



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Einfluss von ernährungsrelevanten TRP-Modulatoren auf
die IL-8 Genexpression und Sekretion in Keratinozyten“

verfasst von / submitted by

Jana Schmidt BSc.

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Master of Science (MSc)

Wien, 2023 / Vienna, 2023

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreut von / Supervisor:

Univ.-Prof. Dipl.Ern.Wiss. Dr. Barbara Lieder,
Privatdoz.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung.....	1
2 Wissenschaftlicher Hintergrund	4
2.1 Die menschliche Haut - Funktionen und Aufbau	4
2.2 Expression der TRP-Kanäle im menschlichen Organismus.....	5
2.3 Strukturelle Eigenschaften von TRPV1 und TRPA1	7
2.4 Modulatoren von TRPV1/A1	9
2.4.1 Agonisten und Aktivierungsmechanismen von TRPV1.....	10
2.4.2 Agonisten und Aktivierungsmechanismen von TRPA1.....	16
2.4.3 Antagonisten von TRPV1 und TRPA1	19
2.5 TNF- α und IL-8 vermittelte Entzündungsreaktionen.....	21
2.6 Die Rolle von TRPV1 und TRPA1 bei Entzündungen	26
2.7 Humane Keratinozyten als Zellmodell	31
3 Zielsetzung und Hypothesen.....	34
4 Material.....	36
4.1 Verbrauchsmaterialien.....	36
4.2 Gegenstände und Geräte	37
4.3 Chemikalien.....	37
4.3.1 Zusammensetzung der Lösungen	39
4.4 Programme	39
5 Methoden	40
5.1 Zellkultur	40
5.1.1 Passagieren und Ausstreuen der Zellen	40
5.2 MTT-Test zur Bestimmung der Zellvitalität	42
5.2.1 Bestimmung der Konzentration von TNF- α	43
5.2.2 Bestimmung der Konzentration der Agonisten und Antagonisten von TRPV1 bzw. TRPA1.....	43
5.3 Experimente zur Optimierung der Konzentration von TNF- α	45
5.4 Experimente zur Optimierung der Behandlungsdauer von TNF- α	45
5.5 Vorbehandlung mit TRP-Agonisten bzw. Antagonisten und anschließender Behandlung mit TNF- α	45
5.6 Isolierung der RNA	47
5.6.1 Bestimmung der RNA-Konzentration	48
5.7 Synthese der cDNA	48
5.8 Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (RT-qPCR)	50
5.9 ELISA.....	51
5.10 Statistische Auswertung	54
5.10.1 MTT-Test zur Bestimmung der Zellvitalität	54
5.10.2 RT-qPCR	55
5.10.3 ELISA.....	56
6 Ergebnisse.....	57
6.1.1 MTT-Test zur Bestimmung der Zellvitalität	57
6.1.1.1 MTT-Test zur Bestimmung der Konzentration von TNF- α	58
6.1.1.2 MTT-Test zur Bestimmung der Konzentration von TRP-Agonisten bzw. Antagonisten.....	59
6.2 Optimierung und Bestimmung der TNF- α Behandlung.....	63

6.3	Optimierung und Bestimmung der TNF- α Behandlungsdauer	67
6.3.1	Einfluss der TRPV1 Agonisten bzw. Antagonisten auf die TNF- α induzierte Entzündungsreaktion in HaCaT-Zellen	70
6.3.2	Einfluss des TRPA1 Agonisten bzw. Antagonisten auf die TNF- α induzierte Entzündungsreaktion in HaCaT-Zellen	76
7	Diskussion.....	83
7.1	Einfluss von TNF- α auf die Zellvitalität	83
7.2	Einfluss von TNF- α auf die Genexpression und Freisetzung von <i>CXCL8/IL-8</i> ..	85
7.3	Einfluss von TNF- α auf die Genexpression von <i>TRPV1</i> und <i>TRPA1</i>	87
7.4	Effekte der Modulation von TRPV1 und TRPA1 auf TNF- α induzierte Entzündungsreaktionen	89
7.4.1	Einfluss der TRPV1 Modulation auf Entzündungsreaktionen	89
7.4.1.1	Desensibilisierung von TRPV1	93
7.4.2	Einfluss der TRPA1 Modulation auf Entzündungsreaktionen	97
8	Schlussfolgerung und Ausblick	105
9	Zusammenfassung	110
10	Summary.....	111
11	Literaturverzeichnis	112
12	Anhang	i

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Tetramere Struktur (I) und lineares Diagramm (II) von TRPV1 und TRPA1.....	7
Abbildung 2: „S5-P-S6 Porenregion“ von TRPV1 im geschlossenen Zustand.	8
Abbildung 3: Strukturformel von Capsaicin	10
Abbildung 4: Mechanismus der TRPV1 Aktivierung durch Bindung von Capsaicin.	12
Abbildung 5: Schematische Darstellung der TRPV1-Kanalmembrantopologie mit den verschiedenen Interaktionspunkten.	13
Abbildung 6: Vorgeschlagene Beteiligung der PIP ₂ Verarmung an der Sensibilisierung (a) und Desensibilisierung (b) von TRPV1.....	15
Abbildung 7: Strukturformel von Zimtaldehyd.....	17
Abbildung 8: Vorgeschlagener Mechanismus der elektrophilen Modulation von TRPA1.....	18
Abbildung 9: Strukturformel von Capsazepin.....	20
Abbildung 10: Strukturformel von AP-18.....	21
Abbildung 11: TNF- α Signalweg und IL-8 Signalweg.....	23
Abbildung 12: Struktur der Epidermis mit den verschiedenen Schichten an Keratinozyten.	31
Abbildung 13: MTT zur Bestimmung der Zellaktivität in HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit TNF- α in unterschiedlichen Konzentrationen.	58
Abbildung 14: MTT zur Bestimmung der Zellaktivität in HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit Agonisten (I) und Antagonisten (II) von TRPV1 (a) bzw. TRPA1 (b).....	59
Abbildung 15: MTT zur Bestimmung der Zellaktivität in HaCaT-Zellen nach 24-stündiger kombinierter Behandlung mit Capsaicin und Capsazepin (a) bzw. Zimtaldehyd und AP-18 (b).....	61
Abbildung 16: Bestimmung der relativen Änderung der Genexpression mittels RT-qPCR (a) und Freisetzung mittels ELISA (b) von <i>CXCL8</i> /IL-8 in HaCaT-Zellen nach 48-stündiger Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von TNF- α	63
Abbildung 17: Relative Änderung der Genexpression von <i>TRPV1</i> (a) bzw. <i>TRPA1</i> (b) in HaCaT-Zellen nach 48-stündiger Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von TNF- α	65
Abbildung 18: Bestimmung der relativen Änderung der Genexpression mittels RT-qPCR (a) und Freisetzung mittels ELISA (b) von <i>CXCL8</i> /IL-8 in HaCaT-Zellen nach Behandlung mit 20 ng/mL TNF- α für unterschiedliche Dauer.	67
Abbildung 19: Relative Änderung der Genexpression von <i>TRPV1</i> (a) und <i>TRPA1</i> (b) in HaCaT-Zellen nach Behandlung mit 20 ng/mL TNF- α für unterschiedliche Dauer.	69
Abbildung 20: Relative Änderung der Genexpression von <i>CXCL8</i> (a) und <i>TRPV1</i> (b) nach 24-stündiger Vorbehandlung mit TRPV1 Agonist/ Antagonist und anschließender Kontrollbehandlung ohne TNF- α zu zwei Zeitpunkten (I, II).....	71
Abbildung 21: Relative Änderung der Genexpression von <i>CXCL8</i> (a) und <i>TRPV1</i> (b) nach 24-stündiger Vorbehandlung mit TRPV1 Agonist/ Antagonist und anschließender Behandlung mit TNF- α zu zwei Zeitpunkten (I, II).	73
Abbildung 22: Bestimmung der relativen Änderung der Freisetzung von IL-8 mittels ELISA nach 24-stündiger Vorbehandlung mit TRPV1 Agonist/ Antagonist	

und anschließender Behandlung mit (b) oder ohne (a) TNF- α zu zwei Zeitpunkten (I, II).....	75
Abbildung 23: Relative Änderung der Genexpression von <i>CXCL8</i> (a) und <i>TRPA1</i> (b) nach 24-stündiger Vorbehandlung mit TRPA1 Agonist/ Antagonist und anschließender Kontrollbehandlung ohne TNF- α zu zwei Zeitpunkten (I, II).....	77
Abbildung 24: Relative Änderung der Genexpression von <i>CXCL8</i> (a) und <i>TRPA1</i> (b) nach 24-stündiger Vorbehandlung mit TRPA1 Agonist/ Antagonist und anschließender Behandlung mit TNF- α zu zwei Zeitpunkten (I, II).....	79
Abbildung 25: Bestimmung der relativen Änderung der Freisetzung von IL-8 mittels ELISA nach 24-stündiger Vorbehandlung mit TRPA1 Agonist/ Antagonist und anschließender Behandlung mit (b) oder ohne (a) TNF- α zu zwei Zeitpunkten (I, II).....	81

