellschwellung und

schließlich zur Zellmembranruptur mit dem irreversiblen Stadium der Nekrose [54].

Die Expression der Kanäle wurde bisher in Fibroblasten wenig untersucht und deren Regulation durch bestimmte Zytokine nur teilweise aufgedeckt.

#### 1.4 Ziele der Promotionsarbeit

Ziel dieser Promotionsarbeit ist es zu ergründen, ob und wie die Expression von TRP-Kanälen bei Patienten mit rheumatoider Arthritis in synovialen Fibroblasten unter Entzündungsbedingungen reguliert wird, ob es Unterschiede zwischen verschiedenen Subtypen hinsichtlich der Regulation gibt und ob sich Unterschiede hinsichtlich des Patientenkollektivs im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Osteoarthritis ergeben. Das Ziel dieser und weiterführender Arbeit ist die Validierung von TRP-Kanälen als mögliche Therapeutika zur Behandlung einer RA.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Patientencharakteristika

Für die Versuche wurden 6 Patienten in die Studie aufgenommen, die schon eine längere Zeit an RA erkrankt waren und die revidierten Kriterien der RA des American College of Rheumatology erfüllt haben. Die Gruppe besteht aus 5 weiblichen und einem männlichen Patienten mit einem mittleren Alter von 70,7  $\pm$  7,9 Jahren. Das C-reaktive Protein betrug 7,11 mg/dl  $\pm$  12,79 mg/dl, die Blutsenkungsgeschwindigkeit betrug 14,87 mm n.W.  $\pm$  13,52 mm n.W., die Leukozyten betragen 8,38/ml  $\pm$  2,07/ml und der Rheumafaktor betrug 38,63 IU/ml  $\pm$  59,06 IU/ml. 4 von 6 Patienten erhielten Glucocorticoide, 2 von 6 Methotrexat und 2 von 6 Biologicals.

Die Kontrollgruppe bestand aus 3 Patientinnen, welche alle an Arthritis erkrankt waren, mit einem mittleren Alter von 75,3  $\pm$  3,7 Jahren. Das C-reaktive Protein betrug 2,66 mg/dl  $\pm$  0,577 mg/dl, die Blutsenkungsgeschwindigkeit betrug 12,33 mm n.W.  $\pm$  1,53 mm n.W. und die Leukozyten betragen 8,3/ml  $\pm$  1,99/ml.

Alle Patienten und Kontrollen erhielten eine elektive Knie-, Hüft- oder Handgelenkersatz-Operation, wurden über das Ziel der Studie informiert und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Entnahme von synovialen Fibroblasten zu Forschungszwecken aus dem betroffenen Gelenk. Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf angenommen (Nummer 2018-87-KFogU). Ich versichere, dass alle Experimente in Übereinstimmung mit geltenden Richtlinien und Regularien durchgeführt worden sind.

## 2.2 Materialien und (Bio)-Chemikalien

<b>Name</b>	<b>Firma</b>	<b>Hauptsitz</b>	<b>Catalog Nr.</b>	<b>final conc.</b>
RPMI- 1640 Medium	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA	R7509	
FCS: Donor Bovine Serum with iron	gibco, life technologies	Carlsbad, Californien, USA	16371-(029)	10%/ 2%
PenStrep (10000 U/ml Pen; 10000 µg/ ml Strep)	gibco, life technologies	Carlsbad, Californien, USA	15140-(122)	1/100
GlutaMax (100x)	gibco, life technologies	Carlsbad, Californien, USA	35050-(038)	1/100
HEPES Solution (1M)	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA	H0887	25µmol
Ampuwa Spüllösung	Fresenius Kabi	Bad Homburg, Deutschland		
Trypsin- EDTA-Solution	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA		
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA	RNBH4646	
Rotina 420R Zentrifuge	Hettich	Tuttlingen, Deutschland		
RNAse free DNase Set	Qiagen	Venlo, Niederlande		
Buffer RLT	Qiagen	Venlo, Niederlande	1015762	
Dnase Lyophilisat	Qiagen	Venlo, Niederlande		
RNAase free water	Qiagen	Venlo, Niederlande	1018017	

Buffer RDD	Qiagen	Venlo, Niederlande		
Schredder	Qiagen	Venlo, Niederlande	79656	
Ethanol 70%	Qiagen	Venlo, Niederlande		
Buffer RW1	Qiagen	Venlo, Niederlande		
Buffer RPE	Qiagen	Venlo, Niederlande		
2 ml Tube	Qiagen	Venlo, Niederlande		
1,5 ml Tube	Qiagen	Venlo, Niederlande		
RNA Ex- traktionssäule	Qiagen	Venlo, Niederlande		
<b>QuantiTect Re- verse Transcrip- tion Kit</b>	Qiagen	Venlo, Niederlande	205313	
gDNA Wipeout Buffer	Qiagen	Venlo, Niederlande		
Quantiscript Re- verse Transcrip- tase	Qiagen	Venlo, Niederlande		
Quantiscript RT Buffer	Qiagen	Venlo, Niederlande		
RT Primer Mix	Qiagen	Venlo, Niederlande		
RNase-Free Water	Qiagen	Venlo, Niederlande		
0,2 ml Epi				
Mini Centrifuge, Model NG002B	Nippon Genetics Europe GmbH	Düren, Deutschland		
Kühlzentrifuge	Hettich	Tuttlingen, Deutschland		
Mikrotiter- Kühlplatte				
Thermocycler				
qPCRBIO SyGreen Mix	PCRBIO SYSTEMS	London, UK		
Forward Primer (10µM)	PCRBIO SYSTEMS	London, UK		
Reverse Primer (10 µM)	PCRBIO SYSTEMS	London, UK		
Template DNS (cDNA)				
PCR grade dH2O	PCRBIO SYSTEMS	London, UK		

PCR Instrument	PCRBIO SYSTEMS	London, UK		
Mini Plate Centrifuge, Model NG040	Nippon Genetics Europe GmbH	Düren, Deutschland		
FastGene Fast 96well PCR plate	Nippon Genetics Europe GmbH	Düren, Deutschland		
MicroAmp Optical Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA		
Pipetten, diverse	Eppendorf	Hamburg, Deutschland		
Explorer Mehrkanalpipette	Eppendorf	Hamburg, Deutschland		
Pipettus Akku	Hirschmann Laborgeräte	Eberstadt, Deutschland		
Costar Stripette (5 - 10 - 25 ml)	Corning incorporated	New York, USA		
Cellstar Cell culture flasks	Greiner Bio-ONE GmbH	Frickenhausen, Deutschland		
Cellstar 96well suspension culture plate	Greiner Bio-ONE GmbH	Frickenhausen, Deutschland		
sterile Werkbank Lamintir HB2472	Heraeus Instruments	Hanau, Deutschland		
sterile Werkbank Hera Safe	Heraeus Instruments	Hanau, Deutschland		
Inkubator Normoxie Function Line	Heraeus Instruments	Hanau, Deutschland		
Inkubator Hypoxie	Binder	Tuttlingen, Deutschland		
TNF (10 ng/ml)	Bio-Techne GmbH	Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland		
Interferon gamma (10ng/ml)	Bio-Techne GmbH	Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland		
Pregnelolonsulfat (TRPM3 agonist)	Bio-Techne GmbH	Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland	5376/50	
9-Phenanthrol (TRPM4 antagonist)	Bio-Techne GmbH	Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland	4999/50	
U73122 (TRPM4 agonist, TRPM3 antagonist, Phospholipase C inhibitor)	Bio-Techne GmbH	Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland	1268/10	

WS-12 (TRPM8 agonist)	Bio-Techne GmbH	Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland	3040/10	
CIM0216 (TRPM3 agonist)	Bio-Techne GmbH	Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland	5521/10	
Icilin (TRPM8 agonist)	Bio-Techne GmbH	Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland	1531/10	
Ononetin (TRPM3 antagonist)	Bio-Techne GmbH	Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland	5143/50	
Primidone (TRPM3 antagonist)	Bio-Techne GmbH	Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland		
AMTB (TRPM8 antagonist)	Bio-Techne GmbH	Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland	3989/10	
Carbonat-Bicarbonat buffer capsule (coaten auf 100ml H2O)	Sigma Aldrich	St. Louis, Missouri, USA		
Tween20 (0,05%)	Sigma Aldrich	St. Louis, Missouri, USA		
PBS (pH 7,4; 500 ml)	gibco, life technologies	Carlsbad, Californien, USA	70011-036	
1-Strep ultra TMB-Elisa (entwickeln)	Thermo Scientific	Rockford, USA	800-874-3723	
Sulfuric acid Triticur ( c(H2SO4)= 0,5 mol/l)	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland	HC85551272	
<b>Human IL8 ELISA Set</b>	<b>BD Biosciences</b>	<b>Erembodegem, Belgien</b>		
Capture Antibody: Anti-human IL-8	BD Biosciences	Erembodegem, Belgien	51-26541E	
Detection Antibody: Bitotinylated Anti-human IL-8	BD Biosciences	Erembodegem, Belgien	51-26542E	
Enzyme reagent: Streptavidin-horseradish peroxidase conjugate	BD Biosciences	Erembodegem, Belgien	51-9002813	
Standard: Recombinant Human IL-8	BD Biosciences	Erembodegem, Belgien	51-26546E	
<b>Human IL6 ELISA Set</b>	<b>BD Biosciences</b>	<b>Erembodegem, Belgien</b>		
Capture Antibody: Anti-human IL-6	BD Biosciences	Erembodegem, Belgien	51-26451E	

Detection Anti-body: Biotinylated Anti-human IL6	BD Biosciences	Erembodegem, Belgien	51-26452E	
Enzyme reagent: Streptavidin-horseradish peroxidase conjugate	BD Biosciences	Erembodegem, Belgien	51-9002813	
Standards: Recombinant human IL6	BD Biosciences	Erembodegem, Belgien	51-26456E	

### 2.3 Zellen und Zellkultur

Unmittelbar nach der Öffnung der betreffenden Gelenkskapsel wurden Proben des synovialen Gewebes entnommen und für die anschließende Zellisolation präpariert. Das entnommene synoviale Gewebe wurde in kleine Fragmente geschnitten und über Nacht mit Liberase bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension gefiltert (70 µm) und bei 300 g für 10 Minuten zentrifugiert. Dann wurde das Zellpellet mit Erythrozyten-Lyse-Puffer für 5 Minuten behandelt (20.7 g NH<sub>4</sub>Cl, 1.97 g NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 0.09 g EDTA ad 1 l H<sub>2</sub>O), nochmals für 10 Minuten zentrifugiert und dann in RPMI-1640 mit 10% FCS resuspendiert. Über Nacht wurden die Zellen inkubiert, dann wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um tote Zellen und Zellfragmente zu entfernen.

Zur Zellkultur wurden 6000 Zellen in 96-well-Mikrotiter-Platten ausgesät. Nach einer dreitägigen Wachstumsphase wurden die Zellen mit TNF (0,1 – 10 ng/ml) oder IFN (0,1 – 10 ng/ml) für 24 Stunden stimuliert (in RPMI-Medium mit 2%igem FBS, um die Proliferation gering zu halten; gilt für alle Versuche). Anschließend wurden die Zellen oder die Überstände für die RNA-Extraktion (Zellen) oder ELISA (Überstände) weiterverarbeitet.

### 2.4 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion wurde mittels des RNeasy Mini Kits von Qiagen durchgeführt. Dazu wurden ausschließlich die vom Hersteller empfohlenen und im Kit

enthaltenen Reagenzien verwendet und die Arbeitsschritte entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Nach der Extraktion wurden die RNA-Konzentration und Reinheit photometrisch bestimmt. Dazu wurde das Implen Nanofotometer P330 verwendet. Man verwendete hierbei die Einstellungen Lidfactor 50, dilution factor 1000, Background on, Konzentration in ng/µl, Factor 40. Anschließend wurde das Photometer mit einem Mikroliter destillierten Wassers genullt und anschließen konnte die Konzentration und Reinheit der RNA bestimmt werden. Anzustreben war eine sehr reine RNA mit A260/A280-Werten zwischen 1,8 und 2,0, was bei den durchgeführten Experimenten stets berücksichtigt wurde.

## 2.5 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mittels des QuantiTect Reverse Transcription Kits von Qiagen durchgeführt. Vor dem Beginn der DNA-Synthese wurde die RNA mit Aqua dest. verdünnt, sodass eine einheitliche Konzentration der RNA von 1µg RNA/ µl vorlag. Danach wurde der Versuch nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierzu verwendet wurden die Hettich 220R Micro Zentrifuge, die Mini Zentrifuge Modell NG002B und ein Thermocycler von Biorad.

## 2.6 Polymerase chain reaction – PCR

Die Polymerase chain reaction (PCR) wurde gemäß Herstellerangaben von PCR-Biosystems mit SyGreen-Farbstoff in einer 96-Well-Platte durchgeführt. Alle Ergebnisse wurden auf eine Referenz-DNA bezogen; in diesem Fall auf total human DNA, also eine DNA, welche die Informationen für sämtliche menschliche Gene kodiert. Sie war notwendig, damit das PCR-Programm eine Standardkurve für jeden untersuchten Kanal berechnen konnte, auf die alle anderen Detektionen bezogen werden konnten. Weiterhin wurden positive Ausschläge in der PCR nicht in den Berechnungen berücksichtigt, wenn diese nicht ebenfalls in der total human DNA detektiert wurden, da es sich in diesem Fall dann höchstwahrscheinlich um Verunreinigungen oder Primerdimere handelt, welche das Ergebnis verfälschen würden.

Für die Versuchsdurchführung wurden QuantiTect Sy-Green Mastermix und H<sub>2</sub>O (RNase-frei) aufgetaut, gemischt und kurz abzentrifugiert. Primer wurden auf Eis aufgetaut, gemischt und ebenfalls zentrifugiert, dann wieder auf Eis gestellt. Dann wurde der Mastermix für die verschiedenen Primer angesetzt: 6,8 µl H<sub>2</sub>O, 10µl SyGreen, 0,6µl fwd Primer und 0,6 µl rev Primer pro benötigtem Well. Der Mastermix wurde gut gemischt, zweimal kurz gevortext, zentrifugiert und auf Eis gestellt. Nun wurden 18µl Mastermix pro Well pipettiert, dann wurde 2µl cDNA (Template) oder bei den Kontrollen 2µl H<sub>2</sub>O (RNase-frei) hinzugegeben. Nun wurde die Platte mit PCR-Folie (Optical Adhesive Film) dicht abgeklebt und kurz zentrifugiert (1000 rpm 1 Minute). Anschließend wurde die Real-Time PCR Reaktion durchgeführt (*StepOnePlus™ Real-Time PCR System, ThermoFisher Scientific*). Dafür wurde als Einstellung eine komparative delta-delta-CT-Methode gewählt, die Dauer auf 2 Stunden gesetzt und die Temperaturen entsprechend für die verschiedenen Primer festgelegt. Das Reaktionsvolumen betrug 20µl und es wurden 40 Zyklen durchgeführt. Dann wurde die total human DNA als Referenzprobe und TBP als endogene Kontrolle ausgewählt und die PCR gestartet. Die Holding-Stage lief bei 95°C für 2 Minuten, dann folgten 40 Zyklen der Cycling Stage bei 95°C für 15 Sekunden und bei 60-70°C für 30 Sekunden. Folgende Primer wurden für die PCR verwendet, wobei TBP als Referenz bzw. housekeeper verwendet wurde:

TRPA1 forward	5'-TCCCTTCAGCTCTCCATTGC-3'
TRPA1 reverse	5'-CTCAGCAATGTGCGCCAACTG-3'
TRPM1 forward	5'-TCACCAACCAGCATATCCCC-3'
TRPM1 reverse	5'-GGAATATCCGCCACCCTG-3'
TRPM2 forward	5'-GAAGCGGATGATGAAGGACG-3'
TRPM2 reverse	5'-GTTACACCGTCGATGTAGC-3'
TRPM2 Var5 forward	5'-CTATGCGAACCACAAGACCC-3'
TRPM2 Var5 reverse	5'-CCACCAAACCCCATCATGTG-3'

TRPM3 forward	5'-TGGGGAATTGTGGAAAACCAG-3'
TRPM3 reverse	5'-CGAAGTTTCACCTCTGCTCC-3'
TRPM4 forward	5'-TCACGGTCAACAAACAGCTG-3'
TRPM4 reverse	5'-GGTAGGGACGGTAGAAGACG-3'
TRPM8 forward	5'-TTGTCTGGAAACTGGTTGCG-3'
TRPM8 reverse	5'-TGGTCTGCTCCCAAATGACT-3'
TRPV1 forward	5'-GCCTGAAGGAGCTTGTC AAC-3'
TRPV1 reverse	5'-CGCCCTTTGGTTTTCTTAAA-3'
TRPV2 forward	5'-GAAACTCCATGCTGCTGACG-3'
TRPV2 reverse	5'-GATGGCCAGGAAACACAGC-3'
TRPV3 forward	5'-ATTGCTCTGATGGGCGAGAC-3'
TRPV3 reverse	5'-ACGTGCGTCTTCCATTCAGT-3'
TRPV4 forward	5'-TTGCTGACCCACAAGAAACG-3'
TRPV4 reverse	5'-CACGGAAGGGCGAGTTAATG-3'
TBP forward	5'-TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA-3'
TBP reverse	5'-CACATCACAGCTCCCCACCA-3')

## 2.7 ELISA

Mittels ELISA (enzyme linked Immunosorbent Assay) wurde die IL-6 und IL-8 Produktion von RASF und OASF nach Stimulation verschiedener TRP-Kanäle unter pro-entzündlichen (mit Zugabe von TNF) und basalen (ohne Zugabe von TNF) Bedingungen bestimmt. Hierfür wurden absteigende Konzentrationen der Stimulantien appliziert und die Zellen bei Normoxie oder Hypoxie inkubiert.

### 2.7.1 Zellstimulation für den ELISA

Um den Einfluss von TRP-Kanälen auf die Zytokinproduktion zu untersuchen, wurden RASF mit Agonisten und Antagonisten gegen verschiedene TRP-Kanäle inkubiert. Dafür wurde das Wachstumsmedium (10% FCS) gegen Stimulationsmedium (2% FCS) getauscht und folgende Liganden verwendet:

<b>Ligand und Funktion</b>	<b>Konzentrationen</b>
PregS (TRPM3-Agonist)	50µM, 10µM, 5µM, 1µM
CIM0216 (TRPM3-Agonist)	50µM, 10µM
Ononetin (TRPM3-Antagonist)	50µM, 10µM
Primidon (TRPM3-Antagonist)	50µM, 10µM
9-Phenanthrol (TRPM4-Agonist)	50µM, 10µM
WS-12 (TRPM8-Agonist)	50µM, 10µM
U73122 (TRPM4-Agonist, TRPM3-Antagonist, Phospholipase-C-Inhibitor)	8µM, 12µM
Icilin (TRPM8-Agonist)	50µM, 10µM
AMTB (TRPM8-Antagonist)	10µM, 1µM
TNF-alpha	10ng/ ml

Pro Ansatz wurden jeweils 2 Platten stimuliert (mit und ohne TNF-Zugabe). Wurde TNF hinzugefügt, so wurden die Überstände nach 24h Inkubation bei 37°C abgenommen, ohne TNF nach 48 Stunden Inkubation. Die Überstände wurden direkt bei -20°C eingefroren oder im ELISA weiterverarbeitet.

### 2.7.2 Durchführung des IL-8-ELISA

Der IL8-ELISA wurde nach leicht modifizierter Anleitung des Hersteller BD Biosciences nach laborinterner Rücksprache durchgeführt. Hierzu wurden die vom Hersteller empfohlenen Puffer und Lösungen verwendet.

### 2.7.2.1 Versuchsvorbereitung

Zu Beginn wurde das Standard-Lyophilisat (170ng/tube) auf Raum-Temperatur erwärmt, anschließend in 1ml deionisiertem Wasser resuspendiert, gevortext und anschließend in 20µl-Aliquots eingefroren und bei -80°C gelagert.

Dann wurde eine 1ng/ml Standard- Lösung aus dem Stock-Standard hergestellt. Dazu wurde auf ein Aliquot (10µL) des Stock-Standards auf 990µl PBS gegeben. Aus dieser Stock-Lösung wurden nun 6 weitere Verdünnungen durch sukzessive 1:2 Verdünnungen hergestellt, bis man eine Verdünnungsreihe folgender Konzentrationen mit IL8-Standards erhielt:

1000ng, 500ng, 250ng, 125ng, 62,5ng, 31,25ng, 15,625ng, PBS.

PBS fungierte als 0-Standard.

Um den Waschpuffer herzustellen, wurden 900ml Wasser, 100ml PBS (10-fach konzentriert) und 500µl Tween (0,05%) gemischt.

Für den Coating-Puffer wurde eine Kapsel eines Carbonat-Bicarbonat-Puffers (Sigma-Aldrich) in 100ml Wasser gelöst und mithilfe eines Rührfisches vermischt. Pro Platte wurden 9 ml Coating Puffer benötigt, welcher aliquotiert bei 2 - 8°C bis zu sieben Tage gelagert werden konnte.

Als Blockpuffer wurde PBS mit 10% FBS, pH 7,0 verwendet. Dieser wurde steril hergestellt und wurde innerhalb von 3 Tagen verbraucht. Die Lagerung erfolgte bei 2 - 8°C.

### 2.7.2.2 Versuchsdurchführung

Die Experimente werden in 96-Well-ELISA-Platten durchgeführt. Pro Well wurde 100µl Capture Antibody gelöst in Coating buffer (Carbonat-Bicarbonat-Puffer) in einer 1:300 Verdünnung appliziert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte mit Caseinpuffer (1:5 verdünnt) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschung erfolgte die Probenzugabe, Inkubation für

zwei Stunden bei Raumtemperatur, erneute Waschung und schließlich die Zugabe des Capture Antikörpers und des Streptavidins (1:300 verdünnt in PBS). Nach einer Stunde Inkubation und erneuter Waschung wurde 50µl Substratlösung (*1-Step™ ultra TMB-Elisa*) pro Well hinzugegeben und die Platte im Dunklen inkubiert, bis eine Verfärbung eintrat (30min). Dann wurde 50µl Stopp-Lösung (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pro Well hinzugefügt. Nun erfolgte das Messen der Absorption am Spektrometer bei dualer Wellenlänge von 450 und 630 nm, bei einer pathlength-correction von 100µl.

### 2.7.3. Versuchsdurchführung des IL-6-ELISAs (384-well-Platte)

Die Experimente für den IL-6-ELISA wurden teilweise mit einer 364-Well-ELISA-Platte durchgeführt. Hier wurde das Volumen auf 15µl reduziert, der restliche Versuchsaufbau folgte oben genannten Angaben.

## 2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels *IBM SPSS Statistics 26*. Es werden die Expressionsraten der einzelnen Patienten direkt miteinander verglichen, zudem wurde eine Signifikanztestung im Rahmen einer ANOVA durchgeführt. Hierzu wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet. Einzelne Untergruppenvergleiche wurden mit dem Man-Whitney-U-Test berechnet.