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der Verbrauchsmaterialien	36
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Gegenstände und Geräte	37
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien und biologischen Materialien	37
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Kits.....	38
Tabelle 5: Eigenschaften der verwendeten Primer für die humanen Gene	39
Tabelle 6: Zusammensetzung 10 x PBS	39
Tabelle 7: Zusammensetzung MTT-Reagenz.....	39
Tabelle 8: Zellanzahl, Fläche und Volumen der verwendeten Zellkultur Platten	41
Tabelle 9: Einzelkonzentrationen der Agonisten/Antagonisten von TRPV1 und TRPA1	44
Tabelle 10: Konzentration der jeweiligen Agonisten und Antagonisten für die kombinierte Behandlung	46
Tabelle 11: Reaktionsgemisch für die cDNA-Synthese.....	49
Tabelle 12: Zyklusschritte des Programms für die cDNA-Synthese im C-1000 Touch™ Thermal Cycler.....	49
Tabelle 13: Zusammensetzung des Reaktionsmixes (ohne Probe) für die Durchführung der RT-qPCR.	51
Tabelle 14: Temperaturprogramm für die RT-qPCR im StepOnePlus™	51
Tabelle 15: Zusammensetzung der Standardlösungen zur Bestimmung von IL-8.....	53
Tabelle 16: Zusammensetzung für 3 mL Antikörper-Cocktail	53
Tabelle 17: Zusammensetzung des Waschpuffers.....	54
Tabelle 18: Rohdaten des MTT-Tests unter TNF- α Behandlung.....	i
Tabelle 19: Rohdaten des MTT-Tests unter Capsaicin bzw. Capsazepin Behandlung.....	ii
Tabelle 20: Rohdaten des MTT-Tests unter Zimtaldehyd bzw. AP-18 Behandlung.....	iii
Tabelle 21: Rohdaten des MTT-Tests unter kombinierter Behandlung aus Agonist und Antagonist	iv
Tabelle 22: Rohdaten der <i>CXCL8</i> RT-qPCR unter TNF- α Behandlung für 48 h	v
Tabelle 23: Rohdaten des ELISA-Tests unter TNF- α Behandlung für 48 h	vi
Tabelle 24: Rohdaten der <i>TRPV1</i> RT-qPCR unter TNF- α Behandlung für 48 h.....	vii
Tabelle 25: Rohdaten der <i>TRPA1</i> RT-qPCR unter TNF- α Behandlung für 48 h.....	viii
Tabelle 26: Rohdaten der <i>CXCL8</i> RT-qPCR unter 20 ng/mL TNF- α Behandlung	ix
Tabelle 27: Rohdaten des ELISA-Tests unter 20 ng/mL TNF- α Behandlung	x
Tabelle 28: Rohdaten der <i>TRPV1</i> RT-qPCR unter 20 ng/mL TNF- α Behandlung.....	xi
Tabelle 29: Rohdaten der <i>TRPA1</i> RT-qPCR unter 20 ng/mL TNF- α Behandlung.....	xii
Tabelle 30: Rohdaten RT-qPCR bei Kontrollbehandlung unter Vorbehandlung mit TRPV1 Agonist/	xiii
Tabelle 31: Rohdaten RT-qPCR bei TNF- α Behandlung unter Vorbehandlung mit TRPV1 Agonist/	xiv
Tabelle 32: Rohdaten des ELISA-Tests unter Vorbehandlung mit TRPV1 Agonist/Antagonist.....	xv
Tabelle 33: Rohdaten RT-qPCR bei Kontrollbehandlung unter Vorbehandlung mit TRPA1 Agonist/	xvi
Tabelle 34: Rohdaten RT-qPCR bei TNF- α Behandlung unter Vorbehandlung mit TRPA1 Agonist/	xvii
Tabelle 35: Rohdaten des ELISA-Tests unter Vorbehandlung mit TRPA1 Agonist/Antagonist.....	xviii

Abkürzungsverzeichnis

ADI	Acceptable Daily Intake
AP	AP-18
AP-1	Aktivator-Protein-1
ARD	Ankyrin Wiederholungen
ARE	Adenosin/Uridin-reiche Elemente
ATP	Adenosintriphosphat
BPE	Bovine Pituitary Extract
CaM	Calmodulin
CaMKII	Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Cap	Capsaicin
CapZ	Capsazepin
Ca ²⁺	Calciumionen
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
CREB	cAMP response element-binding protein
CXCL8	C-X-C Motif Chemokine Ligand 8
CXCR	G-protein-gekoppelter Chemokin-Rezeptor
DAG	Diacylglycerin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	Extrazellulär Signal-regulierte Kinase
FBS	fetales Kälberserum
fw	forward
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
HaCaT	Human adult low Calcium high Temperature
hCa ²⁺	hoher Ca ²⁺ -Gehalt
HEK-293	Human Embryonic Kidney 293 Cells

HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
IgE	Immunoglobulin E
IκB	Inhibitor von NFκB
IKK	IκB-Kinase
IL-8	Interleukin 8
IP ₃	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
nCa ²⁺	niedriger Ca ²⁺ -Gehalt
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NF-AT	nuclear factor of activated T cells
NF-κB	nuclear factor kappa B
NFW	Nuklease-freies Wasser
NGF	Nervenwachstumsfaktor
NOEL	No Observed Effect Level
Nrf-2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PIP	Phosphatidylinositol-4-bisphosphat
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PI3K/Akt	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase/ Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
Pt.	Platte (biologisches Replikat)
RhoA	Ras homolog gene family, member A
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonucleasen

rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-qPCR	Quantitative real-time Polymerase Kettenreaktion
RTX	Resiniferatoxin
rv	reverse
SD	Standardabweichung
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
S1-6	Transmembranhelices 1-6
S9	Supernatant der Zentrifugation bei 9000 g
NF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
Th-2	T-Helfer-Zellen Typ 2
TNFR	TNF- α Zelloberflächenrezeptor
TRP	Transient Receptor Potential cation channel
TRPA1	Transient Rezeptor Potential cation channel subfamily Ankyrin member 1
TRPV1	Transient Receptor Potential cation channel subfamily Vanilloid member 1
VEGF	vaskulärer Wachstumsfaktor
Zim	Zimtaldehyd

1 Einleitung

Der menschliche Organismus ist täglich zahlreichen Reizen über die Umwelt ausgesetzt. Diese können physiologischen Funktionen dienen, wie der Kontakt mit Nährstoffen oder unerwünschte und mit Entzündungen einhergehende Reaktionen auslösen. Als erste Schnittstelle zwischen Körper und Umwelt stellt die Haut eine wirksame Barriere für verschiedene chemische, physikalische und mikrobiologische Reize dar (zusammengefasst von C. Cao et al., 2020; Proksch et al., 2008). Epidermale Keratinozyten sind Hauptbestandteil der äußeren Hautschicht und wesentlich an der Aufrechterhaltung homöostatischer Prozesse beteiligt sowie der Weiterleitung von Gefahrensignalen, wodurch Hautentzündungen vermittelt werden können (zusammengefasst von Pasparakis et al., 2014). Um schädliche Umweltreize wahrzunehmen, ist die Haut mit speziellen Rezeptoren und Ionenkanälen ausgestattet. Dazu zählen unter anderem die „Transient Receptor Potential“ Kanäle (TRP-Kanäle), deren Expression sich über epidermale Keratinozyten und zahlreiche weitere Körperregionen erstreckt. TRP-Kanäle dienen als Sensoren für thermische, chemische, mechanische und schmerzhaft Reize und können eine Rolle bei Entzündungsreaktionen einnehmen (zusammengefasst von Clapham, 2003; Gouin et al., 2017).

Zahlreiche krankhafte Veränderungen sind mit Entzündungsreaktionen assoziiert, die beispielsweise Stoffwechselstörungen, Adipositas, allergische Reaktionen, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Atherosklerose oder Krebs umfassen und die Lebensqualität der Betroffenen sowie zahlreiche Körperfunktionen beeinträchtigen können (zusammengefasst von Netea et al., 2017; Zheng et al., 2022). Damit stellen Entzündungsreaktionen - insbesondere chronische - ein außerordentliches Gesundheitsproblem dar. Bemühungen zum besseren Verständnis der komplexen Reaktionen und dem Auflösen dieser sind ein zentrales Ziel vieler Forschungsarbeiten (zusammengefasst von Netea et al., 2017; Slavich 2015; Zheng et al., 2022). Auch Hautveränderungen können sich systemisch äußern und mit anderen entzündlichen Erkrankungen in Verbindung stehen oder auf diese hinweisen, dazu zählen arthritische, diabetische, kardiovaskuläre und intestinale Erkrankungen (zusammengefasst von Sampaio et al., 2021). Lebensstil- und Ernährungsinterventionen, die einen Einfluss auf entzündliche Zustände nehmen und beispielsweise eine Gewichtsabnahme unterstützen, werden dadurch auch mit einer Verbesserung der Hautveränderungen in Zusammenhang gebracht (zusammengefasst von Gisondi et al., 2020; Y. Hu et al., 2019). Während therapeutische Effekte nicht immer auf einzelne Nährstoffe heruntergebrochen werden können, sind einige Lebensmittelinhaltsstoffe dennoch auf gewisse Weise mit Reaktionen in der Haut assoziiert. Viele

Mitglieder der TRP-Kanäle, darunter TRPV1 („Vanilloid“ Unterfamilie) und TRPA1 („Ankyrin“ Unterfamilie), werden durch ein breites Spektrum aus pflanzlichen Verbindungen aktiviert, die Verwendung in Gewürzen und als Lebensmittel finden. Zu diesen pflanzlichen Modulatoren zählen Capsaicin und Zimtaldehyd. Capsaicin, Hauptbestandteil von Chilischoten, vermittelt über die Aktivierung von TRPV1 eine scharfe, brennende Empfindung, die beim Verzehr von Chilischoten auftritt und bei Anwendung auf der Haut zu ähnlichen Reaktionen führt, die mit Hautrötungen und dem Gefühl von Verbrennungen einhergehen (zusammengefasst von Arora et al., 2021). Diese Reaktionen sind charakteristisch für das makroskopische Erscheinungsbild von Entzündungen (Ansorge & Täger, 2014). Trotz der scharfen, fast schmerzhaften Empfindungen wird Capsaicin als Gewürz geschätzt und ist für analgetische Wirkungen bekannt (Nilius & Appendino, 2011; zusammengefasst von Arora et al., 2021). Zimtaldehyd, Bestandteil von Zimt, findet Verwendung als Gewürz und Aromastoff in Lebensmitteln sowie einigen Kosmetikprodukten und ist ein Agonist von TRPA1 (zusammengefasst Doyle & Stephens, 2019; Gruenwald et al., 2010). Daneben gilt Zimtaldehyd als Hapten und kann in höheren Konzentrationen Hautirritationen wie allergische Kontaktdermatitis auslösen (El Ali et al., 2013). Insbesondere TRPA1 reagiert auf eine Reihe von Hautsensibilisatoren und Entzündungsmediatoren und ist selbst an der Freisetzung von Neuropeptiden sowie der Vermittlung von Entzündungsreaktionen beteiligt, wodurch TRPA1 eine Rolle als Detektor und Initiator von Entzündungsreaktionen einnimmt (zusammengefasst von Bautista et al., 2013). Die Verwendung von Capsaicin und Zimtaldehyd wird daneben mit zahlreichen gesundheitlichen Vorteilen in Verbindung gebracht, die beispielsweise die Adipogenese und den Glucosestoffwechsel betreffen (zusammengefasst von Derbenev und Zsombok 2016).

In der Literatur bestehen Diskrepanzen bezüglich der Rolle von TRPV1 und TRPA1 bei entzündlichen Zuständen (zusammengefasst von Alawi & Keeble, 2010; Silverman et al., 2020). Die Modulation dieser beiden Kanäle verhält sich ebenso komplex wie Entzündungsreaktionen und ihre Rolle bei diesen. Diesbezüglich können zwischen verschiedenen Organismen und Zelltypen unterschiedliche Regulationsmechanismen bestehen, weshalb insbesondere Untersuchungen an humanen Zellen von besonderem Interesse sind (zusammengefasst von Koivisto et al., 2022). Der Fokus dieser Masterarbeit wird auf der Expression von TRPV1 bzw. TRPA1 in humanen Keratinozyten liegen. Im Rahmen dieser Arbeit soll ihre Rolle bezüglich pro- und antiinflammatorischer Wirkungen untersucht werden, die sich aus der Modulation der Kanäle mit den spezifischen Agonisten und Antagonisten - darunter

Capsaicin und Zimtaldehyd - ergibt. Dabei wurde die Expression und Sekretion von IL-8/*CXCL8* in humanen Keratinozyten zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen, nachdem die Zellen mit TNF- α - zur Induktion der Entzündungsreaktion - und anschließend mit den jeweiligen Agonisten bzw. Antagonisten oder einer Kombination aus beiden behandelt und inkubiert wurden. Da TRPV1 und TRPA1 eine Rolle als polymodale Rezeptoren einnehmen, die praktisch im gesamten menschlichen Körper präsent sind, repräsentieren sie ein interessantes Forschungsobjekt, deren Modulation der Kanalaktivität einen therapeutischen Nutzen in Bezug auf schmerz- und entzündungsassoziierte pathologische Veränderungen mit sich bringen kann, die es auf zellulärer Ebene aufzuklären gilt.

2 Wissenschaftlicher Hintergrund

2.1 Die menschliche Haut - Funktionen und Aufbau

Die Haut ist das größte Organ des menschlichen Körpers und stellt die größte Kontaktfläche zur Umwelt dar. Indem sie eine wirksame Barriere zwischen Organismus und Umwelt aufrechterhält, hat sie die Aufgabe, den Körper vor dem Eindringen von Fremdstoffen, Krankheitserregern, Allergenen und anderen Umwelteinflüssen zu schützen (zusammengefasst von Proksch et al., 2008; Schutte et al., 2021). Dabei ist die Haut an der Somatosensorik beteiligt und vermittelt Prozesse, die beispielsweise die Wahrnehmung von Schmerz, Juckreiz oder Temperatur umfassen (zusammengefasst von Schutte et al., 2021). Um diesen Aufgaben nachzukommen, ist sie einem ständigen Selbsterneuerungsprozess ausgesetzt, der die Versorgung mit Nährstoffen und Energie voraussetzt (zusammengefasst von C. Cao et al., 2020). Grundsätzlich ist die menschliche Haut aus drei Schichten aufgebaut: der Epidermis (Oberhaut), der Dermis und der Hypodermis (Unterhaut, auch Subkutis genannt). Um die sensorischen und neuronalen Reaktionen zu vermitteln, wird die Haut von Nervenfasern - größeren myelinisierten A β - und A δ -Fasern der Dermis und unmyelinisierten C-Fasern, die bis in die Epidermis reichen - durchzogen. Diese ermöglichen eine bidirektionale Kommunikation zwischen Haut und Nervensystem (zusammengefasst von Schutte et al., 2021). Die Hypodermis besteht vor allem aus Adipozyten und Bindegewebe. Sie ist die Verbindungsstelle zwischen Haut und Körper und dient zur Polsterung, Wärmeisolierung und als Energiespeicher (Deutschmann, 2005). Daneben ist sie an der Sezernierung von Hormonen und Zytokinen beteiligt sowie an der Mechanorezeption (zusammengefasst von Schutte et al., 2021). Die darauffolgende Dermis wird vor allem von Fibroblasten gebildet und stellt ein Gerüst aus Bindegewebe dar, welches der Haut Festigkeit und Struktur verleiht. Zudem wird die Dermis von Blut- und Lymphgefäßen, die zur Nährstoffversorgung und zum Stofftransport dienen, durchzogen (Deutschmann, 2005). Weitere strukturelle Merkmale sind Talgdrüsen, Schweißdrüsen und Haarfollikel. Die Epidermis repräsentiert die äußerste Hautschicht und besteht zu 90 % aus Keratinozyten; daneben beherbergt sie weitere Zellen, unter anderem melaninbildende Melanozyten, die einen Schutz vor ultravioletten (UV)-Strahlungen gewährleisten, Merkel-Zellen, die zur Mechanorezeption beitragen sowie Langerhans-Zellen, die für die Antigenpräsentation zuständig sind (Deutschmann, 2005; zusammengefasst von Schutte et al., 2021). Insgesamt leistet die Epidermis damit einen wichtigen Beitrag

zur physikalischen, chemischen und immunologischen Barrierefunktion der Haut (zusammengefasst von Schutte et al., 2021).

Verschiedene Umwelteinflüsse wie UV-Strahlungen, toxische Verbindungen, mechanische Reize und freie Radikale sowie bestimmte Lebensstilfaktoren (z.B. Rauchen) oder der Prozess der Hautalterung können die Hautbarriere und -funktionen beeinflussen und diese wiederum anfälliger für äußere Reize machen, was sich letztlich als Immundysfunktionen und Entzündungsreaktionen der Haut äußern kann (zusammengefasst von Boelsma et al., 2001; Chambers & Vukmanovic-Stejic, 2020). Ebenso wurden Veränderungen des Darmmikrobioms und damit einhergehende veränderte Immunfunktionen mit der Entstehung von Hautentzündungen in Verbindung gebracht. Genaue Mechanismen, die auf diese Weise Hauterkrankungen beeinflussen, werden diskutiert und erforscht (zusammengefasst von Mahmoud et al., 2023). An der Detektion derartiger Umweltreize sind TRP-Kanäle beteiligt, die gemeinsam mit epidermalen Keratinozyten als wichtige Akteure an der Schnittstelle zwischen Körper und Umwelt agieren (zusammengefasst von Denda & Tsutsumi, 2011; Lee & Caterina, 2005).