## 3. Ergebnisse

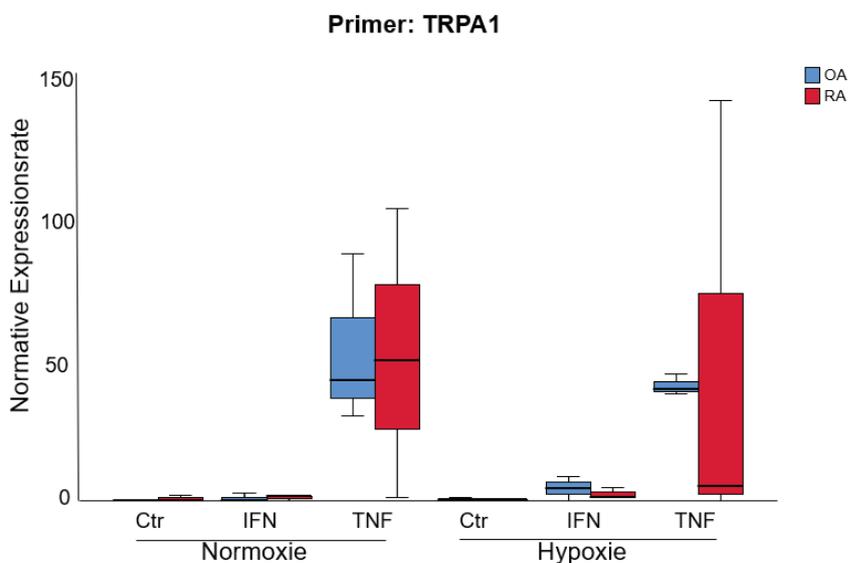
### 3.1 Einfluss der Zytokinstimulationen auf die TRP-Produktion

Als erster Schritt wurden folgende TRP-Kanäle auf ihre Expression in synovialen Fibroblasten untersucht: TRPM1 konnte auch in der verwendeten Referenz DNA nicht detektiert werden, sodass hier nicht abschließend geklärt werden konnte, ob dieser Kanal in SF exprimiert wird.

Es sollte untersucht werden, ob es hinsichtlich der Expression der Kanäle unter Entzündungs- bzw. Kontrollbedingungen einen Unterschied gibt und ob RASFs gegenüber OASFs ein anderes Expressionsverhalten der Kanäle zeigen. Wenn zwischen RASFs und OASFs kein Unterschied bestand, wurden die Gruppen zusammen analysiert, um die Aussagekraft der Statistik zu erhöhen. Die Zellen wurden nach 72 Stunden Wachstum unter Norm- oder Hypoxie jeweils 24 Stunden mit TNF oder IFN inkubiert oder unstimuliert belassen. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der TRP-Expression mittels qPCR.

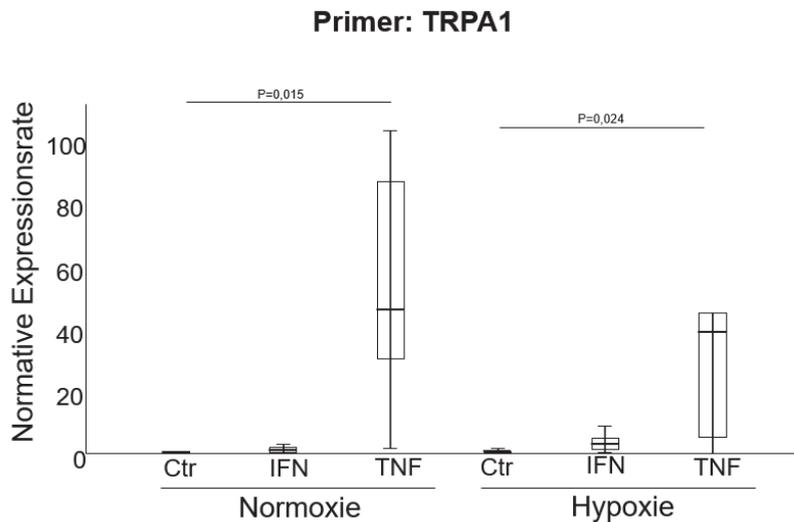
Die Expression von TRPA1 sowie das entsprechende Protein wurde in vorherigen Studien in synovialen Fibroblasten bereits bestätigt [36], [55], [56]. In dieser Arbeit sollte nun der Effekt verschiedener Zytokine auf die Expression von TRPA1 genauer betrachtet werden.

Im Vergleich der OASFs und RASFs war zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Expression zu beobachten (siehe Abbildung 3.1).



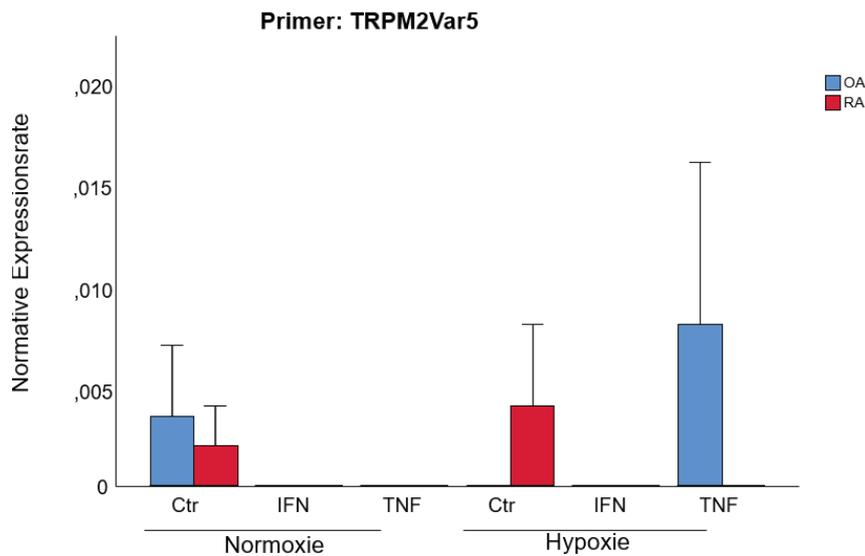
**Abbildung 3.1:** Normative Expression von TRPA1 bei (n=6) (OASFs n=3, RASFs n=3). Die Fibroblasten wurden mit TNF bzw. IFN über 24h inkubiert. Die normative Expressionsrate des jeweiligen Primers im Verhältnis zur Referenz-DNA wird auf der y-Achse dargestellt, die Art der Stimulation (Hypoxie/ Normoxie, TNF/IFN/Ctr.) auf der x-Achse. Der CT-Wert für die Referenz-DNA betrug 27. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der Werte, der Median der Ergebnisse ist als durchgängiger Strich eingezeichnet. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet. In blauer Farbe sind die OASFs, in roter Farbe die RASFs dargestellt.

Da zwischen RASFs und OASFs kein Unterschied bestand, wurden die Gruppen zusammen analysiert. Die Expression von TRPA1 wurde sowohl in Normoxie (+8195%) als auch in Hypoxie (+8401%) durch TNF gesteigert. (siehe Abbildung 3.1):



**Abbildung 3.2:** Normative Expression von TRPA1 bei (n=6) (OASFs n=3, RASFS n=3). Die Fibroblasten wurden mit TNF bzw. IFN über 24h inkubiert. Die normative Expressionsrate des jeweiligen Primers im Verhältnis zur Referenz-DNA wird auf der y-Achse dargestellt, die Art der Stimulation (Hypoxie/ Normoxie, TNF/IFN/Ctr.) auf der x-Achse. Der CT-Wert für die Referenz-DNA betrug 27. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der Werte, der Median der Ergebnisse ist als durchgängiger Strich eingezeichnet. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet.

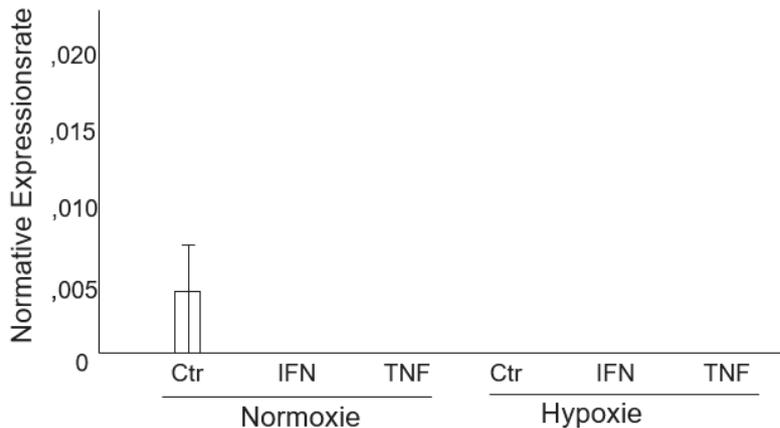
TRPM2Var5, eine Spliceform von TRPM2, scheint ähnlich dem TRPM2 nicht besonders stark exprimiert zu werden, mit wenigen Ausnahmen. Diese Spliceform wurde untersucht, da sie anders als die Wildtyp-Variante speziell in synovialen Fibroblasten vorkommt und über andere Substrate aktiviert werden kann als die Wildtyp-Variante. Zwischen RASFs und OASFs waren für TRPM2Var5 keine signifikanten Unterschiede zu detektieren (siehe Abbildung 3.3).



**Abbildung 3.3** Normative Expression von TRPM2Var5 bei (n=6) (OASFs n=3, RASFs n=3). Die Fibroblasten wurden mit TNF bzw. IFN über 24h inkubiert. Die normative Expressionsrate des jeweiligen Primers im Verhältnis zur Referenz-DNA wird auf der y-Achse dargestellt, die Art der Stimulation (Hypoxie/ Normoxie, TNF/IFN/Ctr.) auf der x-Achse. Der CT-Wert für die Referenz-DNA betrug 27. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der Werte, der Median der Ergebnisse ist als durchgängiger Strich eingezeichnet. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet. In blauer Farbe sind die OASFs, in roter Farbe die RASFs dargestellt.

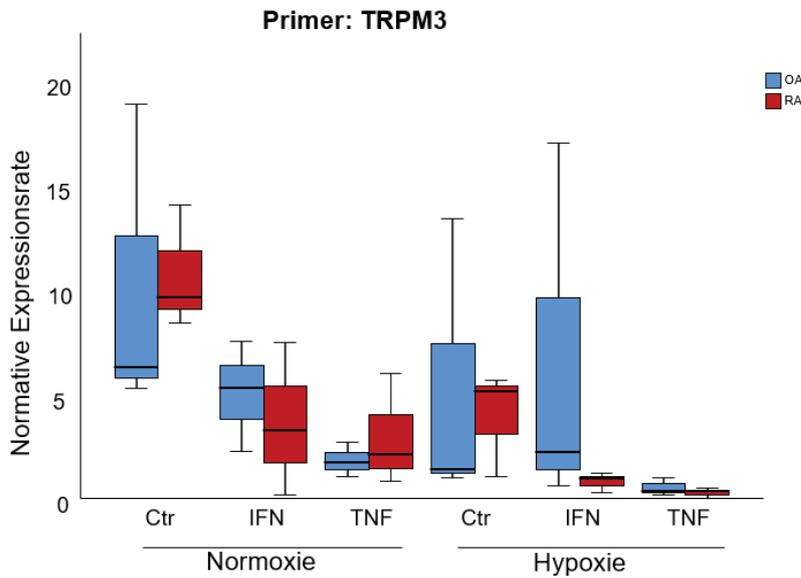
Betrachtet man beide Gruppen zusammen, so ergeben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Im Vergleich zur Referenz-DNA wird der Kanal niedriger in unseren Probanden exprimiert (siehe Abbildung 3.4).

#### Primer: TRPM2Var5



**Abbildung 3.4** Normative Expression von TRPM2Var5 bei (n=6) (OASFs n=3, RASFS n=3). Die Fibroblasten wurden mit TNF bzw. IFN über 24h inkubiert. Die normative Expressionsrate des jeweiligen Primers im Verhältnis zur Referenz-DNA wird auf der y-Achse dargestellt, die Art der Stimulation (Hypoxie/ Normoxie, TNF/IFN/Ctr.) auf der x-Achse. Der CT-Wert für die Referenz-DNA betrug 27. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der Werte, der Median der Ergebnisse ist als durchgängiger Strich eingezeichnet. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet.

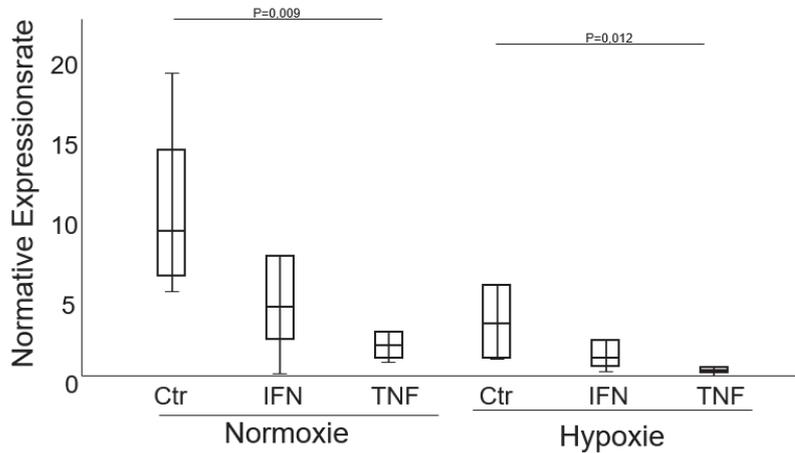
Bei TRPM3 zeigte sich zwischen RASFs und OASFs kein signifikanter Unterschied (s. Abb. 3.5).



**Abbildung 3.5:** Normative Expression von TRPM3 bei (n=6) (OASFs n=3, RASFs n=3). Die Fibroblasten wurden mit TNF bzw. IFN über 24h inkubiert. Die normative Expressionsrate des jeweiligen Primers im Verhältnis zur Referenz-DNA wird auf der y-Achse dargestellt, die Art der Stimulation (Hypoxie/ Normoxie, TNF/IFN/Ctr.) auf der x-Achse. Der CT-Wert für die Referenz-DNA betrug 27. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der Werte, der Median der Ergebnisse ist als durchgängiger Strich eingezeichnet. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet. In blauer Farbe sind die OASFs, in roter Farbe die RASFs dargestellt.

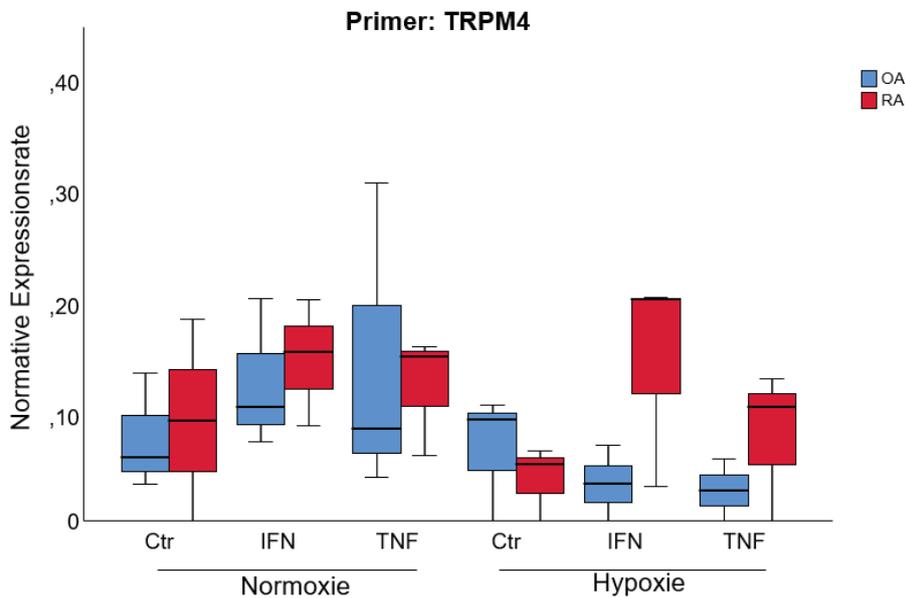
Insgesamt zeigte sich eine signifikante Reduktion der Expression unter TNF-  $\alpha$  (sowohl bei Normoxie als auch bei Hypoxie) im Vergleich zur Kontrolle. Unter Interferon wurde der Kanal tendenziell stärker exprimiert als unter TNF (siehe Abbildung 3.6).

### Primer: TRPM3



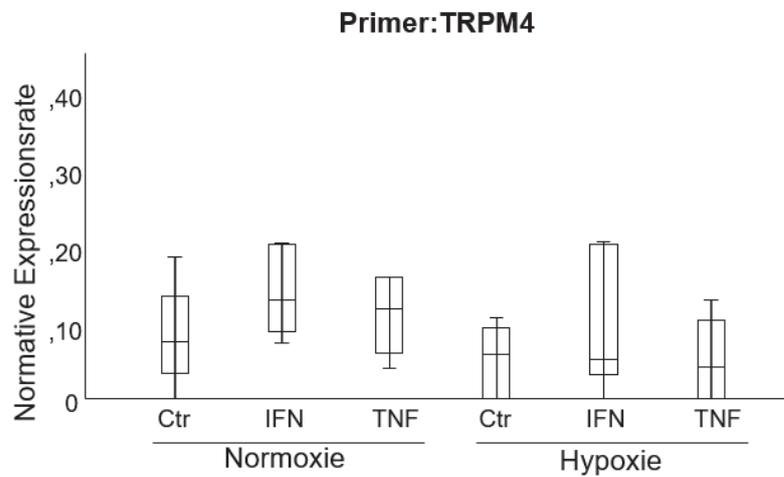
**Abbildung 3.6:** Normative Expression von TRPM3 bei (n=6) (OASFs n=3, RASFS n=3). Die Fibroblasten wurden mit TNF bzw. IFN über 24h inkubiert. Die normative Expressionsrate des jeweiligen Primers im Verhältnis zur Referenz-DNA wird auf der y-Achse dargestellt, die Art der Stimulation (Hypoxie/ Normoxie, TNF/IFN/Ctr.) auf der x-Achse. Der CT-Wert für die Referenz-DNA betrug 27. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der Werte, der Median der Ergebnisse ist als durchgängiger Strich eingezeichnet. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet.

Für TRPM4 ließen sich zwischen RAs und OAs keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Expression detektieren (s. Abb. 3.7).



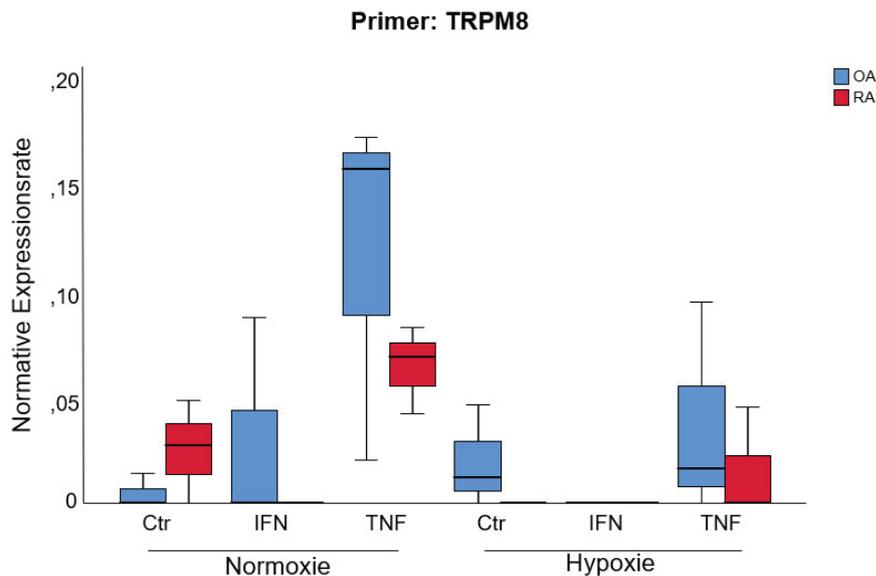
**Abbildung 3.7:** Normative Expression von TRPM4 bei (n=6) (OASFs n=3, RASFS n=3). Die Fibroblasten wurden mit TNF bzw. IFN über 24h inkubiert. Die normative Expressionsrate des jeweiligen Primers im Verhältnis zur Referenz-DNA wird auf der y-Achse dargestellt, die Art der Stimulation (Hypoxie/ Normoxie, TNF/IFN/Ctr.) auf der x-Achse. Der CT-Wert für die Referenz-DNA betrug 27. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der Werte, der Median der Ergebnisse ist als durchgängiger Strich eingezeichnet. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet. In blauer Farbe sind die OASFs, in roter Farbe die RASFs dargestellt.

Auch bei der Analyse beider Gruppen gemeinsam zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Stimulationen (s. Abb. 3.8).



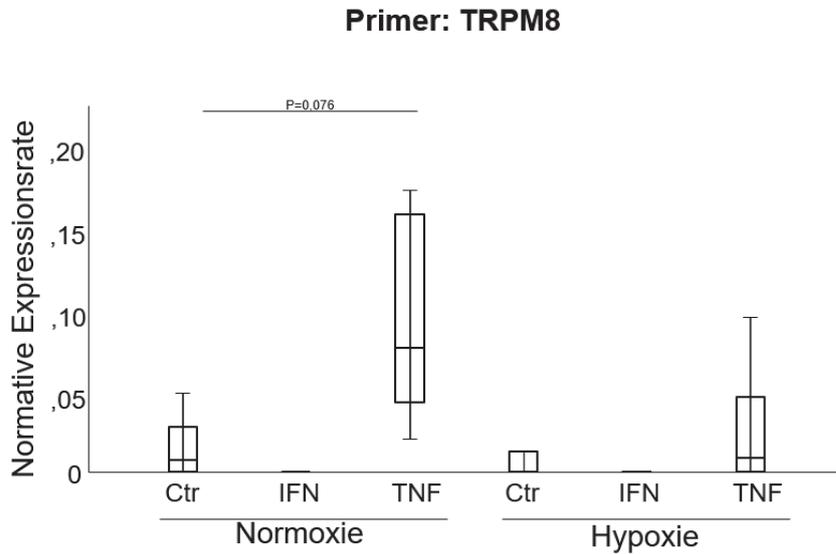
**Abbildung 3.8:** Normative Expression von TRPM4 bei (n=6) (OASFs n=3, RASFS n=3). Die Fibroblasten wurden mit TNF bzw. IFN über 24h inkubiert. Die normative Expressionsrate des jeweiligen Primers im Verhältnis zur Referenz-DNA wird auf der y-Achse dargestellt, die Art der Stimulation (Hypoxie/ Normoxie, TNF/IFN/Ctr.) auf der x-Achse. Der CT-Wert für die Referenz-DNA betrug 27. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der Werte, der Median der Ergebnisse ist als durchgängiger Strich eingezeichnet. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet.

Da wir keinen Unterschied in der Expression des untersuchten TRP-Kanals TRPM8 zwischen OA und RA feststellen konnten, wurden beide Gruppen einzeln, aber auch zusammen analysiert. Zwischen RAs und OAs ließ sich kein signifikanter Unterschied detektieren, jedoch ließ sich bei den OAs in allen Stimulationen eine stärkere Expression von TRPM8 beobachten (s.Abb.3.10). In Anbetracht der Ergebnisse erscheint es sinnvoll, die Untersuchung mit einem größeren Stichprobenumfang zu wiederholen.