2.2 Expression der TRP-Kanäle im menschlichen Organismus

„Transient Receptor Potential“ Kanäle (TRP-Kanäle) sind eine Superfamilie von kationendurchlässigen Ionenkanälen, die als zelluläre Sensoren insbesondere an der Plasmamembran von zahlreichen Zellen lokalisiert sind (zusammengefasst von Clapham, 2003). Dabei weisen sie - mit unterschiedlicher Selektivität - eine hohe Permeabilität für Calciumionen (Ca^{2+}) auf. Über die Regulation der Calciumhomöostase sind TRP-Kanäle beispielsweise an der Zelldifferenzierung, -proliferation, -migration oder der Freisetzung von Entzündungsmediatoren beteiligt (zusammengefasst von Clapham, 2003; Du et al., 2019; Khalil et al., 2018). Im menschlichen Organismus nehmen TRP-Kanäle eine bedeutende Rolle bei der Wahrnehmung von Wärme, schädlicher Hitze und Kälte, mechanischen und chemischen Reizen sowie der Chemesthesis ein und stehen zum Teil in Interaktion mit der Wahrnehmung von primären Geschmackseigenschaften (zusammengefasst von Clapham, 2003; Rhyu et al., 2021; Venkatachalam & Montell, 2007). TRP-Kanäle fungieren als polymodale Signaldetektoren, die an der Vermittlung und Verstärkung der spezifischen Signale auf zellulärer Ebene weit verbreitet sind (zusammengefasst von Clapham, 2003; M. Liao et al., 2013). Bei Säugetieren werden die TRP-Kanäle aufgrund ihrer Homologie in sechs Unterfamilien

eingeteilt: TRPC („kanonisch/canonical“), TRPM („Melastatin“), TRPV („Vanilloid“), TRPA1 („Ankyrin“), TRPP („Polycystin“) und TRPML („Mucolipin“) (zusammengefasst von Clapham, 2003; Venkatachalam & Montell, 2007). Der Fokus dieser Arbeit liegt auf den beiden nicht selektiven Kationenkanälen „Transient Receptor Potential Vanilloid 1“ (TRPV1) und „Transient Rezeptor Potential Ankyrin 1“ (TRPA1).

Die Expression dieser beiden TRP-Kanäle erstreckt sich in hohem Maß über sensorische afferente Neuronen (unmyelinisierte C-Fasern und myelinisierte A δ -Fasern), die Zellkörper im dorsalen Wurzelganglion, Trigeminalganglion und Vagusnerv besitzen und zahlreiche Orte in der Peripherie innervieren (zusammengefasst von Bautista et al., 2013; Du et al., 2019). Beiden Kanälen wird dadurch eine bedeutende Rolle bei der Nozizeption zugeschrieben (Story et al., 2003; Malin et al., 2011). Viele der Neuronen, die TRPV1 und TRPA1 exprimieren, sind peptiderg und an der Freisetzung von Neuropeptiden wie Substanz P, Neurokinin A und Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) beteiligt, die unter anderem an der Vermittlung von kutanen neurogenen Entzündungsreaktionen beteiligt sind (zusammengefasst von Bautista et al., 2013; Khalil et al., 2018). Die neuronale Expression war Schwerpunkt vieler Forschungsarbeiten. Jedoch werden TRPV1 und TRPA1 auch in vielen nicht-neuronalen Zellen exprimiert (zusammengefasst von Bautista et al., 2013; Khalil et al., 2018). So beispielsweise in Atemwegszellen (McGarvey et al., 2014; Nassini et al., 2012), in einigen Immunzellen (Lv et al., 2021; Ständer et al., 2004; Oh et al., 2013), in Synoviozyten (Kochukov et al., 2006), gastrointestinalen Zellen (Lieder et al., 2020; Purhonen et al., 2008), Adipozyten (Hoi et al., 2020; L. L. Zhang et al., 2007) und in humanen kutanen Zellen, darunter Keratinozyten sowie zum Teil Fibroblasten, Melanozyten und Mastzellen (Atoyan et al., 2009; Ständer et al., 2004).

Letztlich erstreckt sich die Expression praktisch über den gesamten menschlichen Organismus. Über die Beteiligung an der sensorischen Wahrnehmung, der Nozizeption und Entzündungsreaktionen, wurden sie in einem engen Zusammenhang mit zahlreichen physiologischen Prozessen gestellt. Auf diese Weise können sie die Pathologie diverser Erkrankungen beeinflussen, die insbesondere in Bezug auf das Herz-Kreislauf-System (z.B. Hypertonie, Atherosklerose), den Magen-Darm-Trakt (z.B. Reizdarmsyndrom IBS), die Atemwege, Pankreatitis, Fettleibigkeit, Diabetes sowie entzündlichen Hauterkrankungen festgestellt wurden (Legrand et al., 2020; zusammengefasst von Silverman et al., 2020).

2.3 Strukturelle Eigenschaften von TRPV1 und TRPA1

TRPV1 und TRPA1 bilden eine tetramere Struktur, bei der die Untereinheiten jeweils aus sechs Transmembran α -Helices (S1-S6) bestehen (Abbildung 1), welche die Kanäle in der Lipiddoppelschicht von exprimierenden Zellen verankern (M. Liao et al., 2013; zusammengefasst von Clapham, 2003). Die Untereinheiten schließen sich um eine zentrale Pore zusammen, die zwischen S5 und S6 gebildet wird. TRPV1 ist neben einer Porenhelix durch eine Porenschleife gekennzeichnet (re-entrant loop), die bis zur Hälfte die Membran durchzieht und wieder zur anderen Seite umdreht (M. Liao et al., 2013; Neuberger et al., 2023).

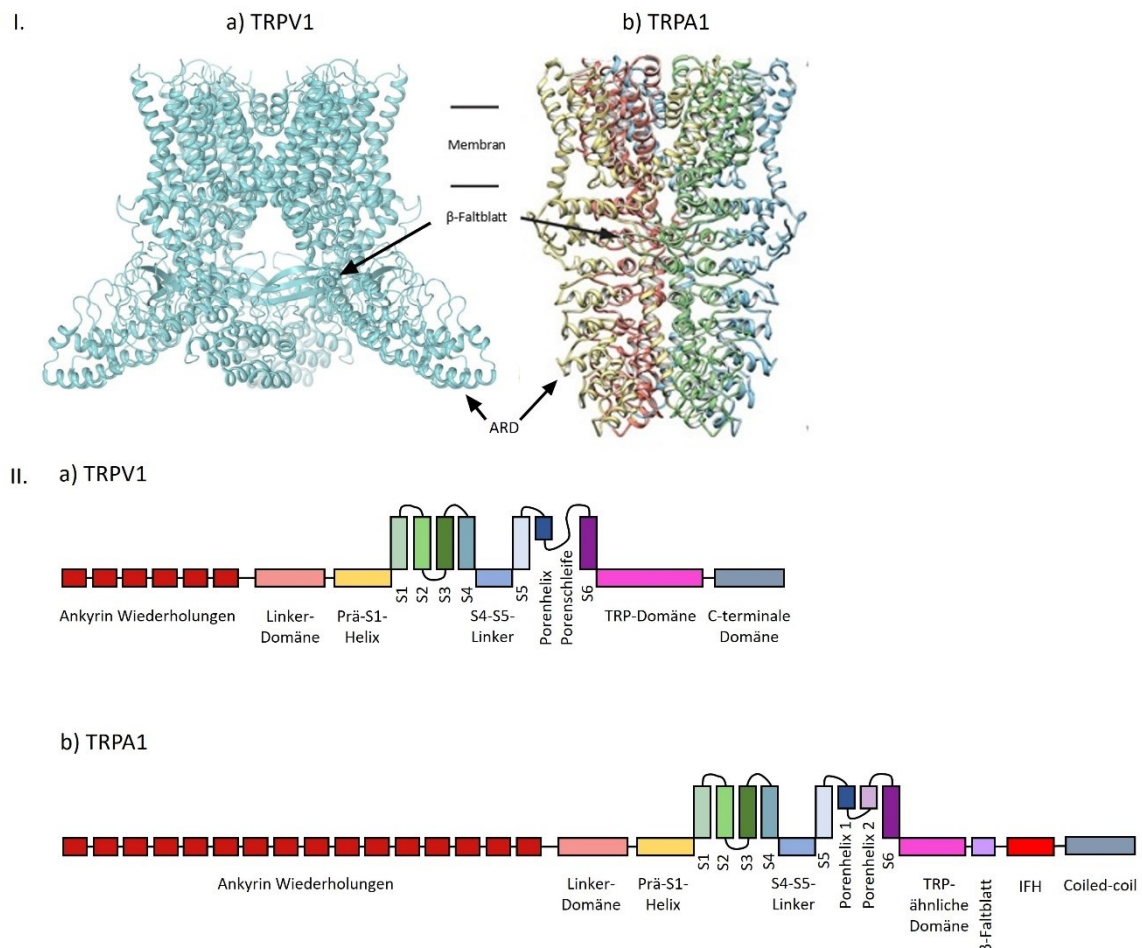


Abbildung 1: Tetramere Struktur (I) und lineares Diagramm (II) von TRPV1 und TRPA1. Das Bänderdiagramm (I) zeigt die tetramere Struktur von TRPV1 (a) und TRPA1 (b), wobei die vier Untereinheiten für TRPA1 farblich gekennzeichnet sind. Im linearen Diagramm (II) sind die wichtigsten strukturellen Domänen einer Untereinheit von TRPV1 (a) und TRPA1 (b) dargestellt. (I. adaptiert nach: Neuberger et al., 2023; Paulsen et al. 2015; II. eigene Darstellung, adaptiert nach: M. Liao et al. 2013, Paulsen et al. 2015; Suo et al., 2020) ARD: „Ankyrin repeat domain“; IFH: „interfacial helix“; S1-6: Transmembranhelices 1-6

Die Struktur von TRPV1 weist teilweise Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies auf, wobei insbesondere der C-Terminus, die S1-S2, S2-S3 und S5-Porenregion des humanen Orthologs sich von denen der Ratte unterscheiden. Da diese Regionen an der Kanalöffnung und -modulation beteiligt sind, können sich Unterschiede in der Sensitivität von TRPV1 gegenüber Temperatur und anderen Liganden ergeben (Neuberger et al., 2023). Über allosterische Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten kann die Porenkonformation beeinflusst und ein Ionenfluss durch die Kanalproteine ermöglicht werden (M. Liao et al., 2013). Die Poren von TRPV1 und TRPA1 weisen zwei Verengungen auf, die ein oberes Tor („Selektivitätsfilter“) und ein unteres Tor bilden (Abbildung 2). Letzteres wird durch zytoplasmische Enden der S6-Helices gebildet (zusammengefasst von Clapham, 2003).

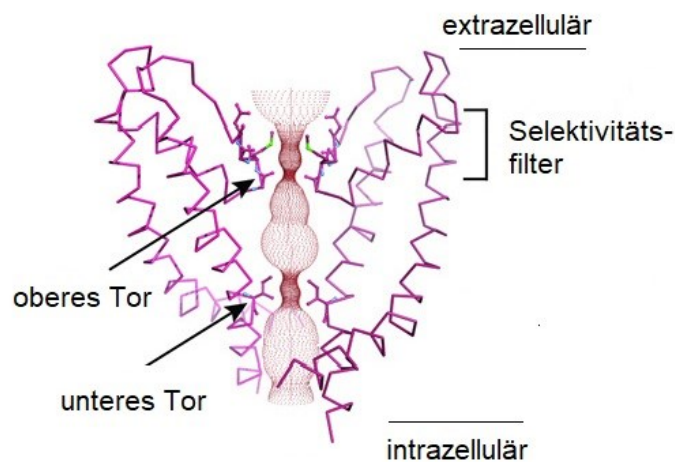


Abbildung 2: „S5-P-S6 Porenregion“ von TRPV1 im geschlossenen Zustand. Dargestellt ist der lösungsmittelzugängliche Pfad der TRPV1-Struktur im geschlossenen Zustand. Reste, die sich am Selektivitätsfilter und unteren Tor befinden sind als Stäbchen dargestellt. (adaptiert nach: E. Cao et al., 2013)

Die äußere Porenstruktur von TRPV1 ist trichterartig und weist eine weite Öffnung auf, wodurch das Passieren von kleinen und großen Partikeln ermöglicht wird. Der darauffolgende „Selektivitätsfilter“ erfährt im stimulierten Zustand eine Vergrößerung seines Durchmessers und trägt zur Regulation des Eintritts von Kationen bei (M. Liao et al., 2013). Die äußere Pore von TRPA1 ähnelt der von TRPV1 besitzt aber eine etwas steilere Form und besteht aus zwei Porenhelices (Paulsen et al., 2015; Suo et al., 2020). Der Selektivitätsfilter von TRPA1 ist dennoch auch in der Lage, größere hydratisierte Calciumionen passieren zu lassen.

C-terminal zum sechsten Transmembransegment befindet sich eine hochkonservierte TRP-Domäne. Diese ermöglicht Wechselwirkungen mit der Pre-S1-Helix und dem S4-S5-Linker

und trägt zur allosterischen Modulation bei. Für TRPA1 wurde eine TRP-ähnliche-Domäne identifiziert. Weitere charakteristische Merkmale sind die Ankyrin Wiederholungen am N-terminalen Ende. Für TRPA1 sind diese namensgebend, da sie zusammen mit der C-terminalen Domäne etwa 80 % der Masse von TRPA1 ausmachen (M. Liao et al., 2013). Die genaue Funktion der Ankyrin Wiederholungen bleibt unklar, könnte aber die Grundlage zur Modulation mit verschiedenen Aktivatoren ermöglichen (Paulsen et al., 2015). Reste der Domäne aus Ankyrin Wiederholungen (ARD) von TRPV1 interagieren mit β -Strängen aus der Linker- und TRP-Domäne und bilden ein sogenanntes dreisträngiges β -Faltblatt. Dieses hält durch Wechselwirkungen der Untereinheiten die Kanalordnung aufrecht (M. Liao et al., 2013). Eine ähnliche Struktur wurde für TRPA1 beschrieben. Dabei wird aus der ARD, Linker- und Coiled-Coil-Domäne ein freistehendes β -Faltblatt gebildet (Abbildung 1). Möglicherweise dient diese Anordnung zur Interaktion mit Membranphospholipiden wie Phosphatidylinositolen und damit zur Steuerung der Kanalfunktion (Paulsen et al., 2015). TRPA1 ist zudem durch eine Grenzflächenhelix („IFH“, Abbildung 1b) gekennzeichnet, die einen Teil der C-terminalen Region bildet und eine Struktur des β -Faltblattes mit der Coiled-Coil Region verbindet. Diese Grenzflächenhelix ist wesentlich an der Kanalsteuerung von TRPA1 beteiligt (Suo et al., 2020).

2.4 Modulatoren von TRPV1/A1

Die Aktivierung von TRPV1 bzw. TRPA1 führt zur Kanalöffnung, zum Einstrom von insbesondere Ca^{2+} und zur Aktivierung nachgeschalteter Signalwege, die an der Schmerzübertragung und Entzündungsreaktionen beteiligt sein können (zusammengefasst von O'Neill et al., 2012; Silverman et al., 2020). Das Interesse an der Modulation dieser Kanäle, die beispielsweise als erste Vermittler an der Schmerzempfindung beteiligt sind, steigt (Neuberger et al., 2023). Zahlreiche natürlich vorkommende Stoffe, die als Agonisten und Antagonisten von TRP-Kanälen fungieren, haben bereits zu einem besseren Verständnis der Kanalfunktion oder der Entdeckung selbst geführt. Interessanterweise stellen einige natürliche Verbindungen bereits seit Jahrtausenden traditionelle Mittel zur Behandlung von Krankheiten dar. Dazu zählen Chilischoten, die bei Magengeschwüren, rheumatoiden Erkrankungen, Zahnschmerzen und zur Appetitstimulation eingesetzt wurden. Einige Medikamente der modernen Medizin haben so einen indirekten oder direkten Ursprung in Naturprodukten (zusammengefasst von Calixto et al., 2005). In den folgenden Abschnitten wird er molekulare

Mechanismus der Kanalmodulation beschrieben, bevor auf die Beteiligung der TRP-Kanäle an Entzündungsreaktionen eingegangen wird.

2.4.1 Agonisten und Aktivierungsmechanismen von TRPV1

Ein prominenter und sehr potenter Agonist von TRPV1 ist Capsaicin ((*E*)-*N*-[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)methyl]-8-methylnon-6-enamide), der auch in dieser Arbeit verwendet wurde. Capsaicin gehört zur Gruppe der Capsaicinoide, welche mit einem Anteil von etwa 0,3 - 1 % natürliche Bestandteile von Nachtschattengewächsen der Gattung *Capsicum* sind. Capsaicin macht mit einem Anteil von etwa zwei Drittel bis drei Viertel den Hauptbestandteil der Capsaicinoide in diesen Gewächsen aus und findet so beispielsweise in Form von Chilischoten, Paprika oder Cayennepfeffer Verwendung als Lebensmittel und Gewürz. Dabei sind die verschiedenen Capsaicinoide für die scharfe und brennende Empfindung verantwortlich, die mit dem Verzehr dieser Lebensmittel einhergehen (Bundesinstitut für Risikobewertung [BfR], 2011). Capsaicin ist ein Alkaloid aus der Familie der Vanilloide, welche ebenfalls in Nelken, Vanille und Ingwer vorkommen. Strukturell ist Capsaicin durch eine charakteristische Vanillylgruppe (aromatischer Kopf) und am entgegengesetzten Ende durch eine lange hydrophobe Kohlenstoffgruppe gekennzeichnet (Abbildung 3). Zwischen diesen Strukturen befindet sich eine polare Amidgruppe (zusammengefasst von O'Neill et al., 2012).