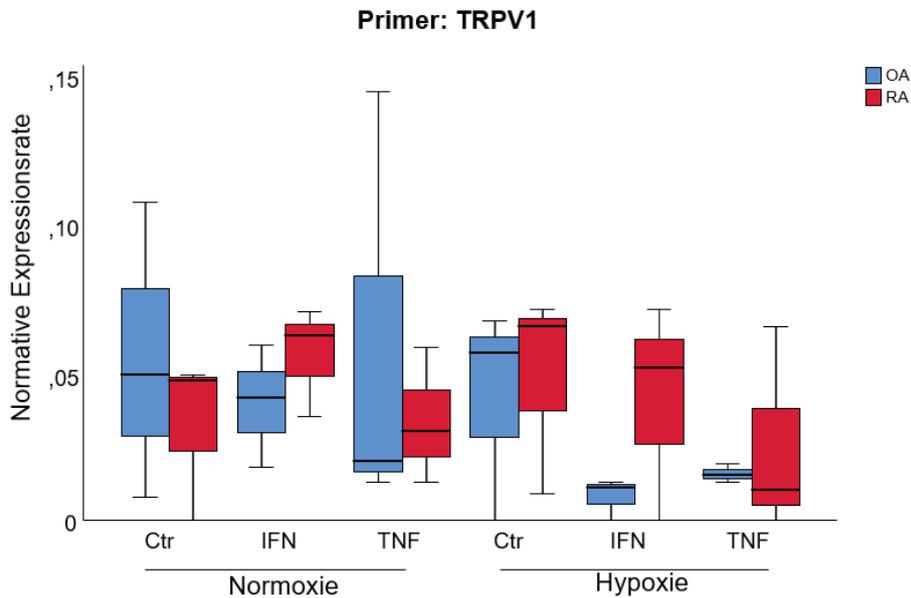
**Abbildung 3.9:** Normative Expression von TRPM8 bei (n=6) (OASFs n=3, RASFs n=3). Die Fibroblasten wurden mit TNF bzw. IFN über 24h inkubiert. Die normative Expressionsrate des jeweiligen Primers im Verhältnis zur Referenz-DNA wird auf der y-Achse dargestellt, die Art der Stimulation (Hypoxie/ Normoxie, TNF/IFN/Ctr.) auf der x-Achse. Der CT-Wert für die Referenz-DNA betrug 27. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der Werte, der Median der Ergebnisse ist als durchgängiger Strich eingezeichnet. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet. In blauer Farbe sind die OASFs, in roter Farbe die RASFs dargestellt.

Unter TNF-Einfluss bei Normoxie wurde TRPM8 tendenziell stärker exprimiert als unter Kontrollbedingungen. Insgesamt wurde der Kanal in Fibroblasten im Vergleich zur total human RNA weniger stark exprimiert. Unter Interferon ließ sich TRPM8 kaum detektieren (siehe Abbildung 3.10).



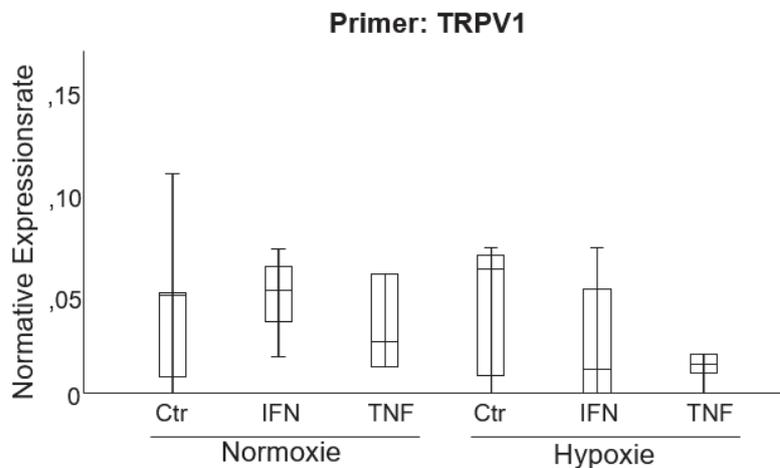
**Abbildung 3.10:** Normative Expression von TRPM8 bei (n=6) (OASFs n=3, RASFS n=3). Die Fibroblasten wurden mit TNF bzw. IFN über 24h inkubiert. Die normative Expressionsrate des jeweiligen Primers im Verhältnis zur Referenz-DNA wird auf der y-Achse dargestellt, die Art der Stimulation (Hypoxie/ Normoxie, TNF/IFN/Ctr.) auf der x-Achse. Der CT-Wert für die Referenz-DNA betrug 27. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der Werte, der Median der Ergebnisse ist als durchgängiger Strich eingezeichnet. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet.

Die Expression von TRPV1 ergab zwischen RAs und OAs keine signifikanten Unterschiede (s.Abb. 3.11).



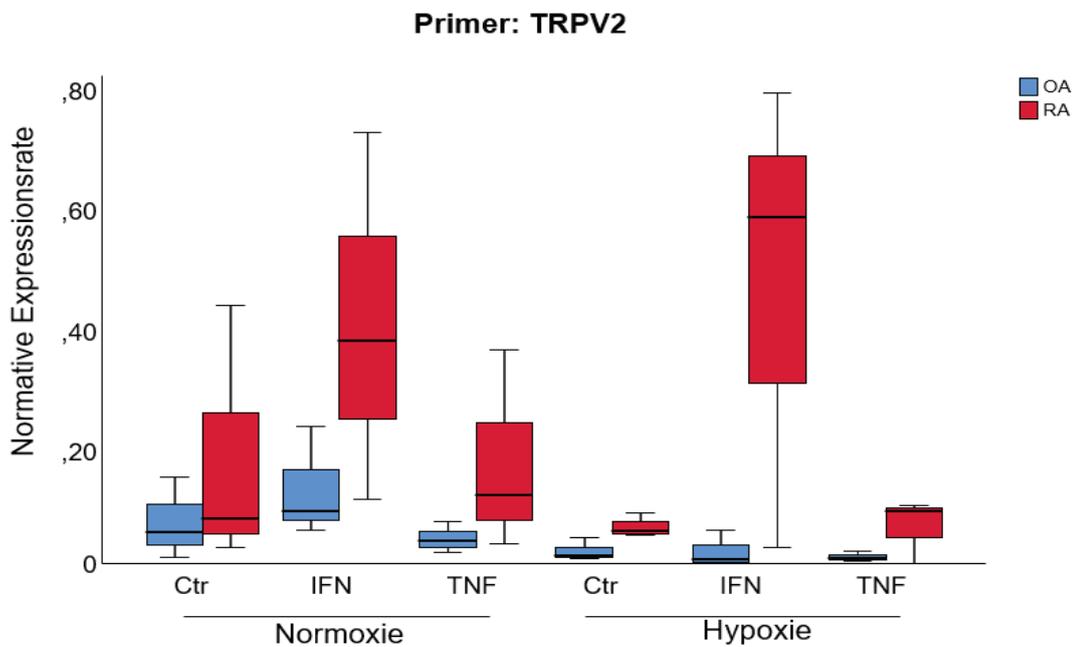
**Abbildung 3.11:** Normative Expression von TRPV1 bei (n=6) (OASFs n=3, RASFs n=3). Die Fibroblasten wurden mit TNF bzw. IFN über 24h inkubiert. Die normative Expressionsrate des jeweiligen Primers im Verhältnis zur Referenz-DNA wird auf der y-Achse dargestellt, die Art der Stimulation (Hypoxie/ Normoxie, TNF/IFN/Ctr.) auf der x-Achse. Der CT-Wert für die Referenz-DNA betrug 27. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der Werte, der Median der Ergebnisse ist als durchgängiger Strich eingezeichnet. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet. In blauer Farbe sind die OASFs, in roter Farbe die RASFs dargestellt.

Bei TRPV1 ließen sich unter den verschiedenen Stimulationen keine signifikanten Unterschiede detektieren, der Kanal wurde im Vergleich zur Referenz-RNA insgesamt weniger exprimiert (siehe Abbildung 3.12).



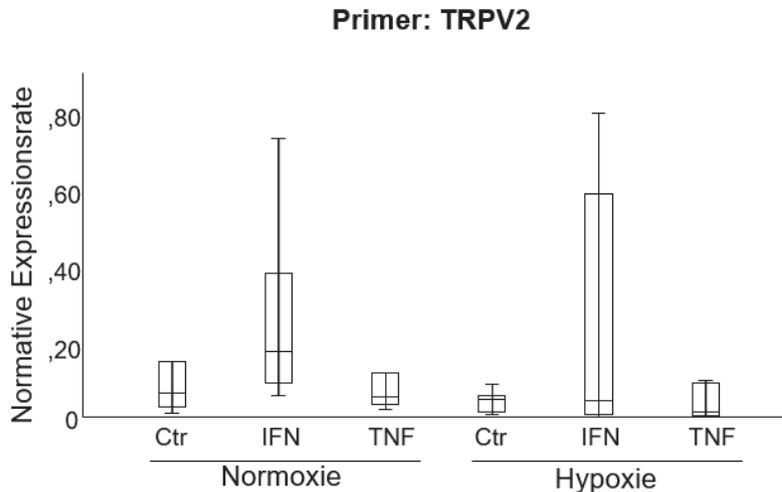
**Abbildung 3.12:** Normative Expression von TRPV1 bei (n=6) (OASFs n=3, RASFs n=3). Die Fibroblasten wurden mit TNF bzw. IFN über 24h inkubiert. Die normative Expressionsrate des jeweiligen Primers im Verhältnis zur Referenz-DNA wird auf der y-Achse dargestellt, die Art der Stimulation (Hypoxie/ Normoxie, TNF/IFN/Ctr.) auf der x-Achse. Der CT-Wert für die Referenz-DNA betrug 27. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der Werte, der Median der Ergebnisse ist als durchgängiger Strich eingezeichnet. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet.

Für TRPV2 zeigte sich zwischen RAs und OAs kein relevanter Unterschied. In diesem Fall schienen die RAs mehr TRPV2 zu exprimieren, wobei beide Gruppen im Vergleich zur Referenz weniger TRPV2 exprimierten (s. Abb. 3.13). Trotz allem wäre es sinnvoll, die Untersuchung mit einem größeren Stichprobenumfang zu wiederholen.



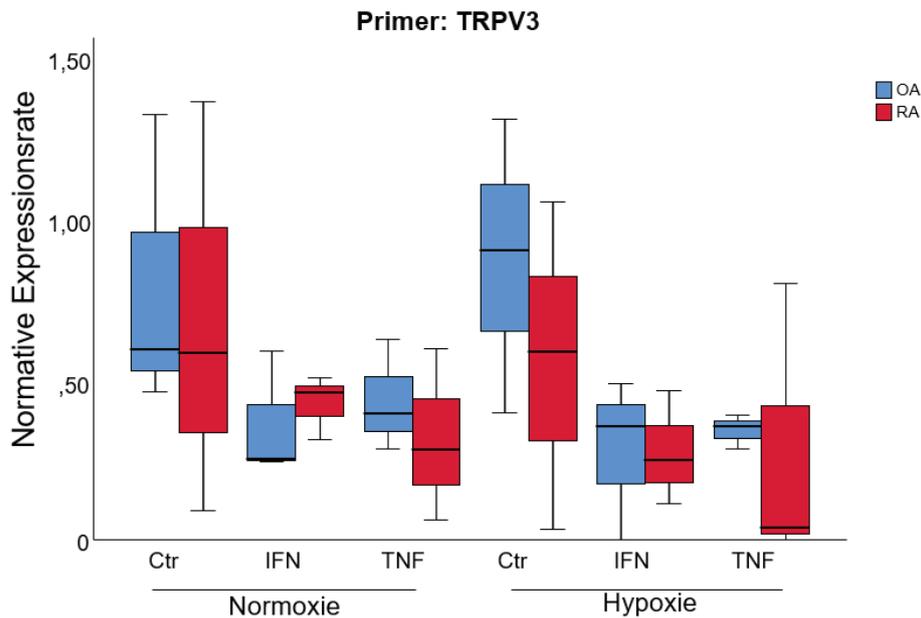
**Abbildung 3.13:** Normative Expression von TRPV2 bei (n=6) (OASFs n=3, RASFs n=3). Die Fibroblasten wurden mit TNF bzw. IFN über 24h inkubiert. Die normative Expressionsrate des jeweiligen Primers im Verhältnis zur Referenz-DNA wird auf der y-Achse dargestellt, die Art der Stimulation (Hypoxie/ Normoxie, TNF/IFN/Ctr.) auf der x-Achse. Der CT-Wert für die Referenz-DNA betrug 27. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der Werte, der Median der Ergebnisse ist als durchgängiger Strich eingezeichnet. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet. In blauer Farbe sind die OASFs, in roter Farbe die RASFs dargestellt.

TRPV2 wurde unter Interferon stärker exprimiert als unter den anderen Stimulationen, jedoch zeigte sich kein signifikanter Unterschied und der Kanal wurde im Vergleich zur Referenz insgesamt vermindert exprimiert (s.Abb. 3.14):



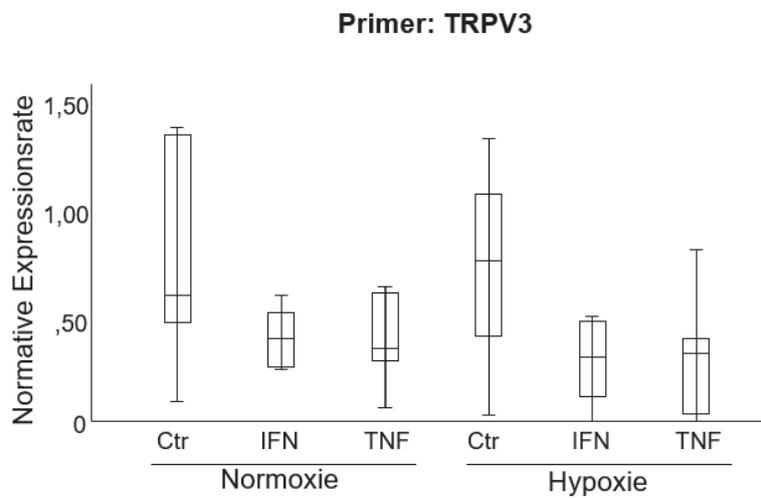
**Abbildung 3.14:** Normative Expression von TRPV2 bei (n=6) (OASFs n=3, RASFS n=3). Die Fibroblasten wurden mit TNF bzw. IFN über 24h inkubiert. Die normative Expressionsrate des jeweiligen Primers im Verhältnis zur Referenz-DNA wird auf der y-Achse dargestellt, die Art der Stimulation (Hypoxie/ Normoxie, TNF/IFN/Ctr.) auf der x-Achse. Der CT-Wert für die Referenz-DNA betrug 27. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der Werte, der Median der Ergebnisse ist als durchgängiger Strich eingezeichnet. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet.

Zwischen RAs und OAs bestand hinsichtlich der Expression von TRPV3 kein signifikanter Unterschied (s. Abb. 3.15).



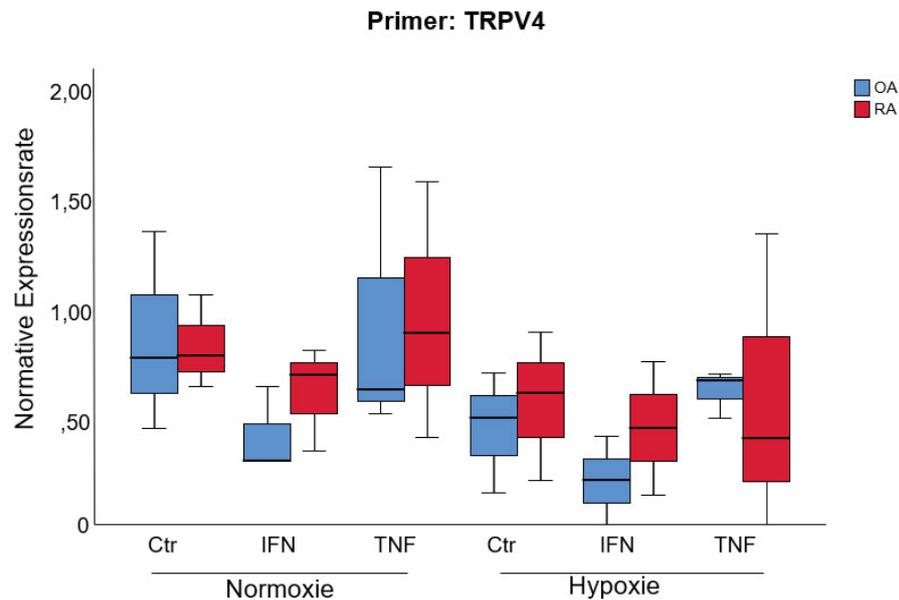
**Abbildung 3.15:** Normative Expression von TRPV3 bei (n=6) (OASFs n=3, RASFs n=3). Die Fibroblasten wurden mit TNF bzw. IFN über 24h inkubiert. Die normative Expressionsrate des jeweiligen Primers im Verhältnis zur Referenz-DNA wird auf der y-Achse dargestellt, die Art der Stimulation (Hypoxie/ Normoxie, TNF/IFN/Ctr.) auf der x-Achse. Der CT-Wert für die Referenz-DNA betrug 27. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der Werte, der Median der Ergebnisse ist als durchgängiger Strich eingezeichnet. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet. In blauer Farbe sind die OASFs, in roter Farbe die RASFs dargestellt.

TRPV3 zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stimulationen (s. Abb. 3.16):



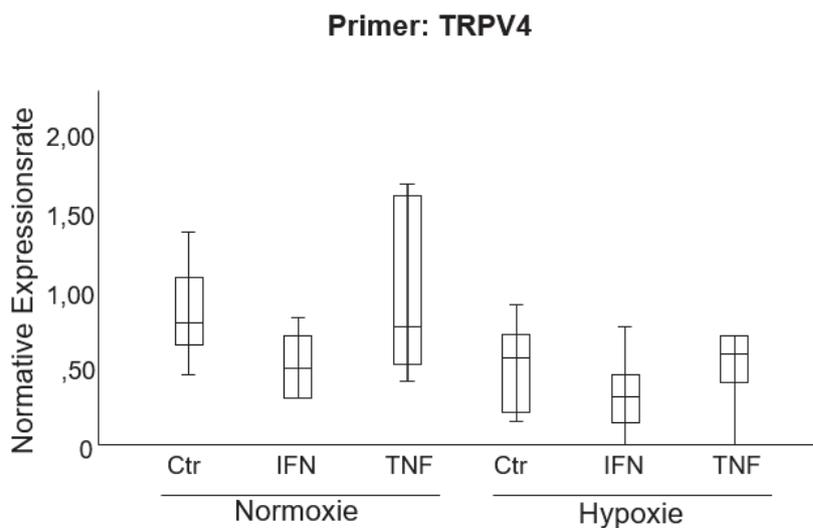
**Abbildung 3.16:** Normative Expression von TRPV3 bei (n=6) (OASFs n=3, RASFS n=3). Die Fibroblasten wurden mit TNF bzw. IFN über 24h inkubiert. Die normative Expressionsrate des jeweiligen Primers im Verhältnis zur Referenz-DNA wird auf der y-Achse dargestellt, die Art der Stimulation (Hypoxie/ Normoxie, TNF/IFN/Ctr.) auf der x-Achse. Der CT-Wert für die Referenz-DNA betrug 27. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der Werte, der Median der Ergebnisse ist als durchgängiger Strich eingezeichnet. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet.

Zwischen RAs und OAs ließen sich keine signifikanten Expressionsunterschiede für TRPV4 detektieren (s.Abb. 3.17):

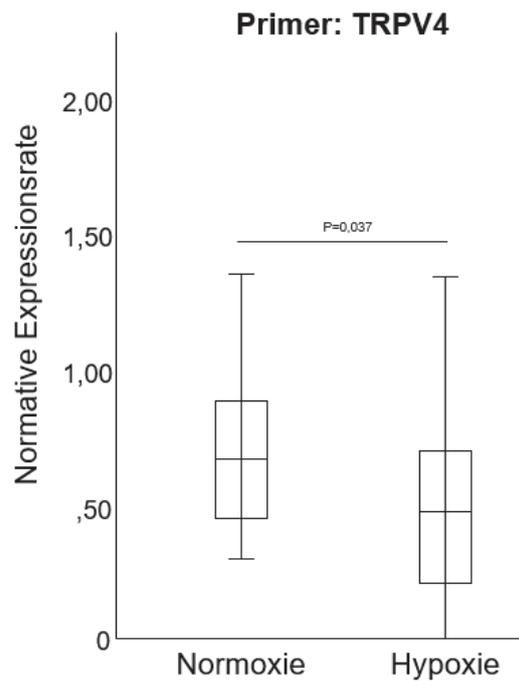


**Abbildung 3.17:** Normative Expression von TRPV3 bei (n=6) (OASFs n=3, RASFs n=3). Die Fibroblasten wurden mit TNF bzw. IFN über 24h inkubiert. Die normative Expressionsrate des jeweiligen Primers im Verhältnis zur Referenz-DNA wird auf der y-Achse dargestellt, die Art der Stimulation (Hypoxie/ Normoxie, TNF/IFN/Ctr.) auf der x-Achse. Der CT-Wert für die Referenz-DNA betrug 27. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der Werte, der Median der Ergebnisse ist als durchgängiger Strich eingezeichnet. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet. In blauer Farbe sind die OASFs, in roter Farbe die RASFs dargestellt.

TRPV4 zeigte hinsichtlich der Expression in verschiedenen Stimulationen keine signifikanten Unterschiede. Im Vergleich zur Kontrolle wurde der Kanal unter TNF vermehrt exprimiert (s. Abb. 3.18 a). Jedoch zeigte sich eine generelle Reduktion der Regulation insgesamt unter Hypoxie. Betrachtet man Normoxie und Hypoxie insgesamt ohne Unterteilung in die einzelnen Stimulationen, so ergab sich eine signifikante Reduktion der TRPV4-Expression unter Hypoxie im Vergleich zur Normoxie welche zum Niveau  $p = 0,037$  signifikant war (s. Abb.3.18 b):



**Abbildung 3.18 a):** Normative Expression von TRPV3 bei (n=6) (OASFs n=3, RASFS n=3). Die Fibroblasten wurden mit TNF bzw. IFN über 24h inkubiert. Die normative Expressionsrate des jeweiligen Primers im Verhältnis zur Referenz-DNA wird auf der y-Achse dargestellt, die Art der Stimulation (Hypoxie/ Normoxie, TNF/IFN/Ctr.) auf der x-Achse. Der CT-Wert für die Referenz-DNA betrug 27. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der Werte, der Median der Ergebnisse ist als durchgängiger Strich eingezeichnet. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet.



**Abbildung 3.18 b):** Normative Expression von TRPV3 bei (n=6) (OASFs n=3, RASFS n=3). Die Fibroblasten wurden mit TNF bzw. IFN über 24h inkubiert. Die normative Expressionsrate des jeweiligen Primers im Verhältnis zur Referenz-DNA wird auf der y-Achse dargestellt, die Art der Stimulation (Hypoxie/ Normoxie, TNF/IFN/Ctr.) auf der x-Achse. Der CT-Wert für die Referenz-DNA betrug 27. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der Werte, der Median der Ergebnisse ist als durchgängiger Strich eingezeichnet. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet.