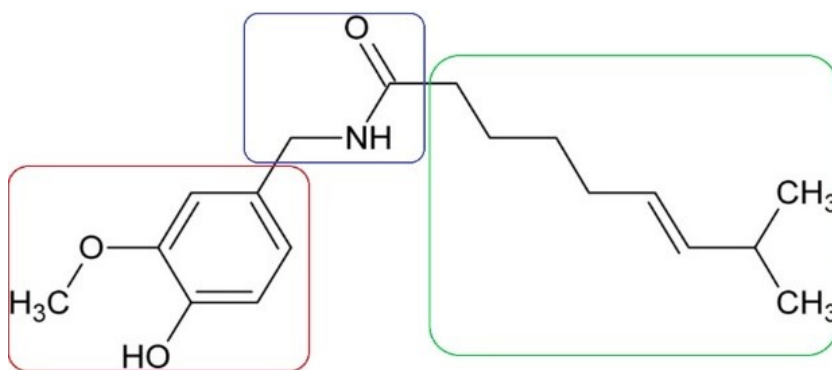


Abbildung 3: Strukturformel von Capsaicin (C₁₈H₂₇NO₃). Bestehend aus der aromatischen Vanillylgruppe („Kopf“, rot), Amidgruppe („Hals“, blau) und dem hydrophoben Kohlenstoffgruppe („Schwanz“, grün). (adaptiert nach: O'Neill et al., 2012)

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass TRPV1 durch ein breites Spektrum an endogenen und exogenen Verbindungen aktiviert werden kann. Dazu zählen hohe Temperaturen bzw. schädliche Hitze ($> 43^{\circ}\text{C}$) und Protonen (Caterina et al., 1997), Toxine tierischen oder pflanzlichen Ursprungs wie Resiniferatoxin (RTX, aus Wolfsmilchgewächsen) sowie weitere natürlich vorkommende scharfe Verbindungen wie Piperin aus Pfeffer, Allicin aus Knoblauch und aromatische würzige Verbindungen aus Nelken oder Ingwer. Zu den endogenen Aktivatoren zählen Endocannabinoide (z.B. N-Arachidonoyldopamin, Anandamid/N-Arachidonoyl ethanolamin), Polyamine (z.B. Spermidin, Spermin) und metabolische Produkte der Lipooxygenase wie Arachidonsäurederivate. Diese letztgenannten endogenen Aktivatoren sind in unterschiedlichem Maß an Entzündungsreaktionen beteiligt und weisen eine erhöhte Freisetzung bei diesen auf (zusammengefasst von O'Neill et al., 2012; Shuba, 2020; Venkatachalam & Montell, 2007; Yang & Zheng, 2017). Ein niedriger pH-Wert ($< 5,9$) kann die thermische Aktivierungsschwelle heruntersetzen, sodass TRPV1 bereits bei Raumtemperatur aktiviert werden kann (zusammengefasst von Venkatachalam & Montell, 2007). Entzündungszustände und Gewebeschäden sowie Ischämie und Hypoxie fördern zudem die Produktion von Protonen, die ebenfalls die Empfindlichkeit von TRPV1 gegenüber Capsaicin heruntersetzen (zusammengefasst von Brito et al., 2014; Venkatachalam & Montell, 2007).

Der Aktivierung von TRPV1 folgt ein Einstrom von insbesondere Ca^{2+} (zusammengefasst von O'Neill et al., 2012). Darauf folgt die Aktivierung der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Phosphatase Calcineurin und intrazellulärer Proteinkinasen, darunter die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase (CaMK) sowie einiger MAP-Kinasen (MAPK), einschließlich ERK1/2 und p38. Dadurch werden wiederum Transkriptionsfaktoren aktiviert, darunter NF-AT, CREB und AP-1, welche die Transkription von entsprechenden Genen auslösen und beispielsweise die Expression von Interleukin-8 (IL-8) oder CGRP vorantreiben (zusammengefasst von Thiel et al., 2018). Auf diese Weise können Prozesse der Zellproliferation, Differenzierung, Migration und der Barrierefunktionen der Haut beeinflusst werden und zu entzündlichen Zuständen beitragen (Miyazaki et al., 2015; Yun et al., 2011). TRPV1 ist auf der Plasmamembran sowie dem endoplasmatischen Retikulum lokalisiert, sodass sowohl der Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle als auch die Freisetzung aus intrazellulären Speichern durch die Aktivierung von TRPV1 reguliert werden kann und damit weitere calciumabhängige Signalwege beeinflusst werden können (zusammengefasst von Blumberg et al., 2011; Hausrate et al., 2020).

Die Aktivierung von TRPV1 durch Capsaicin erfolgt über intrazelluläre Bindung an eine hydrophobe Tasche, die von den S3- und S4-Domänen sowie dem S4-S5-Linker innerhalb der Membran gebildet wird. Dabei nimmt Capsaicin eine „Tail-up, Head-down“-Konfiguration ein. Die nach unten gerichtete Vanillyl- und Amidgruppe gehen über Wasserstoffbrücken eine Bindung mit Aminosäureresten zwischen den Domänen ein (Abbildung 4). Der nach oben gerichtete Kohlenstoffschwanz bleibt recht flexibel und trägt über zahlreiche unspezifische Van-der-Waals-Wechselwirkungen zur Bindung und Stabilität bei (zusammengefasst von Yang & Zheng, 2017). Eine Variation der Schwanzlänge von Capsaicinoiden kann für die unterschiedlich wahrgenommene Schärfe verantwortlich sein, indem ein längerer Schwanz mehr Interaktionspunkte mit der Bindungstasche ermöglicht (Yang et al., 2015). Über einen „Pull-and-Contact“-Mechanismus wird schließlich die Öffnung des Kanals veranlasst (Abbildung 4). Durch ein Ziehen der Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Vanillyl-Kopf von Capsaicin und dem S4-S5-Linker wird letzterer nach außen bewegt. Darauf folgt eine Bewegung der S6-Domäne, die das Öffnen des unteren Tors ermöglicht (zusammengefasst von Yang & Zheng, 2017).

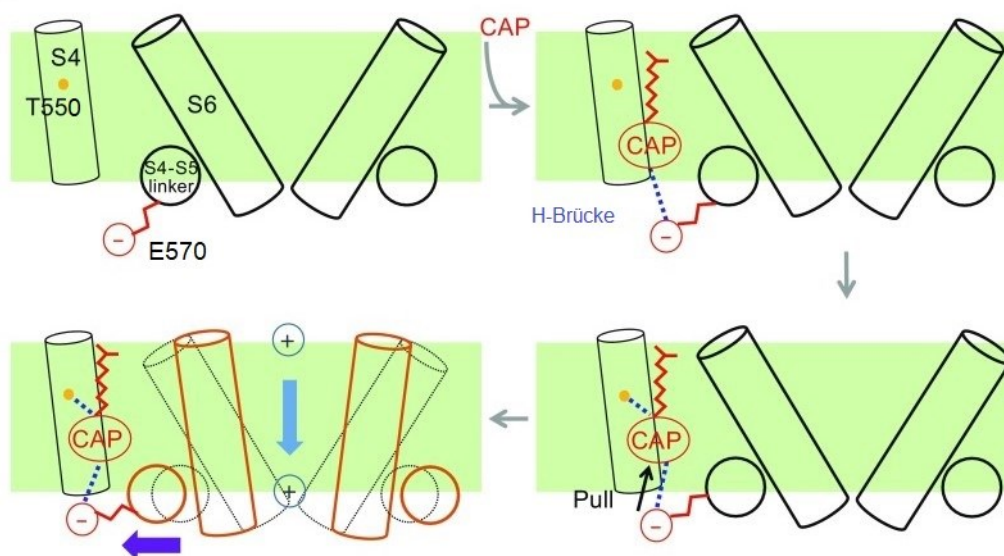


Abbildung 4: Mechanismus der TRPV1 Aktivierung durch Bindung von Capsaicin. Das Diagramm zeigt die Bindung von Capsaicin und anschließenden Aktivierung von TRPV1. Die zwei Aminosäurereste T550 und E570, die eine Schlüsselrolle bei der Bindung mit Capsaicin (über Wasserstoff-Brücken) einnehmen, sind hervorgehoben. (adaptiert nach: Yang & Zheng, 2017)
 CAP: Capsaicin; S4-6: Transmembranhelices 4-6; H-Brücke: Wasserstoff-Brücke; E570: Glutamin 570; T550: Threonin 550

Bei der Capsaicin-gebundenen Struktur geht das untere Tor in einen weit geöffneten Zustand über, während für den Selektivitätsfilter kaum eine Veränderung festgestellt wurde.

Allerdings sollten sich beide Tore bei einer Kanalaktivierung öffnen, um den Ionenfluss zu ermöglichen. Es gibt Hinweise, dass das untere und obere Tor der Pore über allosterische Wechselwirkungen aneinandergekoppelt sind (M. Liao et al., 2013; zusammengefasst von Yang & Zheng, 2017). Demnach könnte Capsaicin eine teilweise offene Struktur von TRPV1 vermitteln. RTX zeigt hingegen eine vollständige Öffnung beider Tore - gilt aber auch als ein sehr potenter Agonist von TRPV1. Diese Erkenntnisse verdeutlichen, dass verschiedene Mechanismen existieren, die eine Kanal-Öffnung ermöglichen, während die Pore eine enorme Flexibilität aufweist (zusammengefasst von Benítez-Angeles et al., 2020; Diaz-Franulic et al., 2016; Yang & Zheng, 2017).