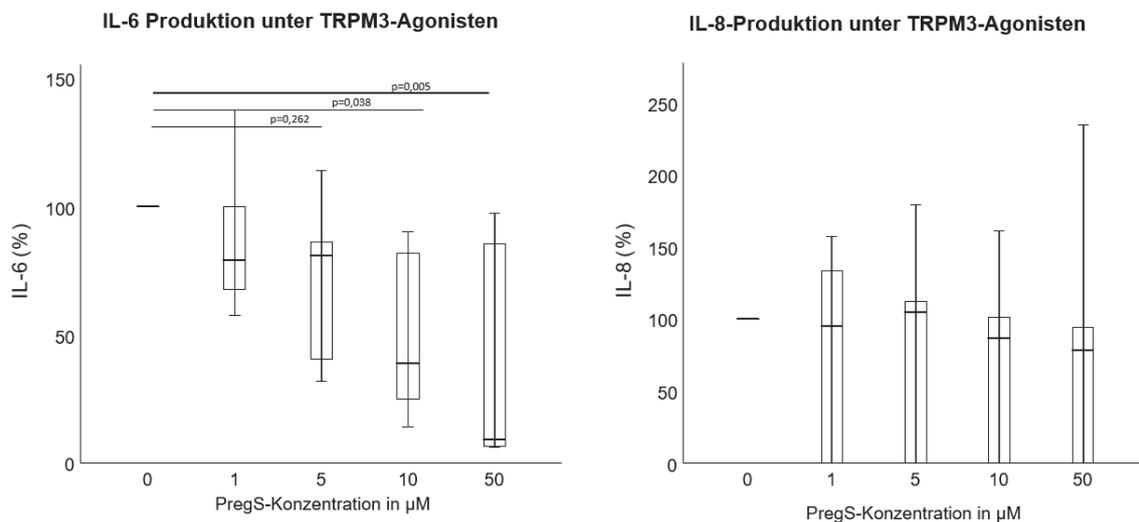
### 3.2 Ergebnisse des ELISA

Nachdem bei der PCR die Expression und Regulation der TRP-Kanäle auf Genebene untersucht wurde, sollte nun mittels ELISA gezeigt werden, welchen Einfluss die Kanäle auf Zellebene hinsichtlich einer möglichen Zytokinproduktion in der Zielzelle haben. Dazu wurden Fibroblasten mit unterschiedlichen TRP-Liganden stimuliert, und 24 Stunden mit TNF oder 48 Stunden ohne TNF bei Normoxie inkubiert. Anschließend wurde ein Sandwich-ELISA mit den Zellkulturüberständen durchgeführt und die IL-6 – und IL-8-Produktion gemessen.

### 3.2.1 Der Einfluss von TRPM3-Agonisten und -Antagonisten

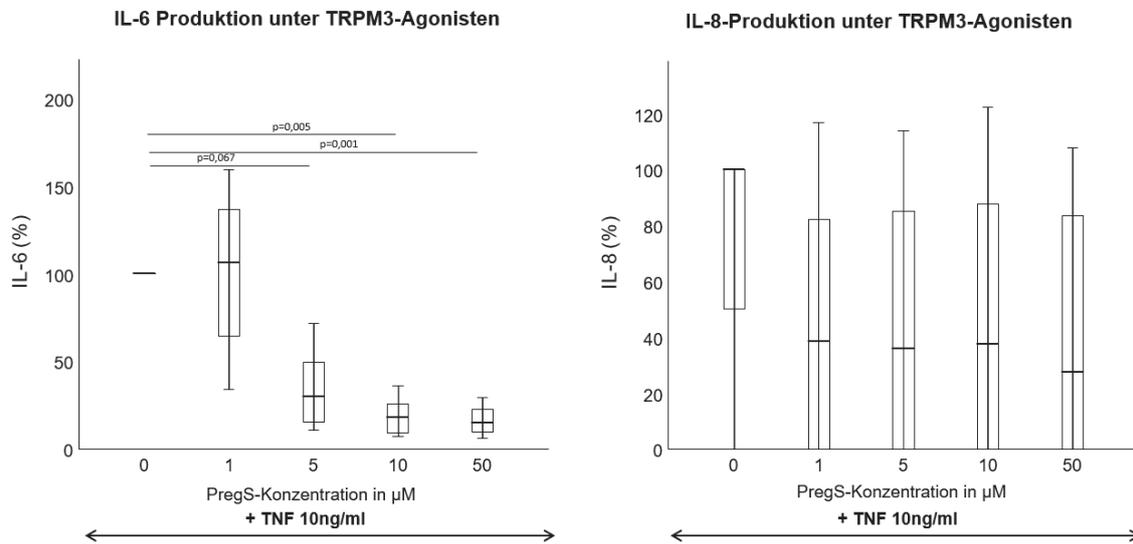
PregS ist ein aktivierender Ligand des transient receptor potential cation channel subfamily M member 3 (TRPM3) und kann über die Aktivierung von Kalziumkanälen die Zytokinproduktion verschiedener Gewebe beeinflussen [57]. Er ist weiterhin ein wichtiger Aktivator für die TRPM3-vermittelte Gentranskription [58]. Hier wird der Einfluss auf die Produktion von Interleukin-6 in synovialen Fibroblasten beschrieben.

Man sah im Median eine signifikante Abnahme der IL-6-Konzentration bei zunehmender PregS-Konzentration ohne Zugabe weiterer Stimuli, die im Kruskal-Wallis Test signifikant war, bei der IL-8-Sekretion zeigte sich kein Effekt (s. Abb.3.19 a) und b)).



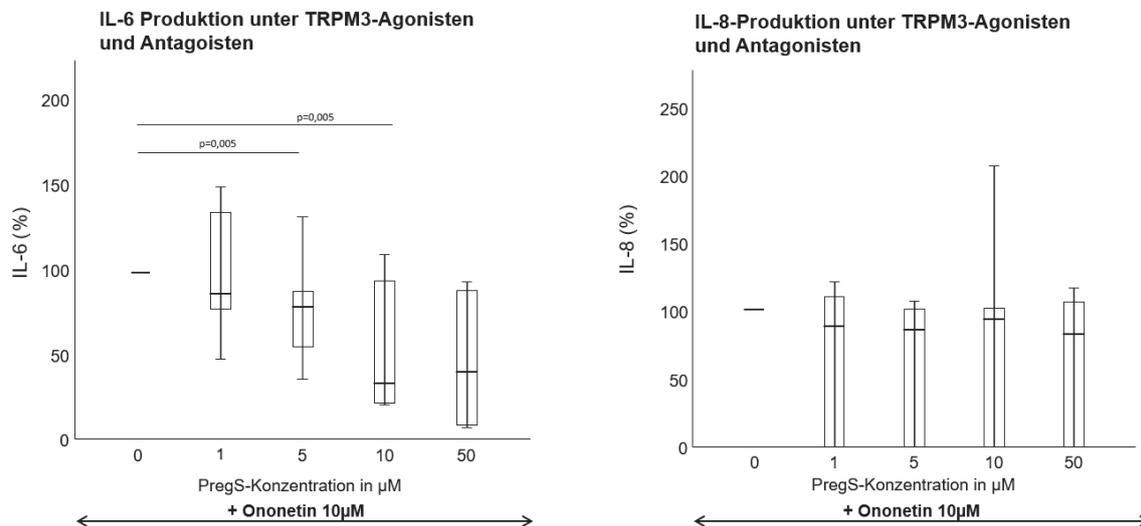
**Abbildung 3.19 a), b):** Konzentrationsabhängiger Einfluss von PregS auf die IL-6- (a) bzw. IL-8- (b) Sekretion von RASFs (n=3). Die Stimulation erfolgte über 48 Stunden. 100% entsprechen 505+/- 722 pg IL-6 pro ml bzw. 808 +/- 479 pg IL-8 pro ml. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der IL-6/ IL-8- Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet.

Wurde die PregS-Stimulation unter pro-inflammatorischen Bedingungen durchgeführt (Zugabe von 10ng/mL TNF) wurde ebenfalls eine signifikante Abnahme der IL-6-Sekretion bei steigenden PregS-Konzentrationen gemessen, bei IL-8 zeigte sich keine nennenswerte Veränderung (siehe Abbildung 3.20 a) und b)).



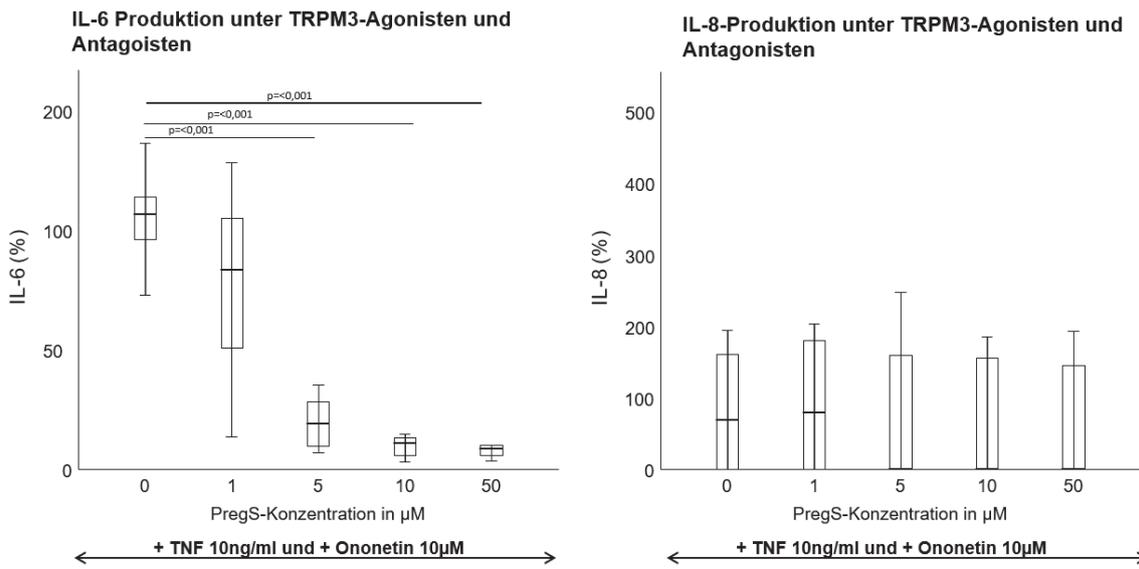
**Abbildung 3.20 a), b):** Konzentrationsabhängiger Einfluss von PregS auf die IL-6- (a) bzw. IL-8- (b) Sekretion von RASFs (n=3) unter TNF. Die Stimulation erfolgte über 24 Stunden. 100% entsprechen 180 +/- 181 pg IL-6 pro ml bzw. 9435 +/- 15635 pg IL-8 pro ml. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der IL-6/ IL-8- Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet.

Als nächstes wurde die Spezifität von PregS an TRPM3 durch Zugabe von Ononetin (10 $\mu$ M, TRPM3-Antagonist) untersucht. Es wird beschrieben, dass Ononetin effektiv einen durch PregS ausgelösten Kalziueinstrom am TRPM3-Kanal blockiert [59]. Die PregS-induzierte Reduktion der IL-6 Produktion wurde durch Ononetin nicht beeinflusst. (siehe Abbildung 3.21 a) und b)).



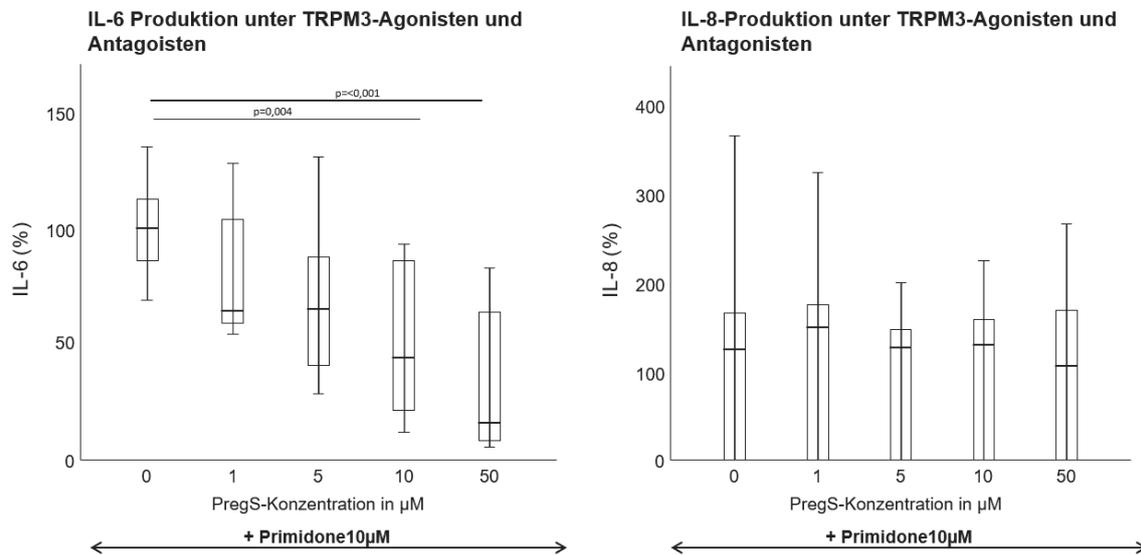
**Abbildung 3.21 a), b):** Konzentrationsabhängiger Einfluss von PregS auf die IL-6- (a) bzw. IL-8- (b) Sekretion von RASFs (n=3) unter TRPM3-Inhibition mit Ononetin. Die Stimulation erfolgte über 48 Stunden. 100% entsprechen 505 $\pm$  722 pg IL-6 pro ml bzw. 808  $\pm$  479 pg IL-8 pro ml. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der IL-6/ IL-8- Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet.

Bei zusätzlicher Gabe von TNF zu PregS und Ononetin kam es bei hohen PregS-Konzentrationen auch hier zu einer signifikanten Reduktion der IL-6-Sekretion im Vergleich zur Kontrolle. Allerdings konnte Ononetin den Effekt von PregS auf die IL-6 Produktion nicht antagonisieren. Bei IL-8 ließ sich keine Veränderung beobachten (s. Abb. 3.22 a) und b)).



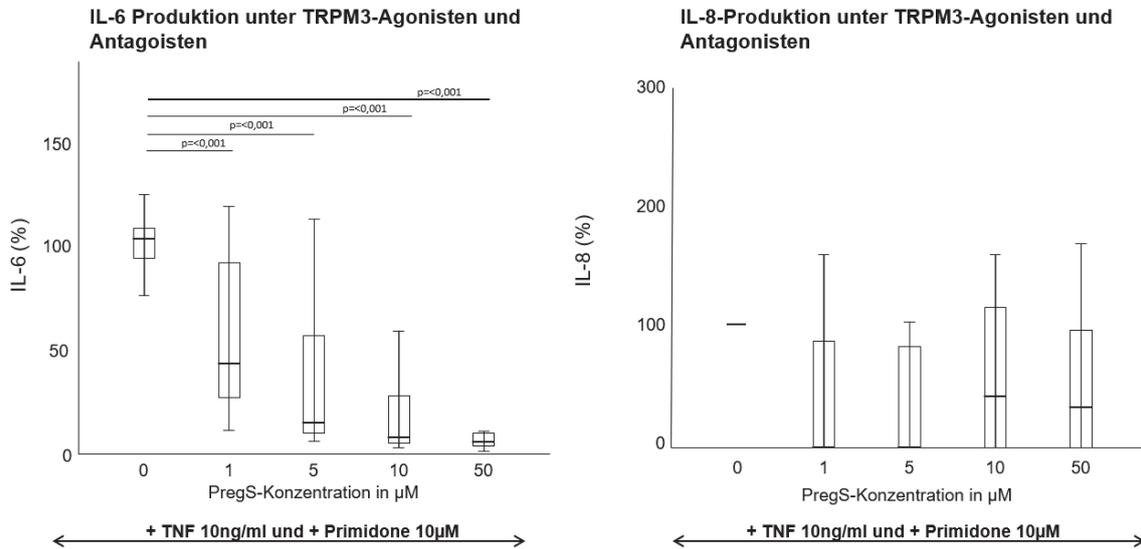
**Abbildung 3.22 a), b):** Konzentrationsabhängiger Einfluss von PregS auf die IL-6- (a) bzw. IL-8- (b) Sekretion von RASFs (n=3) unter TNF und Ononetin. Die Stimulation erfolgte über 24 Stunden. 100% entsprechen 180 +/- 181 pg IL-6 pro ml bzw. 9435 +/- 15635 pg IL-8 pro ml. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der IL-6/ IL-8- Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet.

Nachfolgend wurde anstatt Ononetin nun Primidon als TRPM3-Antagonisten zusätzlich zum PregS hinzugegeben. Primidon ist ein Antikonvulsivum und wird als hocheffizienter Blocker des TRPM3 mit einer halbmaximalen Konzentration von 0,6 – 6  $\mu\text{M}$  beschrieben. Zudem unterdrückt Primidon die Aktivierung des TRPM3 durch PregS [60]. Nach Zugabe von 10 $\mu\text{M}$  Primidon ließ sich im Vergleich zur reinen Stimulation mit PregS kein Unterschied erkennen. Eine Blockade der Aktivierung des Kanals durch PregS konnte nicht beobachtet werden. Die PregS-induzierte Reduktion der IL-6 Produktion wurde durch Primidon nicht beeinflusst. Für IL-8 verhielt es sich wie in den vorigen Untersuchungen (s. Abb. 3.23 a) und b)).



**Abbildung 3.23 a), b):** Konzentrationsabhängiger Einfluss von PregS auf die IL-6- (a) bzw. IL-8- (b) Sekretion von RASFs ( $n=3$ ) unter TRPM3-Inhibition mit Primidone. Die Stimulation erfolgte über 48 Stunden. 100% entsprechen 505 $\pm$  722 pg IL-6 pro ml bzw. 808  $\pm$  479 pg IL-8 pro ml. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der IL-6/ IL-8- Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet.

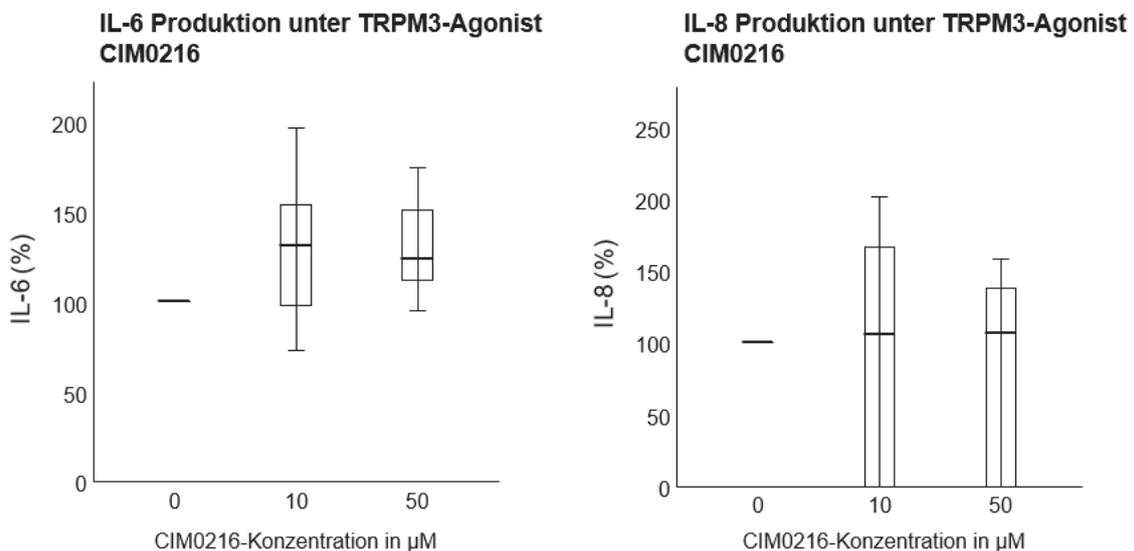
Bei zusätzlicher Gabe von TNF zu PregS und Primidon kam es bei hohen PregS-Konzentrationen auch hier zu einer signifikanten Reduktion der IL-6-Sekretion im Vergleich zur Kontrolle. Allerdings konnte Primidon den Effekt von PregS auf die IL-6 Produktion nicht antagonisieren. Bei IL-8 ließ sich keine Veränderung beobachten (s. Abb.3.24 a), b)).



**Abbildung 3.24 a), b):** Konzentrationsabhängiger Einfluss von PregS auf die IL-6- (a) bzw. IL-8- (b) Sekretion von RASFs (n=3) unter TNF und Primidon. Die Stimulation erfolgte über 24 Stunden. 100% entsprechen 180 +/- 181 pg IL-6 pro ml bzw. 9435 +/- 15635 pg IL-8 pro ml. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der IL-6/ IL-8-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet.

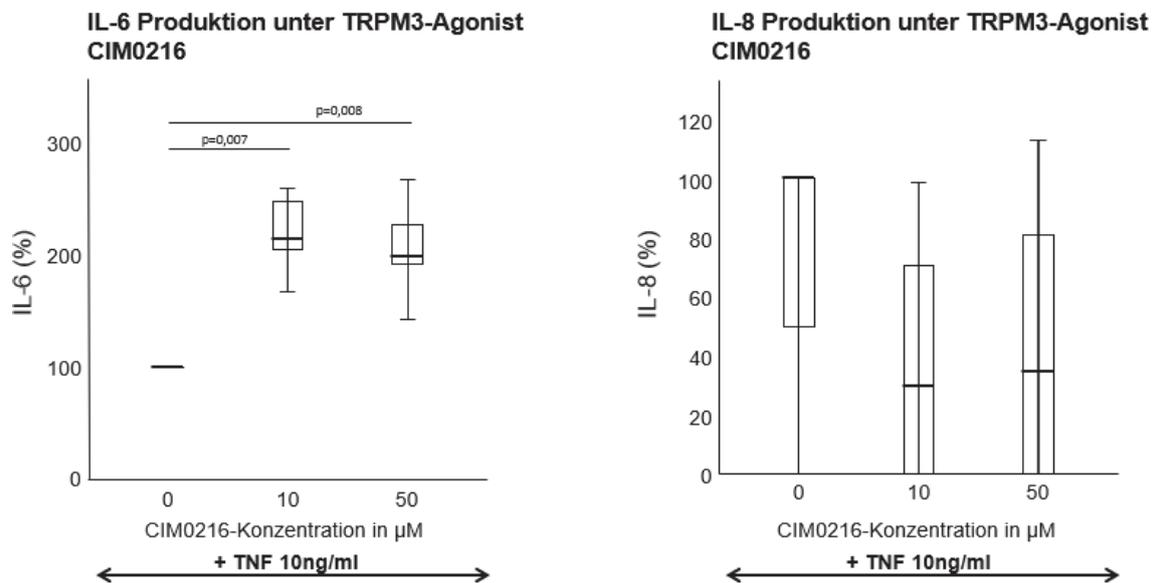
CIM0216 oder 2-(3,4-dihydroquinolin-1(2H)-yl)-N-(5-methylisoxazol-3-yl)-2-phenylacetamide, ein synthetischer TRPM3-Agonist, aktiviert TRPM3-abhängige Transkriptionsfaktoren in HEK293-Zellen, allerdings weniger stark als PregS [25]. Im Vergleich zu PregS bewirkt CIM0216 jedoch einen stärkeren dosisabhängigen Kalziumeinstrom in menschlichen Nervenzellen in niedrigeren Konzentration als PregS [50]. Zudem potenziert die Anwesenheit von CIM0216 den PregS-induzierten Kalziumeinstrom in somatosensorischen Neuronen. Weiterhin induziert CIM0216 Schmerz und führt zu einer Freisetzung von Neuropeptiden [47].

Unter Stimulation mit CIM0216 kam es zu keiner Modulation der IL-6 und IL-8-Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abbildung 3.25 a) und b)).



**Abbildung 3.25 a), b):** Konzentrationsabhängiger Einfluss von CIM0216 auf die IL-6- (a) bzw. IL-8- (b) Sekretion von RASFs (n=3). Die Stimulation erfolgte über 48 Stunden. 100% entsprechen 505 +/- 722 pg IL-6 pro ml bzw. 808 +/- 479 pg IL-8 pro ml. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der IL-6/ IL-8- Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet.

Bei zusätzlicher Stimulation mit 10ng/ml TNF- $\alpha$  ließ sich eine Verdoppelung der IL-6-Sekretion im Vergleich zur Kontrolle beobachten, welche zum Niveau von  $p = 0,008$  signifikant ist. Wie zuvor ließ sich zwischen den Stimulationen mit 10 $\mu$ M und 50 $\mu$ M CIM0216 kein signifikanter Unterschied feststellen. Die IL-8-Sekretion wurde nicht beeinflusst (siehe Abbildung 3.26 a) und b)).

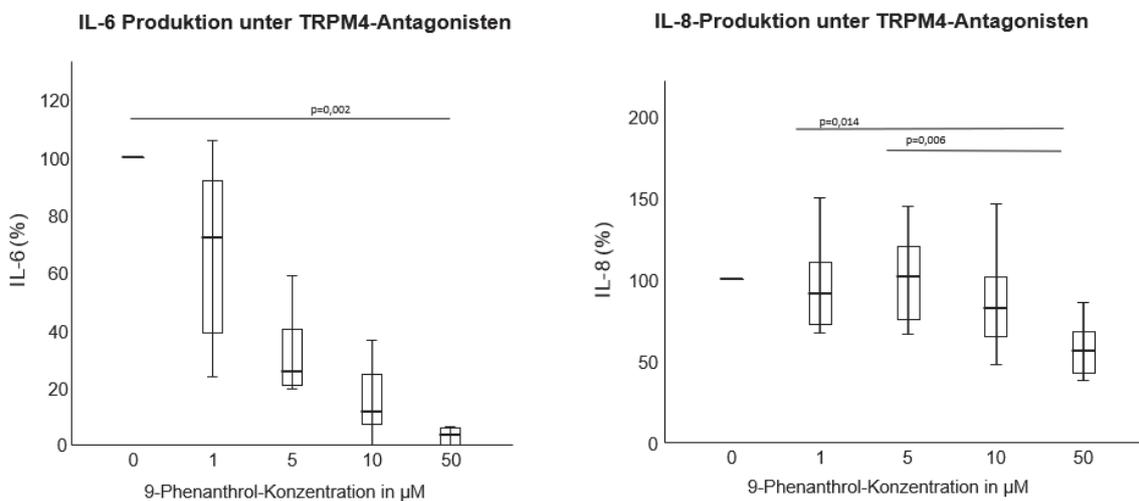


**Abbildung 3.26 a), b):** Konzentrationsabhängiger Einfluss von CIM0216 auf die IL-6- (a) bzw. IL-8- (b) Sekretion von RASFs ( $n=3$ ) unter TNF und Primidon. Die Stimulation erfolgte über 24 Stunden. 100% entsprechen 180  $\pm$  181 pg IL-6 pro ml bzw. 9435  $\pm$  15635 pg IL-8 pro ml. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der IL-6/ IL-8- Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet.

### 3.2.2 Der Einfluss von TRPM4-Agonisten und -Antagonisten auf die IL6-Produktion

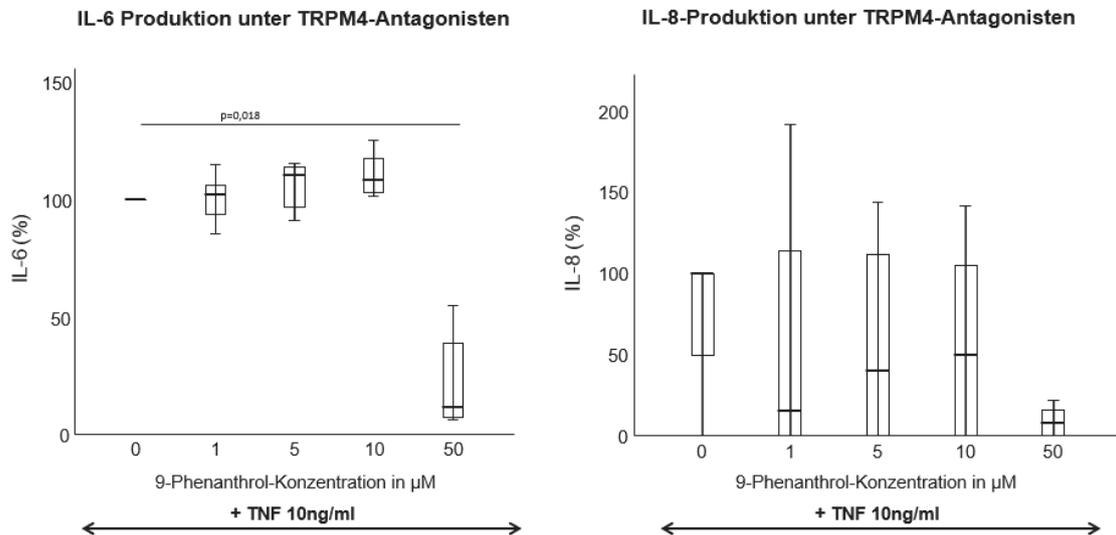
9-Phenanthrol wird in der Literatur als reversibler TRPM4-Antagonist beschrieben. Es vermindert nach Bindung an einer vermutlich intrazellulär gelegenen Stelle am Kanal den Ionenfluss. Aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften, kann 9-Phenanthrol von intrazellulär den Ionenfluss verringern. Zudem scheint es wichtig bei einigen physiologischen Vorgängen zu sein, die wir nicht im Detail beleuchten [61, S. 4].

9-Phenanthrol inhibierte dosisabhängig die Produktion von IL-6 und IL-8. (siehe Abbildung 3.27 a) und b)).



**Abbildung 3.27 a), b):** Konzentrationsabhängiger Einfluss von 9-Phenanthrol auf die IL-6- (a) bzw. IL-8- (b) Sekretion von RASFs (n=3). Die Stimulation erfolgte über 48 Stunden. 100% entsprechen 505 $\pm$  722 pg IL-6 pro ml bzw. 808  $\pm$  479 pg IL-8 pro ml. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der IL-6/ IL-8- Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet.

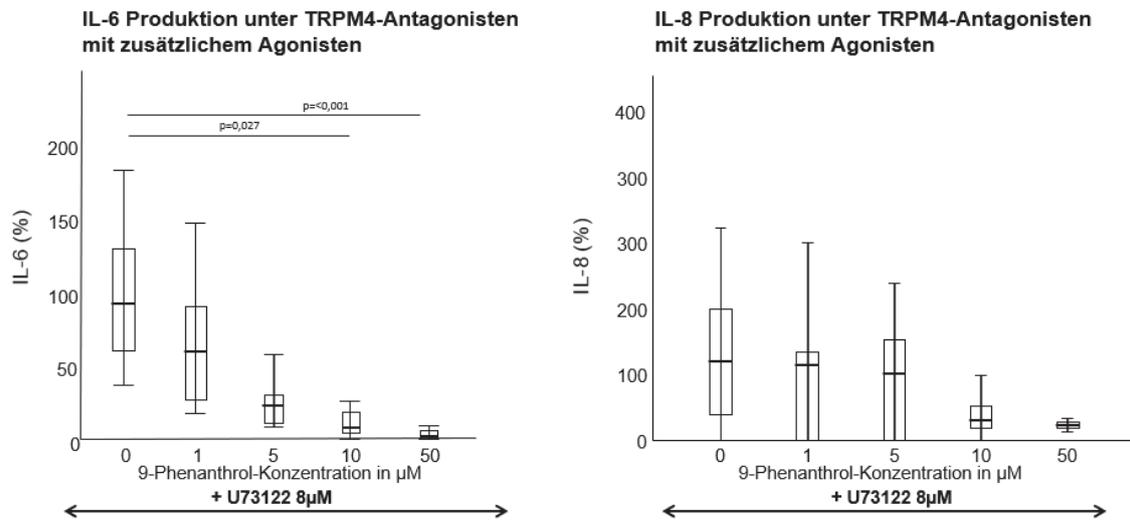
Gab man zusätzlich zur o.g. Stimulation TNF- $\alpha$  hinzu, blieb die IL-6-Konzentration bei niedrigen 9-Phenanthrol-Konzentrationen bei nahezu 100%. Erst bei 50  $\mu$ M 9-Phenanthrol sank die IL-6-Konzentration signifikant ab. Gleiches gilt für die IL-8-Sekretion (siehe Abbildung 3.28 a) und b)).



**Abbildung 3.28 a), b):** Konzentrationsabhängiger Einfluss von 9-Phenanthrol auf die IL-6- (a) bzw. IL-8- (b) Sekretion von RASFs (n=3) unter TNF. Die Stimulation erfolgte über 24 Stunden. 100% entsprechen 180 +/- 181 pg IL-6 pro ml bzw. 9435 +/- 15635 pg IL-8 pro ml. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der IL-6/ IL-8-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet.

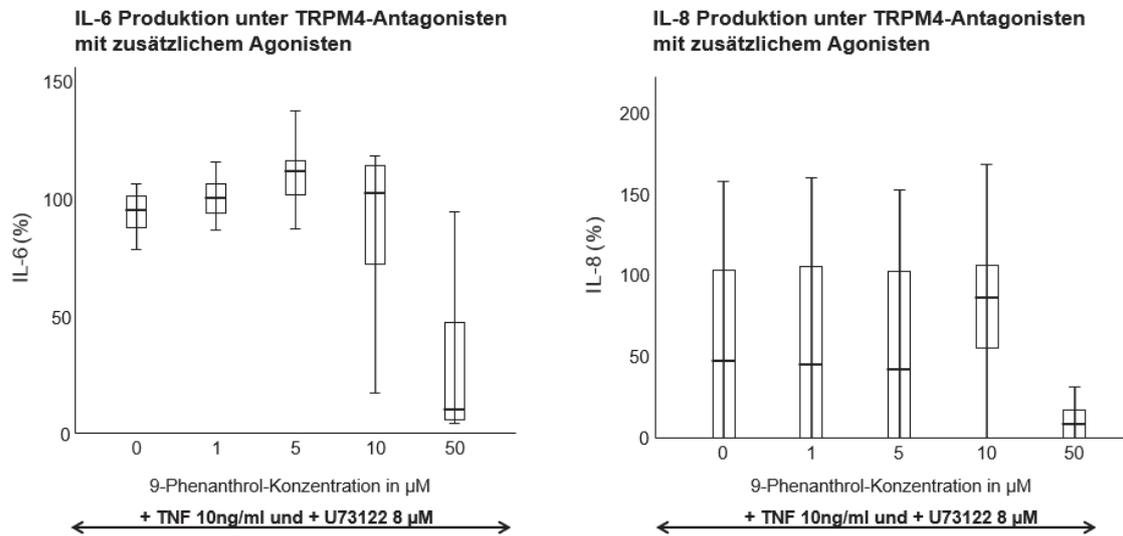
Der Phospholipase-C-Inhibitor U73122 ist als TRPM4-Agonist beschrieben worden, welcher unabhängig von PLC und  $\text{Ca}^{2+}$  endogene TRPM4-Kanäle aktivieren kann. U73122 potenziert ebenso  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige TRPM4-Ionenströme in humanen T-Zellen [62].

Bei gleichzeitiger Inkubation des TRPM4-Inhibitors 9-Phe und dem Agonisten U73122 ( $8\mu\text{M}$ ) zeigten sich signifikante Unterschiede bei der IL-6-Produktion zwischen Kontrolle und 9-Phe ( $10\mu\text{M}$  und  $50\mu\text{M}$ ). Die IL-8-Produktion wurde nicht signifikant reduziert (siehe Abbildungen 3.29 a) und b)).



**Abbildung 3.29 a), b):** Konzentrationsabhängiger Einfluss von 9-Phenanthrol auf die IL-6- (a) bzw. IL-8- (b) Sekretion von RASFs ( $n=3$ ) unter U73122. Die Stimulation erfolgte über 48 Stunden. 100% entsprechen  $505 \pm 722$  pg IL-6 pro ml bzw.  $808 \pm 479$  pg IL-8 pro ml. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der IL-6/ IL-8-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet.

Bei erneut zusätzlicher TNF- $\alpha$ -Gabe blieb die IL-6-Konzentration wie zuvor beobachtet wieder bei ca. 100% und fiel erst bei einer 50 $\mu$ M-Konzentration von 9-Phenanthrol ab, die Werte waren aber breit gestreut. Sowohl für IL6 als auch für IL8 kam es zu keiner signifikanten Reduktion (siehe Abbildung 3.30 a) und b)).

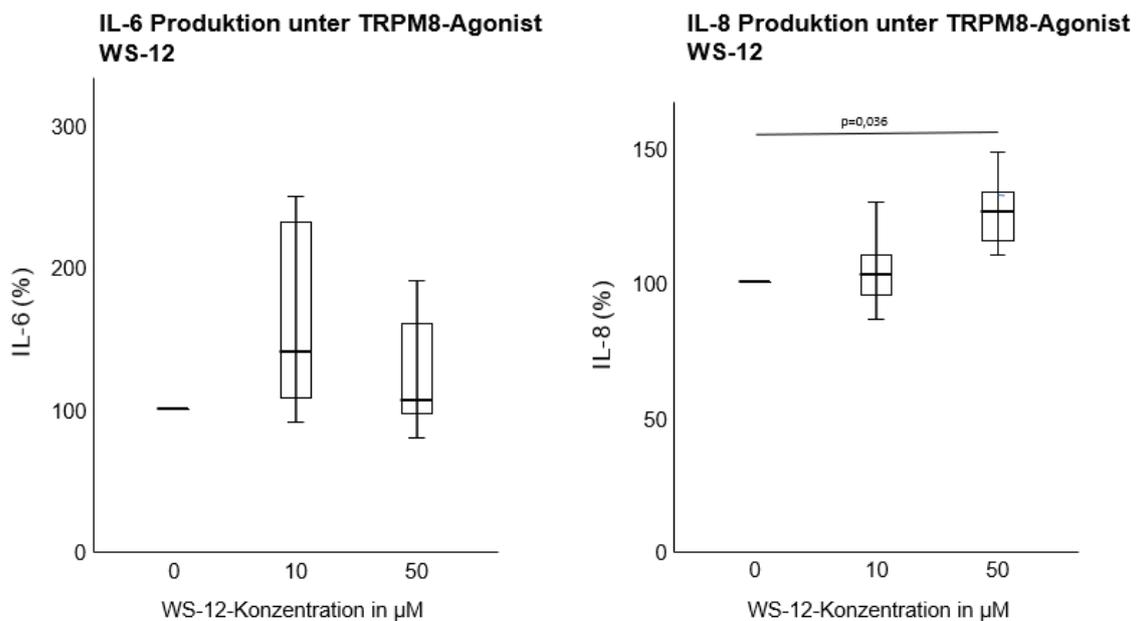


**Abbildung 3.30 a), b):** Konzentrationsabhängiger Einfluss von 9-Phenanthrol auf die IL-6- (a) bzw. IL-8- (b) Sekretion von RASFs (n=3) unter TNF und U73122. Die Stimulation erfolgte über 24 Stunden. 100% entsprechen 180 +/- 181 pg IL-6 pro ml bzw. 9435 +/- 15635 pg IL-8 pro ml. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der IL-6/ IL-8- Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet.

### 3.2.3 Der Einfluss von TRPM8-Agonisten und -Antagonisten auf die IL6-Produktion

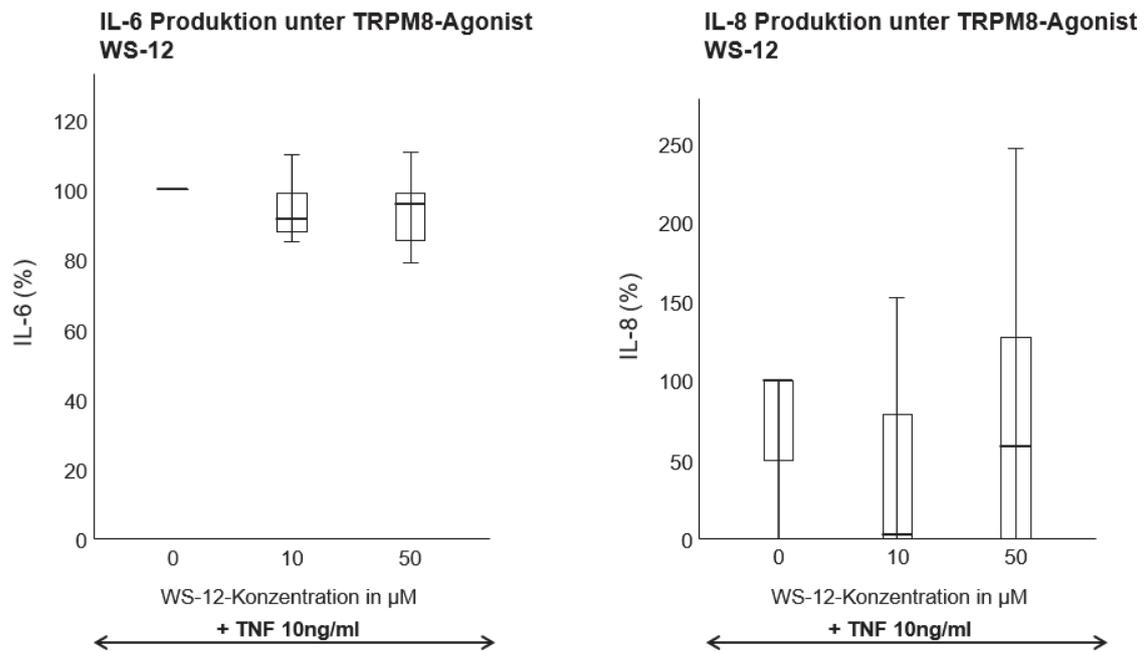
WS-12 oder (1*R*\*,2*S*\*)-*N*-(4-Methoxyphenyl)-5-methyl-2-(1-methylethyl)cyclohexanecarboxamide ist ein selektiver TRPM8-Agonist, welcher im Gegensatz zu Menthol ausschließlich TRPM8 aktiviert und dies bereits effektiver bei niedrigen Konzentrationen. Dies geschieht unabhängig von der extrazellulären Ca<sup>2+</sup> - Konzentration oder dem pH[63].

Bei Betrachtung der IL-6-Produktion unter Stimulation mit WS-12 ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen. Die IL-8-Sekretion hingegen korrelierte mit der Höhe der verabreichten Dosis WS12 in positiver Weise, d.h. die Sekretion wurde bei höheren WS-12-Konzentrationen signifikant gesteigert. Die Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis-Test berechnet (siehe Abbildung 3.31 a) und b)).



**Abbildung 3.31 a), b):** Konzentrationsabhängiger Einfluss von WS12 auf die IL-6- (a) bzw. IL-8- (b) Sekretion von RASFs (n=3). Die Stimulation erfolgte über 48 Stunden. 100% entsprechen 505 +/- 722 pg IL-6 pro ml bzw. 808 +/- 479 pg IL-8 pro ml. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der IL-6/ IL-8- Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet.

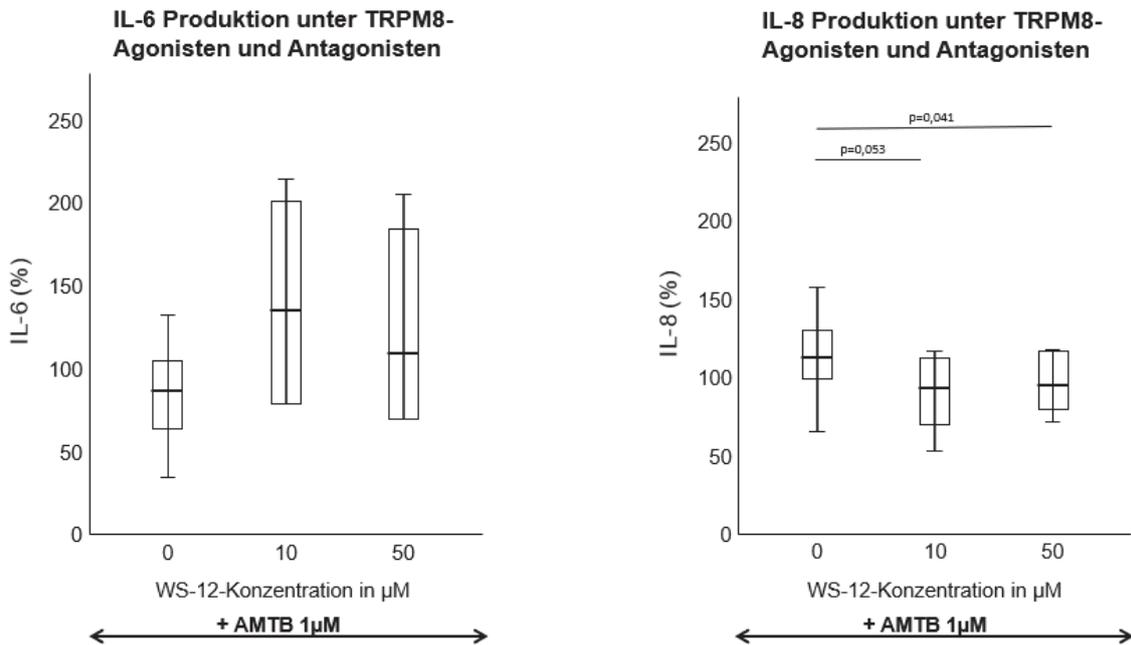
Bei zusätzlicher TNF- $\alpha$ -Gabe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Stimulation ohne TNF. Die IL-6-Konzentration blieb durchweg um 100%. Die IL-8-Sekretion war unabhängig von den verschiedenen Konzentrationen und breiter gestreut als in der Stimulation ohne TNF (siehe Abbildung 3.32 a) und b)).



**Abbildung 3.32 a), b):** Konzentrationsabhängiger Einfluss von WS-12 auf die IL-6- (a) bzw. IL-8- (b) Sekretion von RASFs ( $n=3$ ) unter TNF. Die Stimulation erfolgte über 24 Stunden. 100% entsprechen  $180 \pm 181$  pg IL-6 pro ml bzw.  $9435 \pm 15635$  pg IL-8 pro ml. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der IL-6/ IL-8- Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet.