Für TRPV1 existieren unterschiedliche Aktivierungsmechanismen, die sich je nach aktivierendem Reiz unterscheiden (Abbildung 5). TRPV1 kann an zahlreichen Stellen phosphoryliert und dephosphoryliert werden (Jung et al., 2004; zusammengefasst von Shuba, 2020). Diese Prozesse sind mitunter abhängig von Ca^{2+} (Jung et al., 2004).

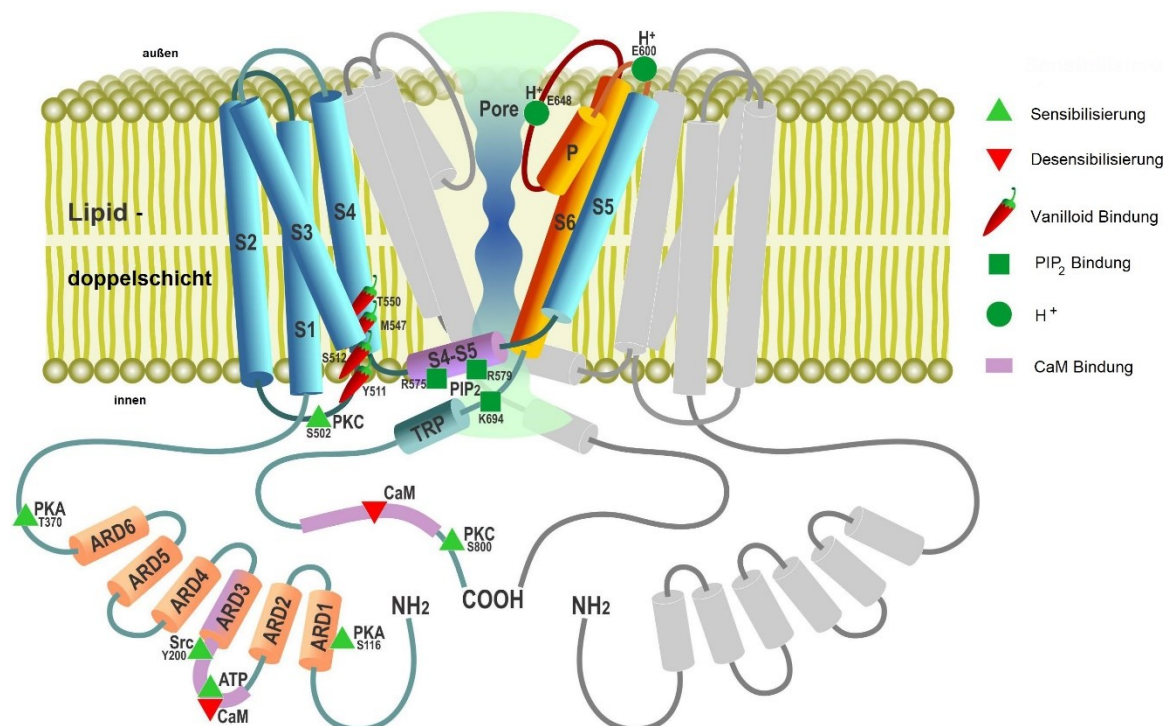


Abbildung 5: Schematische Darstellung der TRPV1-Kanalmembrantopologie mit den verschiedenen Interaktionspunkten. Eine TRPV1-Untereinheit der tetrameren Struktur ist farbig dargestellt sowie eine zweite Untereinheit (grau), die um 180° zur ersten angeordnet ist. Einige der Aminosäurereste, die an der Bindung und Interaktion mit Vanilloiden, PIP₂, H⁺ (bzw. Protonen) und CaM beteiligt sind, sind nummeriert und hervorgehoben. Zudem sind Phosphorylierungsstellen von PKA, PKC und Src-Kinasen dargestellt. PIP₂ Bindungsstellen, die mit einer positiven Regulation von TRPV1 verbunden sind, befinden sich am C-terminalen Ende sowie auf dem S4-S5-Linker. (adaptiert nach: Shuba, 2020; Textquelle: Rohacs, 2015)
 ARD: „Ankyrin repeat domain“; ATP: Adenosintriphosphat; CaM: Calmodulin; PIP₂: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; PKA: Proteinkinase A; PKC: Proteinkinase C; S1-6: Transmembranhelices 1-6; Src: Tyrosinkinase

Für die Capsaicin-induzierte Aktivierung ist eine Phosphorylierung von TRPV1 durch CaMKII notwendig, welche die Reizempfindlichkeit des Kanals erhöhen kann (Jung et al., 2004; zusammengefasst von O'Neill et al., 2012). Weitere Kinasen, die Proteinkinase A (PKA) und C (PKC), können TRPV1 ebenfalls phosphorylieren und sensibilisieren (zusammengefasst von Shuba, 2020). Hingegen kann eine Dephosphorylierung durch Calcineurin zur Desensibilisierung von TRPV1 beitragen (genauere Mechanismen der Desensibilisierung werden in Kap. 7.4.1.1 diskutiert; Jung et al., 2004).

Zusätzlich kann TRPV1 über Mediatoren wie Bradykinin, Nervenwachstumsfaktor NGF, TNF- α , ATP und Prostaglandin aktiviert werden. Für einige dieser Mediatoren, darunter TNF- α , NGF und ATP, wurde gezeigt, dass sie das Expressionsniveau und die Rekrutierung von TRPV1 an die Zelloberfläche erhöhen können (Camprubí-Robles et al., 2009; Meng et al., 2016). Andere Entzündungsmediatoren können die Aktivierungsschwelle für TRPV1 hinuntersetzen (zusammengefasst von O'Neill et al., 2012; Rohacs, 2015). Eine wesentliche Rolle spielt dabei die Phosphorylierung von TRPV1 über den PKC-Signalweg. Dieser wird durch G-protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) induziert. ATP oder Bradykinin, die bei Gewebeschädigungen freigesetzt werden, vermitteln auf diese Weise eine PKC-abhängige Kanalphosphorylierung (zusammengefasst von O'Neill et al., 2012). Ebenso können nachgestaltete PKA-Signalwege oder die Src-Kinase eine Phosphorylierung von TRPV1 induzieren und diesen für die spezifischen Reize wie Capsaicin und Hitze sensibilisieren (zusammengefasst von O'Neill et al., 2012; Shuba, 2020). So wird die Aktivierung von TRPV1 gefördert, welche wiederum die Schmerzempfindung oder Überempfindlichkeit im Zuge von Entzündungsreaktionen und Gewebeschädigungen fördert (zusammengefasst von Brito et al., 2014; Shuba, 2020). Daneben aktivieren Pruritogene GPCRs, sodass TRPV1 in enger Verbindung mit Juckreiz steht (Sarah R Wilson & Diana M Bautista, 2014).

TRP-Kanäle können auch durch Plasmamembranphosphoinositide wie PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) moduliert werden. PIP₂ ist ein weit verbreitetes Signalmolekül und Vorläufer der Secondmessenger Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG). GPCRs können eine durch Phospholipase C (PLC) vermittelte Hydrolyse und damit den Abbau von PIP₂ induzieren, was zur Bildung von DAG führt, welches wiederum an der PKC-vermittelten Phosphorylierung und Sensibilisierung von TRPV1 beteiligt ist (Chuang et al., 2001). Aus diesem Grund wurde PIP₂ unter anderem als Inhibitor von TRPV1 angesehen. Mittlerweile wird die ausschließlich hemmende Wirkung von PIP₂ kontrovers

diskutiert und auch als positiver Cofaktor von TRPV1 angesehen (Abbildung 6). Dabei führen starke Abnahmen von PIP₂ und seinem Vorläufer Phosphatidylinositol-4-bisphosphat (PIP) zur Kanalthemmung und tragen zur Desensibilisierung bei (zusammengefasst von Rohacs, 2015). Ein Abbau von PIP₂ wird beispielweise während Entzündungsreaktionen induziert (Patil et al., 2011). Zudem wurden einige Bindungsstellen von PIP₂ an TRPV1 identifiziert, die mit einer Aktivierung von TRPV1 und der Kanalöffnung assoziiert sind (Abbildung 5).