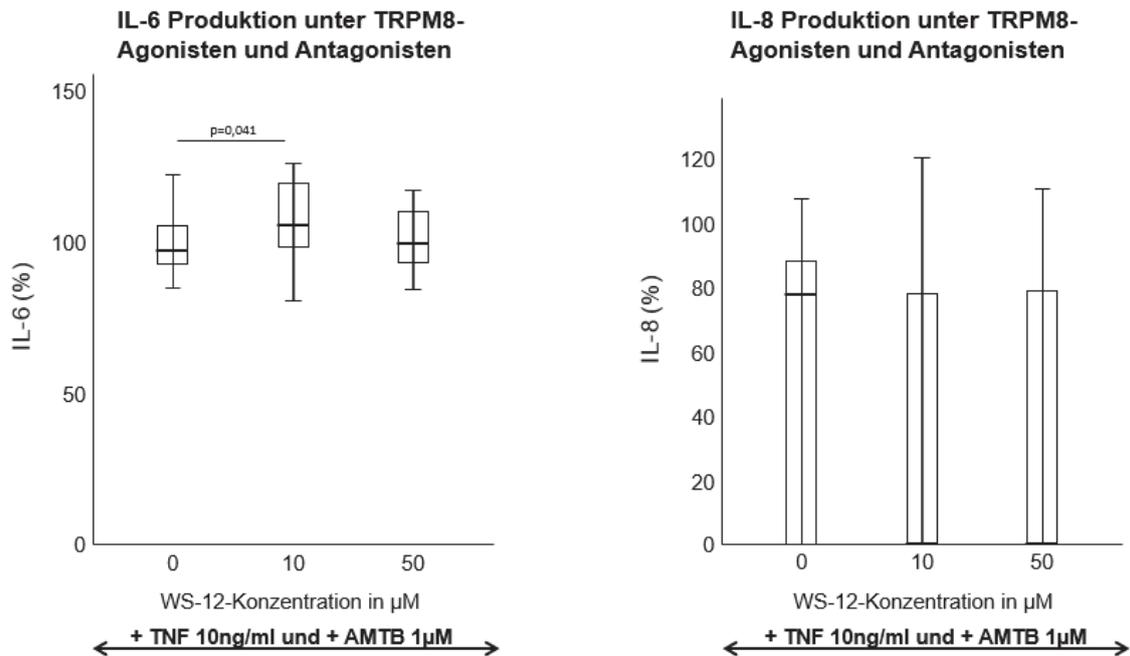
AMTB oder N-(3-aminopropyl)-2-[[3-methylphenyl) methyl]oxy}-N-(2-thienylmethyl)benzamide hydrochloride salt ist ein potenter TRPM8-Antagonist. Es erhöht die Schwelle für TRPM8-detektierten Kälteschmerz und taktile Allodynie [64].

Betrachtet man die IL-6-Produktion, so war diese bei zusätzlicher Gabe von AMTB zu WS12 nicht signifikant verschieden zur Kontrolle. Im Vergleich zur Untersuchung ohne AMTB ergibt sich kein nennenswerter Unterschied. IL-8 wurde signifikant unter AMTB-Zugabe reduziert, der Effekt des WS-12 also reversiert (siehe Abbildung 3.33 a) und b)).



**Abbildung 3.33 a), b):** Konzentrationsabhängiger Einfluss von WS-12 auf die IL-6- (a) bzw. IL-8- (b) Sekretion von RASFs (n=3) unter AMTB. Die Stimulation erfolgte über 48 Stunden. 100% entsprechen 505+/- 722 pg IL-6 pro ml bzw. 808 +/- 479 pg IL-8 pro ml. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der IL-6/ IL-8- Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet.

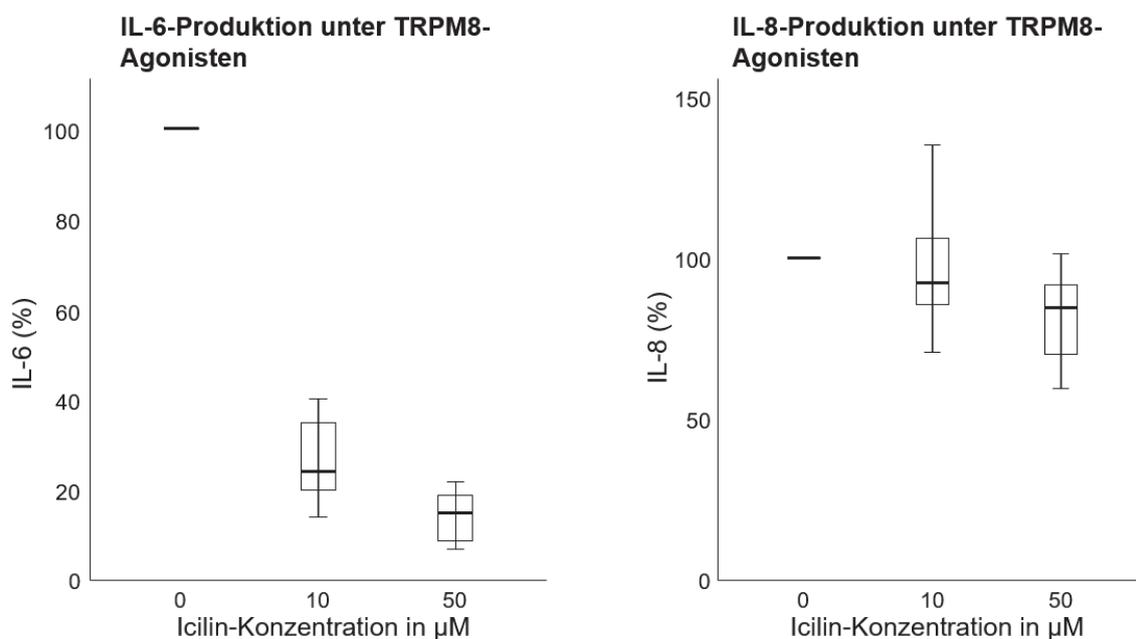
Gab man zusätzlich zur vorherigen Stimulation TNF- $\alpha$  dazu, so wurde die IL-6-Sekretion unter 10 $\mu$ M im Vergleich zur Kontrolle signifikant gesteigert. Die IL-8-Sekretion blieb über alle Stimulationen hinweg nahezu bei 100% (siehe Abbildung 3.34 a) und b)).



**Abbildung 3.34 a), b):** Konzentrationsabhängiger Einfluss von WS-12 auf die IL-6- (a) bzw. IL-8- (b) Sekretion von RASFs (n=3) unter TNF und AMTB. Die Stimulation erfolgte über 24 Stunden. 100% entsprechen 180 +/- 181 pg IL-6 pro ml bzw. 9435 +/- 15635 pg IL-8 pro ml. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der IL-6/ IL-8-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet.

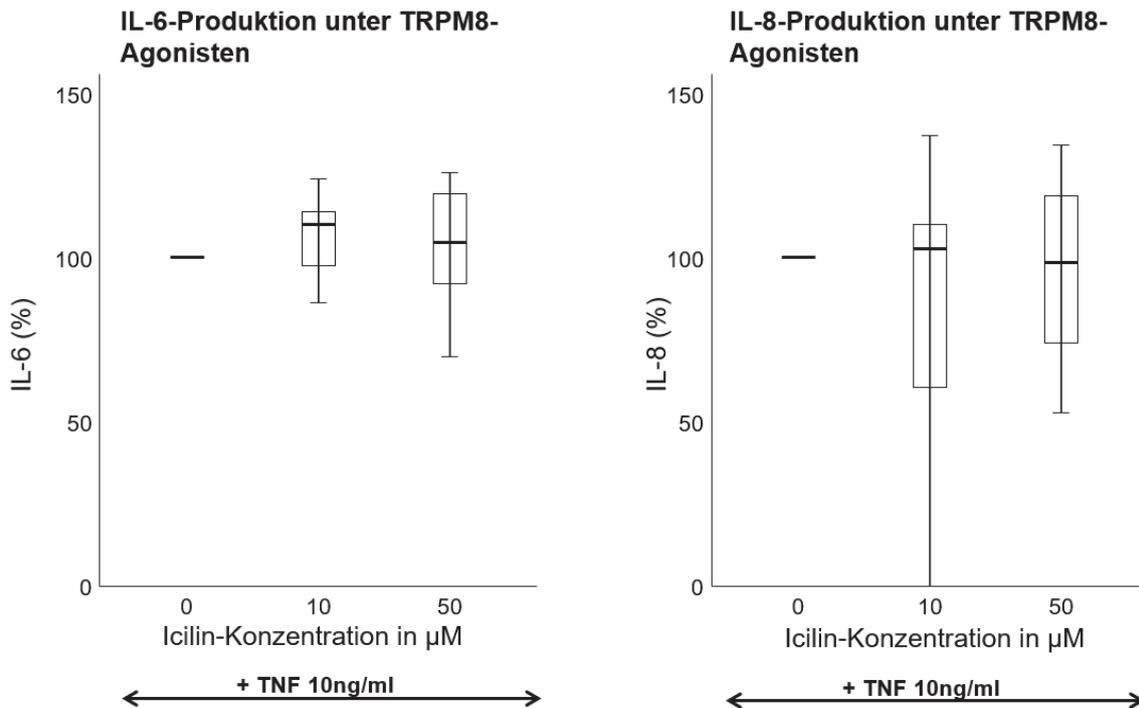
Das synthetische Icilin induziert Kältewahrnehmung via TRPM8 [65]. Als potenter und wirksamer TRPM8-Agonist und induziert im Mausmodell eine dosisabhängige Reduktion der CD4+ T-Zell-Proliferation sowie der peripheren Expansion autoreaktiver Lymphozyten [66].

Bei Stimulation mit Icilin ergab sich keine signifikante Reduzierung der IL-6-Produktion im Vergleich zur Kontrolle bei sehr breiter Streuung der Kontrolle (Streuung nicht dargestellt). Für IL-8 ergab sich ebenfalls keine signifikante Reduktion der Sekretion (siehe Abbildung 3.35 a) und b)).



**Abbildung 3.35 a), b):** Konzentrationsabhängiger Einfluss von Icilin auf die IL-6- (a) bzw. IL-8- (b) Sekretion von RASFs (n=3). Die Stimulation erfolgte über 48 Stunden. 100% entsprechen 505+/- 722 pg IL-6 pro ml bzw. 808 +/- 479 pg IL-8 pro ml. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der IL-6/ IL-8- Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet.

Bei zusätzlicher Stimulation mit TNF- $\alpha$  reduzierte sich die IL-6-Ausschüttung nicht, sondern blieb im Vergleich zur Kontrolle bei 100%. Zwischen 10 und 50 $\mu$ M Icilin ergab sich kein großer Unterschied, wobei bei 50 $\mu$ M die IL-6-Ausschüttung breiter gestreut war. Ähnliches galt für die IL-8-Ausschüttung, es zeigte sich allerdings eine breitere Streuung der Werte als bei IL-6 (siehe Abbildung 3.37).



**Abbildung 3.36 a), b):** Konzentrationsabhängiger Einfluss von Icilin auf die IL-6- (a) bzw. IL-8- (b) Sekretion von RASFs (n=3) unter TNF. Die Stimulation erfolgte über 24 Stunden. 100% entsprechen 180 +/- 181 pg IL-6 pro ml bzw. 9435 +/- 15635 pg IL-8 pro ml. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der IL-6/ IL-8- Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet.

#### 4. Diskussion

In der hier vorgestellten Studie wurden die Expression und die Regulation von TRP-Kanälen in synovialen Fibroblasten untersucht, sowie deren Stimulierbarkeit mit nachfolgender Bestimmung der IL-6- bzw. IL-8-Produktion.

##### TRPA1

Diese Arbeit zeigt, dass TRPA1 über alle Patienten hinweg deutlich stärker unter inflammatorischen Bedingungen nach TNF-Stimulation exprimiert wird als unter

Kontrollbedingungen. Dies verdeutlicht, dass TRPA1 vermutlich eine wichtige Rolle in der Inflammation spielt, wie auch Straub et. al und andere Gruppen zeigten [27], [67]. Im Besonderen spielt der Kanal eine Rolle bei Entzündungen, in denen synoviale Fibroblasten involviert sind wie z.B. der Osteoarthritis [68]; auch bei Entzündung im Rahmen der Knötchenflechte (Lichen ruber planus) wurde TRPA1 vermehrt exprimiert [69]. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Lowin et. al, welche nach 72h Stimulation mit TNF eine deutlich höhere Menge an TRPA1-Protein im Zell-basierten ELISA sowie im Westernblot nachweisen konnten [70]. In den durchgeführten Experimenten konnte kein signifikanter Einfluss von IFN auf die TRPA1 Expression nachgewiesen werden. Allerdings kann IFN die TRPA1-Synthese beeinflussen, wie die Studie von Luostarinen et. al gezeigt hat. Hier wurde in Epithelzellen der Lunge beobachtet, dass unter TNF und IFN synergistisch eine erhöhte Expression von TRPA1 nachgewiesen werden konnte [71]. In vorliegender Arbeit, ebenso wie in oben genannter wurde TRPA1 bei Abwesenheit proinflammatorischer Stimuli nur schwach exprimiert.

Im Kontrast zu den Ergebnissen dieser Arbeit fanden Hatano et. al heraus, dass unter Behandlung von Synoviozyten mit einem Hypoxiemimetikum (DFO) über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$  die Menge an mRNA des TRPA1 in einer konzentrationsabhängigen Weise signifikant erhöht war und bei Vorbehandlung der Zellen mit einem HIF-Inhibitor die Aktivierung von TRPA1 durch TNF ausblieb [56]. In dieser Arbeit wurde keine erhöhte Expression von TRPA1 auf Genebene bei Hypoxie beobachtet. Dies könnte zum einen an der unterschiedlichen Stimulationsdauer liegen; in dieser Arbeit erfolgte die Hypoxiebehandlung für 72h, bei Hatano et. al wurden die Zellen 24h mit DFO stimuliert [56]. Eine andere Ursache könnte die Zellpassage gewesen sein: in dieser Arbeit wurden Zellen aus der zweiten bis siebten Zellpassagen verwendet, in oben genannter immer aus der neunten. Die Arbeit von Neumann et. al aber zeigte, dass sich mit der Zellpassage auch die Genexpression ändert [72].

### TRPM1 und TRPM2

Die Rolle der TRP-Kanäle vom Subtyp M wurde in verschiedenen Krebsarten gezeigt, wie z.B. Prostata-, Pankreas- oder Brustkrebs, und auch im malignen Melanom [73]. TRPM1 wurde in dieser Studie auf Genebene nicht detektiert. Der

Kanal spielt nach bisherigem Wissensstand eine Rolle in immunvermittelten Erkrankungen wie dem malignen Melanom [74], ist jedoch bisher nicht in Krankheitsbildern des rheumatischen Formenkreises entdeckt worden. In Melanozyten und ON-Bipolarzellen ist der Kanal jedoch detektiert worden [41],[44] und in der Melanom-assoziierten-Retinopathie sind Antikörper gegen TRPM1 detektiert worden [75].

In dieser Studie wurde eine geringe Expression von TRPM2 in synovialen Fibroblasten detektiert. In anderen Fibroblastenpopulationen, z.B. aus der Lunge, sowie in anderen Zelltypen, z.B. alveolaren Epithelzellen, wurde TRPM2 nachgewiesen, wo er eine Rolle bei der Bleomycin-induzierten Entzündung spielt [76]. Es ist bekannt, dass TRPM2 in inflammatorischen Zellen wie Monozyten exprimiert wird [77] und als ein Sensor für reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und oxidativen Stress (OS) fungiert [78]. Dogru et. al fanden heraus, dass die Entzündungsaktivität in RA-Patienten durch MTX oder Infliximab deutlich reduziert wird [79]. Sie machen dafür eine Minderaktivierung von TRPM2 und dadurch resultierende niedrige Kalzium-Spiegel verantwortlich. Dass der Kanal in dieser Arbeit so wenig exprimiert wurde, kann einerseits an dem kleinen Patientenkollektiv oder einer geringen Entzündungsaktivität dessen liegen, andererseits könnte es auch durch die Passagezeit oder den Zeitpunkt der mRNA-Analyse bedingt sein. Da in dieser Arbeit allerdings der höchste Nachweis des Kanals unter Stimulation mit TNF liegt, liegt eine inflammatorische Beteiligung des Kanals nahe.

In verschiedenen Arten von Tumoren bewirkt die Aktivierung von TRPM2 eine Steigerung der Proliferation, wie bspw. bei Pankreas-, Brust-, Prostata-, Lungen- und Magenkrebs [73].

### TRPM3

In diesen Untersuchungen ist eine Expression von TRPM3 detektiert worden. Unter Entzündungs- und Hypoxiebedingungen wurde er herunterreguliert. Dies könnte für eine antiinflammatorische Funktion in der RA sprechen. Ähnliches beobachteten Ciurtin et. al, die eine verminderte Hyaluronproduktion- und Sekretion und damit verbundene Entzündungsaktivität in RASFs nach Aktivierung von TRPM3 durch PregS detektierten [80].

Auch im ELISA in dieser Arbeit konnten ähnliche Ergebnisse der letztgenannten Studie bestätigt werden: Bei zunehmender PregS-Konzentration kam es zu einer

signifikant verminderten Produktion von IL-6 im Sinne einer antiinflammatorischen Antwort, welche jedoch unabhängig von TRPM3 war (s.Abb. 3.19). Bei zusätzlicher TNF-Gabe fiel die prozentuale Reduktion der IL-6-Produktion nicht so stark aus, was durch den zusätzlichen proinflammatorischen Stimulus via TNF unabhängig von TRPM3 erklärt werden könnte (s.Abb. 3.20). Ähnliche Ergebnisse erzielte die Arbeitsgruppe von Naylor et. al, welche eine negative Korrelation der IL-6-Produktion mit der Aktivierung von TRPM3 über PregS in glatten Gefäßmuskelzellen beobachten konnte [81]. In dieser Studie kam es bei niedrigen PregS-Konzentrationen sogar zu einer Steigerung der IL-6-Sekretion, was den Ergebnissen der o.g. Studie widersprechen würde. Hierfür könnte die Downregulation von TRPM3 via TNF verantwortlich sein, weshalb es erst bei hohen PregS-Konzentrationen zu einer Reduktion der IL-6-Spiegel kam.

Im Gegensatz dazu fanden diverse Studien heraus, dass TRPM3-Aktivierung in Zusammenhang mit der Wahrnehmung starker Hitze, allerdings nicht mit mechanischer Irritation in Neuronen steht [48], [49],[51]. Auch die Ergebnisse von Mulier et. al, dass TRPM3 vermehrt in entzündetem Gewebe exprimiert wird [82], stehen im Kontrast zu o.g. Ergebnissen der IL-6-Sekretion. Dies könnte u.a. am untersuchten Gewebe liegen. In dieser Arbeit wurden synoviale Fibroblasten aus Patienten mit RA und OA verwendet, in den genannten Studien wurden sensorische Nervenzellen bzw. HEK-293-Zellen betrachtet. Es könnte angenommen werden, dass TRPM3 in sensorischen Nervenzellen andere Downstream-Effekte bewirkt als in synovialen Fibroblasten und glatten Muskelzellen. Weiterhin wurde bei keiner der Arbeiten die IL-6-Produktion betrachtet, sondern zentrale Effekte des TRPM3 wie der Kalziumeinstrom detektiert oder Verhaltenstests bei Mäusen durchgeführt. Auch dies könnte eine Erklärung für die gegensätzlichen Ergebnisse sein.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass der Effekt von PregS durch die TRPM3-Antagonisten Ononetin und Primidon nicht vermindert wird, was sich in ähnlichen IL-6-Spiegeln darstellt (s.Abb.3.21 u. 3.23). Der Effekt einer Blockade PregS-induzierter Kalziumströme durch Ononetin wurde von I. Straub et. al und anderen Arbeitsgruppen beschrieben, was ein gegensätzliches Verhalten wie in dieser Arbeit widerspiegelt [59], [57]. Dass der Effekt von PregS durch Ononetin nicht völlig aufgehoben wurde, könnte an der Art der verwendeten Zellen liegen; in den anderen Untersuchungen wurden durchweg HEK239-Zellen

verwendet, hier synoviale Fibroblasten. Möglicherweise wirkt PregS auch nicht über TRPM3, sondern über einen anderen Weg, weshalb eine Blockade mit Ononetin dann nicht funktioniert. Es ist bekannt, dass PregS GABA-A-Rezeptoren inhibiert. PregS blockiert die Funktion dieses Kanals, welche in Anxiolyse und zentraler Sedierung besteht [83]. Dies würde aber nicht den mangelnden Effekt des Ononetins erklären. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass PregS TRPM1 statt TRPM3 aktiviert. TRPM1 ist v.a. wichtig bei der Phototransduktion und beim malignen Melanom. Eine Aktivierung dieses Kanals wäre eine mögliche Erklärung für die unter Ononetin weiter forbestehenden hohen IL-6-Spiegel.

Auch Ononetin kann off-target wirken. I. Straub et. al. beobachteten, dass Ononetin zu einer Aktivierung von TRPA1 führen kann [59]. Wie oben beschrieben hat TRPA1 v.a. proinflammatorische Effekte und könnte somit auch eine Ursache für die weiter bestehenden hohen IL-6-Spiegel sein.

Primidon als potenter TRPM3-Antagonist verhindert eine Aktivierung des Kanals über PregS und sollte den Effekt des PregS auf die IL-6-Sekretion aufheben. Krügel et. al hatten die Aktivierung des TRPM3 über Kalziumeinstrom gemessen und dessen Blockade in dosisabhängiger Manier durch Primidon in HEK239-Zellen nachgewiesen [60]. Auch hier könnten ähnliche Gründe für die nicht vollständige Aufhebung des Effekts von PregS vorliegen wie bei der Untersuchung mit Ononetin (s. oben).

Im ELISA wurde gezeigt, dass CIM0216 unter zusätzlicher Stimulation mit TNF zu einer signifikanten Steigerung der IL-6-Sekretion in Fibroblasten führt. In der Literatur ist der Effekt von CIM0216 auf die IL-6-Produktion in RASFs bisher nicht untersucht worden. Die beobachtete Steigerung der IL-6-Sekretion unter TNF legt nahe, dass es zu einer Aktivierung von TRPM3 via CIM0216 unter Entzündungsbedingungen käme, was der bisher bekannten Funktion des Kanals entsprechen würde. Die Besonderheiten des Kanals bezüglich synovialer Fibroblasten sollten in weiteren Forschungsarbeiten nähergehend untersucht werden. Held et. al konnten in ihrer Arbeit einen konzentrationsabhängigen Effekt von CIM0216 auf die Aktivierung von TRPM3 in HEK293-Zellen zeigen [47], was den o. g. Ergebnissen ähnelt. Zudem wird der Effekt der AP-1-regulierten Gentranskription via TRPM3-Aktivierung durch CIM0216 von Rubil et. al beschrieben [25]. CIM0216 zeigte sich als starker Aktivator des Transkriptionsfaktors AP-1

und erhöhte das transkriptionelle Aktivierungspotential der Transkriptionsfaktoren c-Fos und c-Jun [25]

### TRPM4

TRPM4 Transkripte sind in dieser Arbeit in der PCR erst nach vielen Zyklen detektiert worden und im Vergleich zur Referenz-DNA niedrig exprimiert; zudem ließ sich kein Unterschied zwischen den verschiedenen inflammatorischen Stimuli oder den Patientengruppen zeigen. In der Literatur ist TRPM4 in synovialen Fibroblasten bisher nicht beschrieben worden. Simard et. al haben allerdings TRPM4 in kardialen Fibroblasten auf mRNA und Proteinebene nachgewiesen und postulieren, der Kanal könnte an der Entstehung kardialer Fibrose beteiligt sein [84].

Im ELISA wurde nach Zugabe von 9-Phenanthrol als TRPM4-Antagonist eine konzentrationsabhängige Abnahme der IL-6-Produktion beobachtet. Bianchi et.al haben im Rahmen einer experimentellen Autoimmunenzephalitis die proinflammatorische Beteiligung des TRPM4 festgestellt [85]. Dass die Blockade des Kanals zu einer verminderten IL-6-Produktion führt, passt zu diesen Ergebnissen. In den Untersuchungen von Feng et.al wurde eine wirkungsvolle Blockade der Ionenströme von TRPM4 durch Applikation von 9-Phenanthrol in kardialen Fibroblasten erzielt [86].

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass unter zusätzlicher inflammatorischer Stimulation der Fibroblasten durch TNF die IL-6-Produktion erst bei einer Konzentration von 50µM 9-Phenanthrol signifikant reduziert wird. Aufgrund der hohen Konzentration des 9-Phenanthrols könnte es sich jedoch auch um einen unspezifischen, von TRPM4-unabhängigen Effekt handeln.

Bei zusätzlicher Stimulation mit U73122 als TRPM4-Agonist und Phospholipase-C-Inhibitor zu 9-Phenanthrol ergab sich in dieser Arbeit kein gegenteiliger Effekt im Vergleich zu 9-Phenanthrol allein, auch U73122 allein hatte keine Steigerung der IL-6-Sekretion zur Folge. Als Agonist von TRPM4 würde man eine Aktivierung des Kanals erwarten [62], was sich jedoch nicht bestätigte. Möglicherweise liegt dies an einer nicht adäquaten Konzentration der Stimulanz, sodass der Effekt der Blockade nicht aufgehoben werden konnte. Eine andere Erklärung wäre, dass U73122 off-target wirkt und einen anderen Weg der Aktivierung der IL-6-Sekretion nimmt als über TRPM4. U73122 ist ebenfalls ein TRPM3 Inhibitor [62]. Wie

o.g. ist eine antiinflammatorische Funktion von TRPM3 wahrscheinlich, weshalb bei es bei Blockade des Kanals zu erhöhten IL-6-Spiegeln käme. Um die genauen Effekte auf die IL-6-Sekretion zu verifizieren, ist aber weitere Forschung nötig. Ebenso wie bei der beobachteten IL-6-Sekretion konnte in dieser Arbeit der Effekt von U73122 den Effekt von 9-Phenanthrol auf die IL-8-Sekretion nicht aufheben. In der Literatur ist der Effekt beschrieben worden, dass einige TRPs nach Behandlung mit ihrem spezifischen Agonisten eine IL-8-Sekretion in den Zellen bewirken. Unsere Ergebnisse lassen sich möglicherweise auf das äußerst geringe Vorkommen von TRPM4 in den synovialen Fibroblasten zurückführen. Ebenfalls ist es möglich, dass U73122 oder 9-Phenanthrol off-target wirken und somit an einem anderen Kanal o.ä. wirken.

### TRPM8

In dieser Arbeit wurde die Expression von TRPM8 in der PCR detektiert und unter TNF signifikant hochreguliert; unter Interferon wurde der Kanal niedriger als in der Kontrolle exprimiert. Zhu et. al konnten in ihren Untersuchungen ebenfalls TRPM8 in RASFs von Ratten mittels PCR nachweisen [88]. Der direkte Effekt einer Stimulation mit TNF auf die Expression von TRPM8 wurde bisher kaum untersucht. Es ist jedoch bekannt, dass TRPM8 unter inflammatorischen Bedingungen hochreguliert wird, wie von Ramachandran et. al in der Colitis bei Mäusen beobachtet wurde [89]. Ramachandran et. al haben zudem im Mausmodell eine Reduktion der IL-6-Sekretion unter Icilin beobachtet [89]. In dieser Arbeit wurde dieser Effekt nicht beobachtet.

Allerdings kam es unter WS-12 als selektivem Agonist zu einer signifikanten Steigerung der IL-8-Sekretion und einer leichten, nicht signifikanten Steigerung der IL-6-Sekretion. Ma et. al haben WS-12 bei Konzentrationen von 12 +/- 5µM als potenten, selektiven Aktivator von TRPM8 in Oozyten beschrieben [63].

Passend dazu wurde von Liu et. al in Bronchialzellen asthmatischer Mäuse beobachtet, dass eine TRPM8-Überexpression eine proinflammatorische Reaktion und somit höhere IL-6-mRNA-Level zur Folge hat [90]. Dass in unserer Studie die IL-6-Sekretion nicht signifikant unter WS-12 gesteigert wurde, könnte an der breiten Streuung der Werte durch das kleine Patientenkollektiv liegen. Eine andere Erklärung könnte die Zellpassage darstellen. Es könnte allerdings auch daran liegen, dass bei unseren Patienten eine basale Inflammation vorliegt und

TRPM8 von Anfang an aktiviert ist, weshalb kein Unterschied zur basalen Sekretion von IL-6 vorliegt.

In der Studie von Guillot et.al wurde mit Kältetherapie bei RA-Patienten eine signifikante Entzündungsreduktion erreicht [30], was eine Involvierung von TRPM8 nahe legt, der durch Kälte aktiviert wird. Dies würde einen gegenteiligen Effekt zu den Ergebnissen unserer Arbeit darlegen. Dies könnte daran liegen, dass WS12 möglicherweise eine Überexpression von TRPM8 bewirkt und es infolgedessen, wie bei Liu et.al gezeigt, zu einer inflammatorischen Kaskade kommt. Bei nicht überschießender Aktivierung des TRPM8 könnte also trotzdem eine antiinflammatorische Reaktion stattfinden. Da TRPM8 aber auch den Sympathikus aktiviert [27], könnten die antiinflammatorischen Effekte auch ausschließlich über den Sympathikus ausgelöst werden.

Weiterhin wurde TRPM8 auch mit AMTB als Antagonist stimuliert. Hierunter ergaben sich allerdings keine nennenswerten Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle. Hierfür könnten ähnliche Gründe vorliegen, wie für die mangelhafte Steigerung der IL-6-Spiegel unter WS12.

Ein anderer Grund für die Diskrepanzen könnte eine Sympathikusaktivierung durch TRPM8 und daraus folgende antiinflammatorische Effekte, ausgelöst durch den Sympathikus, sein.

### TRPV1

In dieser Untersuchung ist TRPV1 in der PCR detektiert worden und zeigt keine Unterschiede in der Expression hinsichtlich der verschiedenen Stimulationen oder Patienten. Die Präsenz von TRPV1 in Synoviozyten wurde in vorigen Arbeiten [91] u.a. von Kochukov et. al bestätigt [55]. In der Studie von Kameda et. al wurde beobachtet, dass die Genexpression von TRPV1 in humanen Bandscheibenzellen unter TNF-Einfluss abnimmt [92]. Im Gegensatz dazu fanden Wang et. al heraus, dass TNF einen positiven Einfluss auf die Funktion nicht aber Expression von TRPV1 in dorsalen Nervenwurzelganglien in Vincristin-induzierten neuropathischen Ratten bewirkt [93]. In synovialen Fibroblasten bewirkt TNF eine Sensibilisierung von TRPV1 gegenüber proinflammatorischen Stimuli. In selbiger Studie wurde zudem gezeigt, dass TNF- $\alpha$  zwar nicht die Spiegel von TRPV1 beeinflusst, aber eine Translokation des Kanals vom endoplasmatischen Retikulum zur Zellmembran bewirkt [94]. Diese scheinbar gegenteiligen Ergebnisse könnten

einerseits mit dem Zelltyp und der jeweiligen Funktion des Kanals in diesen Zellen zusammenhängen. In meiner Arbeit könnten die nicht vorhandenen erwarteten Unterschiede hinsichtlich der Expression darauf beruhen, dass TRPV1 sowohl bei RA als auch bei OA eine wichtige Rolle hinsichtlich der Entzündung und Krankheitsentwicklung spielt [95]. Es könnte auch am relativ kleinen Patientenkollektiv liegen, dass kein Effekt beobachtet wurde. Laut Terenzi et. al ist TRPV1 in RASFs niedriger exprimiert als in gesunden SFs; allerdings wird der Kanal unter inflammatorischen Konditionen dort stärker hochreguliert und bewirkt eine Freisetzung von Interleukinen [96]. In der Arbeit von Hsieh et. al wurde beobachtet, dass TRPV1 im Mausmodell der RA unter Entzündung hochreguliert wird und TRPV1-KO-Mäuse weniger schwere Verläufe bezüglich Gelenkschwellung und Hyperalgesie aufwiesen [85]. Ähnliche Ergebnisse erzielten Hoffmeister et. al im Mausmodell für Gicht: bei einem akuten Schub ist die Immunreaktivität von TRPV1 stark ausgeprägt, bei Blockade des TRPV1-Rezeptors kam es zu signifikant weniger Gelenkschwellung und Schmerzen [98].

## TRPV2

In dieser Arbeit wurde TRPV2 detektiert, welcher von den Fibroblasten nur niedrig exprimiert wurde. Es zeigt sich die Tendenz, dass der Kanal unter Interferon hochreguliert wird und RASFs unter Hypoxie + Interferon mehr TRPV2 exprimieren als OASFs. Der Kanal kommt in vielen Immunzelltypen vor, u.a. Lymphozyten [99], Mastzellen [100], und Langerhanszellen und vermittelt dort wichtige Funktionen wie Phagozytose [101],[102]. Son et. al haben TRPV2 im peridontalen Ligament entdeckt und erkannt, dass eine Stimulation mit dem Agonisten 2-APB in einer signifikant höheren Expression von IL-6 und IL-8 resultiert [103]. Im Gegensatz dazu wurde in der Studie von Laragione et. al gezeigt, dass TRPV2 in hochinvasiven synovialen Fibroblasten im Mausmodell sehr hoch exprimiert wird, der Agonist LER13 in einer TRPV2-abhängigen Art die Invasivität von synovialen Fibroblasten vermindert und postuliert, dass TRPV2 bei der Arthritis eine antiinflammatorische Reaktion vermittelt [38]. Dass in meiner Arbeit der Kanal unter Interferon und bei RASFs stärker exprimiert wird, würde zu den Ergebnissen der o.g. Arbeit passen, dass der Kanal bei Inflammation stärker exprimiert wird.

### TRPV3

In der PCR ist die Expression von TRPV3 detektiert worden. Dies ist in der Studie von Kochukov et. al bestätigt worden, in der TRPV3 mittels PCR in Synoviozyten detektiert wurde [55]. Auch in dermalen Fibroblasten und Keratinozyten wird TRPV3 exprimiert und wird in hypertrophen Verbrennungsnarben mit Juckreiz hochreguliert [104], [105]. Darüber hinaus spielt der Kanal in kardialen Fibroblasten eine zentrale Rolle bei der Entstehung kardialer Fibrose und bewirkt über verschiedene Signalwege die Überproduktion von Kollagenen und eine starke Proliferation der Fibroblasten [106]. In unserer Studie wurde keine signifikante Veränderung der Expression von TRPV3 unter inflammatorischen Stimuli beobachtet.

Die Studie von Toledo Mauriño et. al wies in Kolonbiopsien eine signifikant höhere Expression von TRPV3 in der Kontrollgruppe im Vergleich zur aktiven Kolitis sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene nach [107]. Im Gegensatz dazu wurde in der Arbeit von Gazerani et. al festgestellt, dass im Mausmodell der Arthritis das TRPV3-Protein aus spinalen Mikrogliazellen im Westernblott nach Zugabe von Freund'schem Adjuvans signifikant erhöht nachweisbar ist [108]. Diese gegenteiligen Ergebnisse bezüglich der Regulation des Kanals unter inflammatorischen Bedingungen können verschiedene Ursachen haben: Die Stimuli bewirken möglicherweise unterschiedliche Effekte bezüglich Sensibilisierung oder Desensibilisierung von TRPV3. Die Konzentration der Stimuli ist ein weiterer Faktor, der berücksichtigt werden muss. Möglicherweise wiesen die Patienten mit Kolitis zu geringe inflammatorische Serumspiegel auf, weshalb es noch nicht zu einer Aktivierung von TRPV3 kam. Dies könnte auch in unserer Studie der Fall gewesen sein. Die Schwelle für eine Sensibilisierung von TRPV3 auf Inflammation könnte deutlich höher liegen als die Spiegel, die in den Untersuchungen verwendet wurden.

### TRPV4

TRPV4 wurde in dieser Arbeit auf Genebene detektiert. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Expression unter verschiedenen Stimuli. Dieser Kanal wurde von Kochukov et.al in Synoviozyten als stark exprimiert nachgewiesen [55]. In einer anderen Studie konnte dieselbe Arbeitsgruppe zeigen, dass unter TNF- $\alpha$  signifikant mehr mRNA des TRPV4 vorhanden ist; ebenso

erhöht waren die Zellgröße und die Kalziumeinströme nach TNF-Behandlung [94]. In einer anderen Arbeitsgruppe wurde im Rattenmodell einer Kollagen-induzierten Arthritis TRPV4 als zentrales Element für die Regulation des hypotonen Kalziumeinstroms und der darauf folgenden Zellproliferation identifiziert [109]. Auch in einem Mausmodell der pulmonalen Hypertonie ist TRPV4 zentrales Element bei der Aktivierung der adventitialen Fibroblasten und Remodeling mit Versteifung und Fibrose [110]. Im Gegensatz dazu wurde in der Studie von Clark et.al beobachtet, dass bei TRPV4-KO eine massive Krankheitsprogression in der Arthrose mit starken Gelenkschädigungen auftritt und postuliert, dass TRPV4 möglicherweise zu einer normalen Gelenkfunktion und Chondroprotektion beiträgt [111]. Diese gegensätzlichen Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Funktion des TRPV4 noch nicht zur Gänze erforscht sind und weitere Studien nötig sind, um zu verifizieren, ob der Kanal in der Arthritis nun eine protektive oder pro-inflammatorische Rolle spielt.

## 5. Ausblick

Mit dieser Arbeit wollten wir einen Überblick über die Bedeutung verschiedener TRP-Kanäle in der rheumatoiden Arthritis gewinnen. Um signifikante Ergebnisse für getroffene Tendenzen zu erzielen und genauere Analysen durchführen zu können, bedarf es weiterer Untersuchungen mit breiterem und größerem Patientenkollektiv. Insbesondere sollten weitere Effekte von TRP-Agonisten betrachtet werden u.a. für TRPA1 und M3, sowie M8. Zudem sollte der Effekt und die Verträglichkeit der Agonisten zunächst *in vivo* bspw. in entsprechenden Mausmodellen getestet werden. Für die Zukunft ist es denkbar, dass TRP-Agonisten und Antagonisten hinsichtlich der analgetischen oder antiinflammatorischen Therapie in der RA eine tragende Rolle spielen werden. Beispielsweise ist es denkbar, dass Analoga der hier verwendeten Substanzen als TRPM3-Agonisten mit in das Therapieregime bei RA aufgenommen werden und sich so möglicherweise zu einer Alternative der Kortison-Stoßtherapie entwickeln. Für TRPA1 sollte nach einem potenten und selektiven Antagonisten geforscht werden, der dessen Aktivierung und proinflammatorische Effekte verhindert und so für Patienten mit RA ein Fortschreiten der Erkrankung verhindert und die Zerstörung der Gelenke durch die Inflammation stoppt.

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] O. Gouin *u. a.*, „TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation: pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization“, *Protein Cell*, Bd. 8, Nr. 9, Art. Nr. 9, Sep. 2017, doi: 10.1007/s13238-017-0395-5.
- [2] P. R. Souza und L. V. Norling, „Implications for eicosapentaenoic acid- and docosahexaenoic acid-derived resolvins as therapeutics for arthritis“, Mai 2015.
- [3] R. Puchner, *Rheumatologie aus der Praxis*. Springer-Verlag GmbH Deutschland 2017, 2017.
- [4] „Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie e.V.“, *DGRh e.V.*, 11. April 2018. <https://dgrh.de/Start/DGRh/Presse/Daten-und-Fakten/Rheuma-in-Zahlen.html> (zugegriffen 11. April 2018).
- [5] B. Bartok und G. S. Firestein, „Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis“, *Immunol Rev*, Bd. 233, Nr. 1, Art. Nr. 1, Jan. 2010, doi: 10.1111/j.0105-2896.2009.00859.x.
- [6] A. Foster, *Aktuelle Aspekte der Rheumatoiden Arthritis*. Uni-Med Verlag, 2010.
- [7] D. Palamar, G. Er, R. Terlemez, I. Ustun, G. Can, und M. Saridogan, „Disease activity, handgrip strengths, and hand dexterity in patients with rheumatoid arthritis“, *Clin Rheumatol*, Bd. 36, Nr. 10, Art. Nr. 10, Okt. 2017, doi: 10.1007/s10067-017-3756-9.
- [8] J. E. Oliver und A. J. Silman, „Risk factors for the development of rheumatoid arthritis“, *Scandinavian Journal of Rheumatology*, Bd. 35, Nr. 3, Art. Nr. 3, Jan. 2006, doi: 10.1080/03009740600718080.
- [9] G. Weissmann, „Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis“, *JCR: Journal of Clinical Rheumatology*, Bd. 10, Nr. 3, S. S26, Juni 2004, doi: 10.1097/01.rhu.0000130687.75646.44.
- [10] C. V. Tehlirian und J. M. Bathon, „Rheumatoid Arthritis“, in *Primer on the Rheumatic Diseases*, Springer, New York, NY, 2010, S. 114–141. doi: 10.1007/978-0-387-68566-3\_6.
- [11] A. G. Pratt, J. D. Isaacs, und D. L. Matthey, „Current concepts in the pathogenesis of early rheumatoid arthritis“, *Best Pract Res Clin Rheumatol*, Bd. 23, Nr. 1, Art. Nr. 1, Feb. 2009, doi: 10.1016/j.berh.2008.08.002.
- [12] H. Radner, T. Neogi, J. S. Smolen, und D. Aletaha, „Performance of the 2010 ACR/EULAR classification criteria for rheumatoid arthritis: a systematic literature review“, *Annals of the Rheumatic Diseases*, Bd. 73, Nr. 1, Art. Nr. 1, Jan. 2014, doi: 10.1136/annrheumdis-2013-203284.
- [13] Deutsche Rheumaliga Bundesverband e.V., „Rheumatoide Arthritis“. 2017.
- [14] „060-004I\_S2e\_Therapie\_rheumatoide\_Arthritits\_krankheitsmod\_Med\_2018-10\_01.pdf“. Zugegriffen: 28. Juni 2020. [Online]. Verfügbar unter: [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/060-004I\\_S2e\\_Therapie\\_rheumatoide\\_Arthritits\\_krankheitsmod\\_Med\\_2018-10\\_01.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/060-004I_S2e_Therapie_rheumatoide_Arthritits_krankheitsmod_Med_2018-10_01.pdf)
- [15] D. Wang, Y. Li, und Y. L. and G. Shi, „The Use of Biologic Therapies in the Treatment of Rheumatoid Arthritis“, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 31. Mai 2014. <http://www.eurekaselect.com/124498/article> (zugegriffen 19. April 2018).
- [16] K. Murphy und C. Weaver, „Das Versagen der Immunantwort“, in *Janeway Immunologie*, K. Murphy und C. Weaver, Hrsg., Berlin, Heidelberg: Springer, 2018, S. 695–781. doi: 10.1007/978-3-662-56004-4\_13.
- [17] É. Biró *u. a.*, „Activated complement components and complement activator molecules on the surface of cell-derived microparticles in patients with rheumatoid arthritis and healthy individuals“, *Ann Rheum Dis*, Bd. 66, Nr. 8, S. 1085–1092, Aug. 2007, doi: 10.1136/ard.2006.061309.
- [18] S. Alivernini *u. a.*, „Distinct synovial tissue macrophage subsets regulate inflammation and remission in rheumatoid arthritis“, *Nat Med*, Bd. 26, Nr. 8, S. 1295–1306, Aug. 2020, doi: 10.1038/s41591-020-0939-8.

- [19] K. Aho, T. Palosuo, V. Raunio, P. Puska, A. Aromaa, und J. T. Salonen, „When does rheumatoid disease start?“, *Arthritis Rheum*, Bd. 28, Nr. 5, S. 485–489, Mai 1985, doi: 10.1002/art.1780280503.
- [20] S. Rantapää-Dahlqvist u. a., „Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis“, *Arthritis Rheum*, Bd. 48, Nr. 10, S. 2741–2749, Okt. 2003, doi: 10.1002/art.11223.
- [21] Speckmann et al., *Physiologie*, 5. Elsevier.
- [22] M. Gees, B. Colsoul, und B. Nilius, „The Role of Transient Receptor Potential Cation Channels in Ca<sup>2+</sup> Signaling“, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, Bd. 2, Nr. 10, Art. Nr. 10, Okt. 2010, doi: 10.1101/cshperspect.a003962.
- [23] I. Fliniaux, E. Germain, V. Farfariello, und N. Prevarskaya, „TRPs and Ca<sup>2+</sup> in cell death and survival“, *Cell Calcium*, Bd. 69, S. 4–18, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.ceca.2017.07.002.
- [24] Parenti A, De Logu F, Geppetti P, und Benemei S, „What is the evidence for the role of TRP channels in inflammatory and immune cells?“, *British Journal of Pharmacology*, Bd. 173, Nr. 6, Art. Nr. 6, März 2016, doi: 10.1111/bph.13392.
- [25] S. Rubil und G. Thiel, „Activation of gene transcription via CIM0216, a synthetic ligand of transient receptor potential melastatin-3 (TRPM3) channels“, *Channels (Austin)*, Bd. 11, Nr. 1, S. 79–83, Juni 2016, doi: 10.1080/19336950.2016.1207026.
- [26] H. Xu, M. Delling, J. C. Jun, und D. E. Clapham, „Oregon, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels“, *Nat Neurosci*, Bd. 9, Nr. 5, Art. Nr. 5, Mai 2006, doi: 10.1038/nn1692.
- [27] R. H. Straub, „TRPV1, TRPA1, and TRPM8 channels in inflammation, energy redirection, and water retention: role in chronic inflammatory diseases with an evolutionary perspective“, *J Mol Med*, Bd. 92, Nr. 9, Art. Nr. 9, Sep. 2014, doi: 10.1007/s00109-014-1175-9.
- [28] S. R. Eid u. a., „HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity“, *Mol Pain*, Bd. 4, S. 48, Okt. 2008, doi: 10.1186/1744-8069-4-48.
- [29] R. G. Pertwee, „The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview“, *International Journal of Obesity*, Bd. 30, Nr. S1, Art. Nr. S1, März 2006, doi: 10.1038/sj.ijo.0803272.
- [30] X. Guillot u. a., „Cryotherapy in inflammatory rheumatic diseases: a systematic review“, *Expert Review of Clinical Immunology*, Bd. 10, Nr. 2, S. 281–294, Feb. 2014, doi: 10.1586/1744666X.2014.870036.
- [31] D. L. Bellinger und D. Lorton, „Autonomic regulation of cellular immune function“, *Auton Neurosci*, Bd. 182, S. 15–41, Mai 2014, doi: 10.1016/j.autneu.2014.01.006.
- [32] K. Uchida u. a., „Involvement of thermosensitive TRP channels in energy metabolism“, *J Physiol Sci*, Bd. 67, Nr. 5, Art. Nr. 5, Sep. 2017, doi: 10.1007/s12576-017-0552-x.
- [33] Y. Sawada, H. Hosokawa, A. Hori, K. Matsumura, und S. Kobayashi, „Cold sensitivity of recombinant TRPA1 channels“, *Brain Res. 2007*, Juli 2007, doi: 10.1016/j.brainres.2007.05.047.
- [34] W. M. Knowlton, A. Fisher, D. M. Bautista, und D. D. McKemy, „TRPM8, but not TRPA1, is required for neural and behavioral responses to acute noxious cold temperatures and cold-mimetics in vivo“, *Pain*, Bd. 150, Nr. 2, S. 340–350, Aug. 2010, doi: 10.1016/j.pain.2010.05.021.
- [35] J. Chen u. a., „Species differences and molecular determinant of TRPA1 cold sensitivity“, *Nat Commun*, Bd. 4, S. 2501, Sep. 2013, doi: 10.1038/ncomms3501.
- [36] T. Lowin, M. Apitz, S. Anders, und R. H. Straub, „Anti-inflammatory effects of N-acyl ethanolamines in rheumatoid arthritis synovial cells are mediated by TRPV1 and TRPA1 in a COX-2 dependent manner“, *Arthritis Research & Therapy*, Bd. 17, S. 321, Nov. 2015, doi: 10.1186/s13075-015-0845-5.

- [37] K. Shibasaki, „Physiological significance of TRPV2 as a mechanosensor, thermosensor and lipid sensor“, *J Physiol Sci*, Bd. 66, Nr. 5, Art. Nr. 5, Sep. 2016, doi: 10.1007/s12576-016-0434-7.
- [38] T. Laragione u. a., „THE CATION CHANNEL TRPV2 IS A NEW SUPPRESSOR OF ARTHRITIS SEVERITY, JOINT DAMAGE AND SYNOVIAL FIBROBLAST INVASION“, *Clin Immunol*, Bd. 158, Nr. 2, S. 183–192, Juni 2015, doi: 10.1016/j.clim.2015.04.001.
- [39] F. Richter, G. Segond von Banchet, und H.-G. Schaible, „Transient Receptor Potential vanilloid 4 ion channel in C-fibres is involved in mechanonociception of the normal and inflamed joint“, *Sci Rep*, Bd. 9, Juli 2019, doi: 10.1038/s41598-019-47342-x.
- [40] I. Audo u. a., „TRPM1 Is Mutated in Patients with Autosomal-Recessive Complete Congenital Stationary Night Blindness“, *Am J Hum Genet*, Bd. 85, Nr. 5, S. 720–729, Nov. 2009, doi: 10.1016/j.ajhg.2009.10.013.
- [41] M. A. Agosto, I. A. Anastassov, und T. G. Wensel, „Differential epitope masking reveals synapse-specific complexes of TRPM1“, *Vis Neurosci*, Bd. 35, S. E001, Jan. 2018, doi: 10.1017/S0952523817000360.
- [42] C. W. Morgans u. a., „TRPM1 is required for the depolarizing light response in retinal ON-bipolar cells“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Bd. 106, Nr. 45, S. 19174–19178, Nov. 2009, doi: 10.1073/pnas.0908711106.
- [43] M. Su u. a., „Role of the p53-TRPM1/miR-211-MMP9 axis in UVB-induced human melanocyte migration and its potential in repigmentation“, *Int J Mol Med*, Bd. 45, Nr. 4, S. 1017–1026, Apr. 2020, doi: 10.3892/ijmm.2020.4478.
- [44] R. M. Duvoisin, G. Ren, T. L. Haley, M. H. Taylor, und C. W. Morgans, „TRPM1 Autoantibodies in Melanoma Patients Without Self-Reported Visual Symptoms“, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, Bd. 60, Nr. 6, S. 2330–2335, Mai 2019, doi: 10.1167/iovs.19-26775.
- [45] M. E. Olah u. a., „Ca<sup>2+</sup>-dependent induction of TRPM2 currents in hippocampal neurons“, *J Physiol*, Bd. 587, Nr. Pt 5, S. 965–979, März 2009, doi: 10.1113/jphysiol.2008.162289.
- [46] T. F. J. Wagner u. a., „Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic  $\beta$  cells“, *Nat Cell Biol*, Bd. 10, Nr. 12, S. 1421–1430, Dez. 2008, doi: 10.1038/ncb1801.
- [47] K. Held u. a., „Activation of TRPM3 by a potent synthetic ligand reveals a role in peptide release“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Bd. 112, Nr. 11, S. E1363–E1372, März 2015, doi: 10.1073/pnas.1419845112.
- [48] J. Vriens u. a., „TRPM3 Is a Nociceptor Channel Involved in the Detection of Noxious Heat“, *Neuron*, Bd. 70, Nr. 3, S. 482–494, Mai 2011, doi: 10.1016/j.neuron.2011.02.051.
- [49] I. Vandewauw u. a., „A TRP channel trio mediates acute noxious heat sensing“, *Nature*, Bd. 555, Nr. 7698, S. 662–666, März 2018, doi: 10.1038/nature26137.
- [50] L. Vangeel u. a., „Functional expression and pharmacological modulation of TRPM3 in human sensory neurons“, *Br J Pharmacol*, Bd. 177, Nr. 12, S. 2683–2695, Juni 2020, doi: 10.1111/bph.14994.
- [51] S. Su, Y. Yudin, N. Kim, Y.-X. Tao, und T. Rohacs, „TRPM3 Channels Play Roles in Heat Hypersensitivity and Spontaneous Pain after Nerve Injury“, *J. Neurosci.*, Bd. 41, Nr. 11, S. 2457–2474, März 2021, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1551-20.2020.
- [52] B. Nilius u. a., „The Selectivity Filter of the Cation Channel TRPM4\*“, *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 280, Nr. 24, S. 22899–22906, Juni 2005, doi: 10.1074/jbc.M501686200.
- [53] B. Nilius u. a., „Regulation of the Ca<sup>2+</sup> Sensitivity of the Nonselective Cation Channel TRPM4\*“, *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 280, Nr. 8, S. 6423–6433, Feb. 2005, doi: 10.1074/jbc.M411089200.
- [54] J. M. Simard, S. K. Woo, und V. Gerzanich, „Transient receptor potential melastatin 4 and cell death“, *Pflugers Arch - Eur J Physiol*, Bd. 464, Nr. 6, Art. Nr. 6, Dez. 2012, doi: 10.1007/s00424-012-1166-z.

- [55] M. Y. Kochukov, T. A. McNearney, Y. Fu, und K. N. Westlund, „Thermosensitive TRP ion channels mediate cytosolic calcium response in human synoviocytes“, *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, Bd. 291, Nr. 3, S. C424–C432, Sep. 2006, doi: 10.1152/ajpcell.00553.2005.
- [56] N. Hatano u. a., „Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) Switches on Transient Receptor Potential Ankyrin Repeat 1 (TRPA1) Gene Expression via a Hypoxia Response Element-like Motif to Modulate Cytokine Release“, *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 287, Nr. 38, S. 31962–31972, Sep. 2012, doi: 10.1074/jbc.M112.361139.
- [57] H. Cabanas, K. Muraki, C. Balinas, N. Eaton-Fitch, D. Staines, und S. Marshall-Gradisnik, „Validation of impaired Transient Receptor Potential Melastatin 3 ion channel activity in natural killer cells from Chronic Fatigue Syndrome/ Myalgic Encephalomyelitis patients“, *Mol Med*, Bd. 25, Apr. 2019, doi: 10.1186/s10020-019-0083-4.
- [58] A. Lesch, S. Rubil, und G. Thiel, „Activation and inhibition of transient receptor potential TRPM3-induced gene transcription“, *Br J Pharmacol*, Bd. 171, Nr. 10, S. 2645–2658, Mai 2014, doi: 10.1111/bph.12524.
- [59] I. Straub u. a., „Citrus fruit and fabacea secondary metabolites potently and selectively block TRPM3“, *Br J Pharmacol*, Bd. 168, Nr. 8, S. 1835–1850, Apr. 2013, doi: 10.1111/bph.12076.
- [60] U. Krügel, I. Straub, H. Beckmann, und M. Schaefer, „Primidone inhibits TRPM3 and attenuates thermal nociception in vivo“, *Pain*, Bd. 158, Nr. 5, S. 856–867, Mai 2017, doi: 10.1097/j.pain.0000000000000846.
- [61] R. Guinamard, T. Hof, und C. A. Del Negro, „The TRPM4 channel inhibitor 9-phenanthrol“, *Br J Pharmacol*, Bd. 171, Nr. 7, S. 1600–1613, Apr. 2014, doi: 10.1111/bph.12582.
- [62] M. G. Leitner u. a., „Direct modulation of TRPM4 and TRPM3 channels by the phospholipase C inhibitor U73122“, *Br J Pharmacol*, Bd. 173, Nr. 16, S. 2555–2569, Aug. 2016, doi: 10.1111/bph.13538.
- [63] S. Ma, G. G. V.-E. Ak, D. Jf, und H. H., „Menthol derivative WS-12 selectively activates transient receptor potential melastatin-8 (TRPM8) ion channels“, *Pak J Pharm Sci*, Bd. 21, Nr. 4, S. 370–378, Okt. 2008.
- [64] K. Sałat und B. Filipek, „Antinociceptive activity of transient receptor potential channel TRPV1, TRPA1, and TRPM8 antagonists in neurogenic and neuropathic pain models in mice“, *J Zhejiang Univ Sci B*, Bd. 16, Nr. 3, S. 167–178, März 2015, doi: 10.1631/jzus.B1400189.
- [65] J. L. Brignell, V. Chapman, und D. A. Kendall, „Comparison of icilin- and cold-evoked responses of spinal neurones, and their modulation of mechanical activity, in a model of neuropathic pain“, *Brain Research*, Bd. 1215, S. 87–96, Juni 2008, doi: 10.1016/j.brainres.2008.03.072.
- [66] B. W. Ewanchuk, E. R. O. Allan, A. L. Warren, R. Ramachandran, und R. M. Yates, „The cooling compound icilin attenuates autoimmune neuroinflammation through modulation of the T-cell response“, *The FASEB Journal*, Bd. 32, Nr. 3, S. 1236–1249, 2018, doi: 10.1096/fj.201700552R.
- [67] T. Lowin, R. Tingting, J. Zurmahr, T. Classen, M. Schneider, und G. Pongratz, „Cannabidiol (CBD): a killer for inflammatory rheumatoid arthritis synovial fibroblasts“, *Cell Death & Disease*, Bd. 11, Nr. 8, Aug. 2020, doi: 10.1038/s41419-020-02892-1.
- [68] S. Yin u. a., „Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) Mediates Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Inflammatory Responses in Primary Human Osteoarthritic Fibroblast-Like Synoviocytes“, *Inflammation*, Bd. 41, Nr. 2, S. 700–709, März 2018, doi: 10.1007/s10753-017-0724-0.
- [69] J. Kun u. a., „TRPA1 receptor is upregulated in human oral lichen planus“, *Oral Diseases*, Bd. 23, Nr. 2, S. 189–198, 2017, doi: 10.1111/odi.12593.

- [70] T. Lowin, J. Bleck, M. Schneider, und G. Pongratz, „Selective killing of proinflammatory synovial fibroblasts via activation of transient receptor potential ankyrin (TRPA1)“, *Biochemical Pharmacology*, Bd. 154, S. 293–302, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.bcp.2018.05.015.
- [71] S. Luostarinen, M. Hämäläinen, N. Hatano, K. Muraki, und E. Moilanen, „The inflammatory regulation of TRPA1 expression in human A549 lung epithelial cells“, *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, Bd. 70, S. 102059, Okt. 2021, doi: 10.1016/j.pupt.2021.102059.
- [72] E. Neumann u. a., „Cell culture and passaging alters gene expression pattern and proliferation rate in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts“, *Arthritis Res Ther*, Bd. 12, Nr. 3, S. R83, 2010, doi: 10.1186/ar3010.
- [73] A. Hantute-Ghesquier, A. Haustrate, N. Prevarskaya, und V. Lehen'kyi, „TRPM Family Channels in Cancer“, *Pharmaceuticals (Basel)*, Bd. 11, Nr. 2, S. 58, Juni 2018, doi: 10.3390/ph11020058.
- [74] L. M. Duncan u. a., „Melastatin Expression and Prognosis in Cutaneous Malignant Melanoma“, *JCO*, Bd. 19, Nr. 2, S. 568–576, Jan. 2001, doi: 10.1200/JCO.2001.19.2.568.
- [75] J. Varin u. a., „Identification and characterization of novel TRPM1 autoantibodies from serum of patients with melanoma-associated retinopathy“, *PLoS One*, Bd. 15, Nr. 4, S. e0231750, Apr. 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0231750.
- [76] R. Yonezawa u. a., „TRPM2 channels in alveolar epithelial cells mediate bleomycin-induced lung inflammation“, *Free Radical Biology and Medicine*, Bd. 90, S. 101–113, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.11.021.
- [77] P. Massullo, A. Sumoza-Toledo, H. Bhagat, und S. Partida-Sánchez, „TRPM channels, calcium and redox sensors during innate immune responses“, *Semin Cell Dev Biol*, Bd. 17, Nr. 6, S. 654–666, Dez. 2006, doi: 10.1016/j.semcdb.2006.11.006.
- [78] S. Yamamoto u. a., „TRPM2-mediated Ca<sup>2+</sup> influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration“, *Nat Med*, Bd. 14, Nr. 7, S. 738–747, Juli 2008, doi: 10.1038/nm1758.
- [79] A. Dogru, M. Nazıroglu, und B. Cig, „Modulator role of infliximab and methotrexate through the transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) channel in neutrophils of patients with rheumatoid arthritis: a pilot study“, *Arch Med Sci*, Bd. 15, Nr. 6, S. 1415–1424, Okt. 2019, doi: 10.5114/aoms.2018.79485.
- [80] C. Ciurtin u. a., „TRPM3 channel stimulated by pregnenolone sulphate in synovial fibroblasts and negatively coupled to hyaluronan“, *BMC Musculoskelet Disord*, Bd. 11, S. 111, Juni 2010, doi: 10.1186/1471-2474-11-111.
- [81] J. Naylor u. a., „Pregnenolone Sulphate- and Cholesterol-Regulated TRPM3 Channels Coupled to Vascular Smooth Muscle Secretion and Contraction“, *Circ Res*, Bd. 106, Nr. 9, S. 1507–1515, Mai 2010, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.219329.
- [82] M. Mulier u. a., „Upregulation of TRPM3 in nociceptors innervating inflamed tissue“, *eLife*, Bd. 9, S. e61103, doi: 10.7554/eLife.61103.
- [83] C. Harteneck, „Pregnenolone Sulfate: From Steroid Metabolite to TRP Channel Ligand“, *Molecules*, Bd. 18, Nr. 10, Art. Nr. 10, Okt. 2013, doi: 10.3390/molecules181012012.
- [84] C. Simard u. a., „TRPM4 non-selective cation channel in human atrial fibroblast growth“, *Pflugers Arch - Eur J Physiol*, Bd. 472, Nr. 12, S. 1719–1732, Dez. 2020, doi: 10.1007/s00424-020-02476-0.
- [85] B. Bianchi, P. A. Smith, und H. Abriel, „The ion channel TRPM4 in murine experimental autoimmune encephalomyelitis and in a model of glutamate-induced neuronal degeneration“, *Mol Brain*, Bd. 11, Juli 2018, doi: 10.1186/s13041-018-0385-4.
- [86] J. Feng u. a., „Upregulation of transient receptor potential melastatin 4 (TRPM4) in ventricular fibroblasts from heart failure patients“, *Pflugers Arch - Eur J Physiol*, Bd. 473, Nr. 3, S. 521–531, März 2021, doi: 10.1007/s00424-021-02525-2.

- [87] T. Wang und C. He, „TNF- $\alpha$  and IL-6: The Link between Immune and Bone System“, *Curr Drug Targets*, Bd. 21, Nr. 3, S. 213–227, 2020, doi: 10.2174/1389450120666190821161259.
- [88] S. Zhu u. a., „Involvement of transient receptor potential melastatin-8 (TRPM8) in menthol-induced calcium entry, reactive oxygen species production and cell death in rheumatoid arthritis rat synovial fibroblasts“, *European Journal of Pharmacology*, Bd. 725, S. 1–9, Feb. 2014, doi: 10.1016/j.ejphar.2014.01.001.
- [89] R. Ramachandran u. a., „TRPM8 activation attenuates inflammatory responses in mouse models of colitis“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Bd. 110, Nr. 18, S. 7476–7481, Apr. 2013, doi: 10.1073/pnas.1217431110.
- [90] H. Liu, L. Hua, Q. Liu, J. Pan, und Y. Bao, „Cold Stimuli Facilitate Inflammatory Responses Through Transient Receptor Potential Melastatin 8 (TRPM8) in Primary Airway Epithelial Cells of Asthmatic Mice“, *Inflammation*, Bd. 41, Nr. 4, S. 1266–1275, Aug. 2018, doi: 10.1007/s10753-018-0774-y.
- [91] A. Engler u. a., „Expression of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) in synovial fibroblasts from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis“, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Bd. 359, Nr. 4, S. 884–888, Aug. 2007, doi: 10.1016/j.bbrc.2007.05.178.
- [92] T. Kameda u. a., „Expression and Activity of TRPA1 and TRPV1 in the Intervertebral Disc: Association with Inflammation and Matrix Remodeling“, *Int J Mol Sci*, Bd. 20, Nr. 7, S. 1767, Apr. 2019, doi: 10.3390/ijms20071767.
- [93] Y. Wang u. a., „Sensitization of TRPV1 receptors by TNF- $\alpha$  orchestrates the development of vincristine-induced pain“, *Oncol Lett*, Bd. 15, Nr. 4, S. 5013–5019, Apr. 2018, doi: 10.3892/ol.2018.7986.
- [94] M. Y. Kochukov u. a., „Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) enhances functional thermal and chemical responses of TRP cation channels in human synoviocytes“, *Mol Pain*, Bd. 5, S. 49, Aug. 2009, doi: 10.1186/1744-8069-5-49.
- [95] T. Galindo, J. Reyna, und A. Weyer, „Evidence for Transient Receptor Potential (TRP) Channel Contribution to Arthritis Pain and Pathogenesis“, *Pharmaceuticals (Basel)*, Bd. 11, Nr. 4, Okt. 2018, doi: 10.3390/ph11040105.
- [96] R. Terenzi u. a., „Neuropeptides activate TRPV1 in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes and foster IL-6 and IL-8 production“, *Ann Rheum Dis*, Bd. 72, Nr. 6, S. 1107–1109, Juni 2013, doi: 10.1136/annrheumdis-2012-202846.
- [97] W.-S. Hsieh, C.-C. Kung, S.-L. Huang, S.-C. Lin, und W.-H. Sun, „TDAG8, TRPV1, and ASIC3 involved in establishing hyperalgesic priming in experimental rheumatoid arthritis“, *Sci Rep*, Bd. 7, Aug. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-09200-6.
- [98] C. Hoffmeister u. a., „Participation of the TRPV1 receptor in the development of acute gout attacks“, *Rheumatology*, Bd. 53, Nr. 2, S. 240–249, Feb. 2014, doi: 10.1093/rheumatology/ket352.
- [99] C. I. Saunders, D. A. Kunde, A. Crawford, und D. P. Geraghty, „Expression of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and 2 (TRPV2) in human peripheral blood“, *Molecular Immunology*, Bd. 44, Nr. 6, S. 1429–1435, Feb. 2007, doi: 10.1016/j.molimm.2006.04.027.
- [100] D. Zhang u. a., „Mast-Cell Degranulation Induced by Physical Stimuli Involves the Activation of Transient-Receptor-Potential Channel TRPV2“, *Physiol Res*, S. 113–124, Feb. 2012, doi: 10.33549/physiolres.932053.
- [101] A. Perálvarez-Marín, P. Doñate-Macian, und R. Gaudet, „What do we know about the Transient Receptor Potential Vanilloid 2 (TRPV2) ion channel?“, *FEBS J*, Bd. 280, Nr. 21, S. 5471–5487, Nov. 2013, doi: 10.1111/febs.12302.
- [102] T. M. Link, U. Park, B. M. Vonakis, D. M. Raben, M. J. Soloski, und M. J. Caterina, „TRPV2 plays a pivotal role in macrophage particle binding and phagocytosis“, *Nat Immunol*, Bd. 11, Nr. 3, S. 232–239, März 2010, doi: 10.1038/ni.1842.

- [103] G.-Y. Son, J. H. Hong, I. Chang, und D. M. Shin, „Induction of IL-6 and IL-8 by activation of thermosensitive TRP channels in human PDL cells“, *Archives of Oral Biology*, Bd. 60, Nr. 4, S. 526–532, Apr. 2015, doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.12.014.
- [104] H. O. Kim u. a., „Increased activity of TRPV3 in keratinocytes in hypertrophic burn scars with postburn pruritus“, *Wound Repair Regen*, Bd. 24, Nr. 5, S. 841–850, Sep. 2016, doi: 10.1111/wrr.12469.
- [105] J. Um, S. Y. Kang, H. J. Kim, B. Y. Chung, C. W. Park, und H. O. Kim, „Transient receptor potential vanilloid-3 (TRPV3) channel induces dermal fibrosis via the TRPV3/TSLP/Smad2/3 pathways in dermal fibroblasts“, *Journal of Dermatological Science*, Bd. 97, Nr. 2, S. 117–124, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.jdermsci.2019.12.011.
- [106] Y. Liu u. a., „Transient receptor potential vanilloid-3 (TRPV3) activation plays a central role in cardiac fibrosis induced by pressure overload in rats via TGF- $\beta$ 1 pathway“, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, Bd. 391, Nr. 2, S. 131–143, Feb. 2018, doi: 10.1007/s00210-017-1443-7.
- [107] J. J. Toledo Mauriño u. a., „TRPV Subfamily (TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPV5, and TRPV6) Gene and Protein Expression in Patients with Ulcerative Colitis“, *J Immunol Res*, Bd. 2020, S. 2906845, Mai 2020, doi: 10.1155/2020/2906845.
- [108] S. Gazerani, J. Zaringhalam, H. Manaheji, und S. Golabi, „The Role of C Fibers in Spinal Microglia Induction and Possible Relation with TRPV3 Expression During Chronic Inflammatory Arthritis in Rats“, *Basic Clin Neurosci*, Bd. 7, Nr. 3, S. 231–240, Juli 2016, doi: 10.15412/J.BCN.03070308.
- [109] F. Hu u. a., „Hypotonic stress promotes ATP release, reactive oxygen species production and cell proliferation via TRPV4 activation in rheumatoid arthritis rat synovial fibroblasts“, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Bd. 486, Nr. 1, S. 108–115, Apr. 2017, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.03.008.
- [110] L.-A. Cussac u. a., „TRPV4 channel mediates adventitial fibroblast activation and adventitial remodeling in pulmonary hypertension“, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, Bd. 318, Nr. 1, S. L135–L146, Jan. 2020, doi: 10.1152/ajplung.00084.2019.
- [111] A. L. Clark, B. J. Votta, S. Kumar, W. Liedtke, und F. Guilak, „Chondroprotective role of the osmotically-sensitive ion channel TRPV4: Age- and sex-dependent progression of osteoarthritis in Trpv4 deficient mice“, *Arthritis Rheum*, Bd. 62, Nr. 10, S. 2973–2983, Okt. 2010, doi: 10.1002/art.27624.