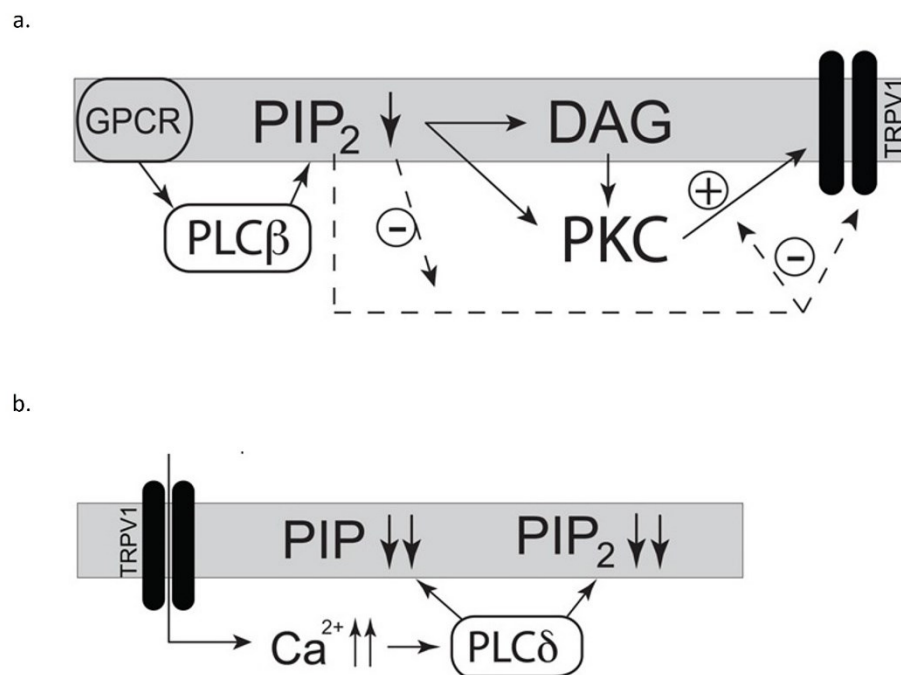


Abbildung 6: Vorgeschlagene Beteiligung der PIP₂ Verarmung an der Sensibilisierung (a) und Desensibilisierung (b) von TRPV1. A: Der PLCβ vermittelte Abbau von PIP₂ kann Sensibilisierung und Aktivierung von TRPV1 über PKC unterstützen. B: Ein erhöhter Einstrom von Ca²⁺ aktiviert hingegen eine Ca²⁺ abhängige PLCδ, welche zu einer robusten Abnahme/Erschöpfung von PIP und PIP₂ führt und zur TRPV1 Hemmung und Desensibilisierung beiträgt. (adaptiert nach: Rohacs 2015)

DAG: Diacylglycerin; GPCR: G-Protein-gekoppelter Rezeptor; PIP: Phosphatidylinositol-4-bisphosphat; PIP₂: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; PKC: Proteinkinase C; PLCβ/δ: Phospholipase C Isoform β/δ

Die durch den Abbau von PIP₂ ausgelöste Sensibilisierung von TRPV1 beruht auf einer Linksverschiebung der Dosis-Wirkungs-Beziehung von TRPV1-Aktivatoren, sodass niedrige und moderate Konzentrationen von beispielsweise Capsaicin zu einer Sensibilisierung beitragen können (zusammengefasst von Rohacs, 2015). Möglicherweise hängen die kontrovers diskutierten Wirkungen von PIP₂ auch mit der Agonistenkonzentration zusammen. Es wurde gezeigt, dass bei niedrigeren Konzentrationen von Capsaicin (20 nM), aber nicht bei hohen (100 nM), eine erhöhte TRPV1 Aktivität durch Abnahme der PIP₂-Spiegel erzeugt

werden konnte (Patil et al., 2011). Insgesamt beschreibt dies einen komplexen Mechanismus der Sensibilisierung von TRPV1.

2.4.2 Agonisten und Aktivierungsmechanismen von TRPA1

Ebenso wie TRPV1 kann TRPA1 durch scharfe natürliche Verbindungen aktiviert werden, die in Kräutern und Gewürzen vorkommen und als Agonisten eine außerordentlich hohe Diversität aufweisen. Dazu zählen Isothiocyante aus Senf-, Meerrettich- und Wasabiöl, Allicin aus Knoblauch sowie Zimtaldehyd aus Zimtöl (zusammengefasst von Venkatachalam & Montell, 2007). TRPA1 wird auch durch eine Reihe von Umweltreizstoffen wie Acrolein, psychoaktiven Komponenten wie Tetrahydrocannabinol (aus Marihuana) oder anderen flüchtigen Reizstoffen wie Formalin oder Wasserstoffperoxid aktiviert (zusammengefasst von Baraldi et al., 2010; Gouin et al., 2017; Venkatachalam & Montell, 2007). Endogene Faktoren die TRPA1 aktivieren sind vor allem diejenigen, die unter entzündlichen Zuständen entstehen und freigesetzt werden (zusammengefasst von Baraldi et al., 2010; Gouin et al., 2017). Die Aktivierung von Neutrophilen und Makrophagen führt beispielweise zu oxidativen Reaktionen, in deren Folge TRPA1 aktiviert wird und zur Auslösung von Schmerzen und Entzündungen beiträgt. So führt der oxidative Abbau von ungesättigten Fettsäuren zur Bildung von reaktiven Carbonylspezies, wie das hochreaktive Acrolein oder α,β -ungesättigten Aldehyden, die zur Bildung von Proteinaddukten führen und damit gewebeschädigende Wirkungen entfalten. Ebenso wird TRPA1 durch reaktive Sauerstoffspezies in Reaktion auf oxidativen Stress, welche eine Rolle bei Asthma oder COPD spielen, sowie Hypochlorit aktiviert, welches infolge der Wirtsabwehr entsteht (zusammengefasst von Baraldi et al., 2010).

Entzündungsmediatoren wie Bradykinin oder PAR2 können TRPA1 indirekt über eine GPCR-Signalisierung sensibilisieren (Bandell et al., 2004; Dai et al., 2007). Eine durch GPCR ausgelöste Aktivierung des PKA-Signalweges kann TRPA1 dabei durch Phosphorylierung sensibilisieren (Meents et al., 2017). Der aktivierte PLC-Signalweg kann hingegen die Kanalaktivierung über den Abbau von PIP₂ vermitteln (Dai et al., 2007). Letztlich existiert eine enge Kommunikation zwischen verschiedenen Entzündungsmediatoren und der Aktivierung von TRPA1 (zusammengefasst von Gouin et al., 2017; Luostarinen et al., 2021; Venkatachalam & Montell, 2007).

Viele der TRPA1-Aktivatoren sind zudem Pruritogene. Dazu zählen - neben Zimtaldehyd, Allicin und Allylthiocyanate - das Malariamittel Chloroquin sowie Juckbohnen. Weitere endogene Pruritogene und Aktivatoren von TRPA1 sind unter anderem Leukotrien B₄, Serotonin, Gallensäure und einige Interleukine wie IL-13 und IL-31 (zusammengefasst von Mahmoud et al., 2023). Auch für TRPA1 wurde eine temperaturabhängige Aktivierung gezeigt, wobei vor allem für Säugetiere und Menschen eine Aktivierung durch Kälte (< 17°C) berichtet wurde, die diesen Kanal als einen Sensor für schädliche Kälte darstellen lässt (Carterina & Pang, 2016). Diesbezüglich bestehen vermutlich artspezifische Unterschiede, die zum Teil zu unterschiedlichen Studienergebnissen führen (zusammengefasst von Rhyu et al., 2021; Venkatachalam & Montell, 2007). Es gibt Hinweise, dass TRPA1 neben der Aktivierung durch Kälte auch durch Hitze aktiviert werden kann (Moparthy et al., 2016).

In dieser Arbeit wird der Fokus auf Zimtaldehyd ((*E*)-3-phenylprop-2-enal) liegen, welches als partieller Agonist von TRPA1 fungiert (Abbildung 7). Zimtaldehyd ist ein Hauptbestandteil des ätherischen Öls, welches aus der Rinde von Bäumen der Gattung *Cinnamomum* gewonnen wird, die als Gewürze verwendet werden (z.B. *Cinnamomum cassia*, bekannt als Cassia-Zimt und *Cinnamomum verum*, bekannt als Ceylon-Zimt). Zimtaldehyd findet als Aroma- und Duftstoff Anwendung in Lebensmitteln sowie Kosmetika und hat eine lange Tradition als Verwendung in der Phytomedizin (BfR, 2006; zusammengefasst von Doyle & Stephens 2019; Gruenwald et al., 2010).

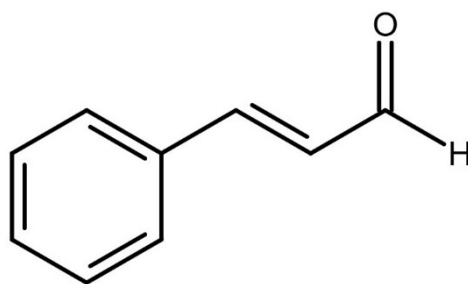


Abbildung 7: Strukturformel von Zimtaldehyd (C₉H₈O).

TRPA1 ist durch zahlreiche intrazelluläre Ligandenbindungs- und Phosphorylierungsstellen gekennzeichnet, durch die der Kanal aktiviert und sensibilisiert werden kann. Die direkte Aktivierung durch Agonisten erfolgt über eine kovalente Interaktion, die sich von dem „klassischen“ nicht-kovalenten Aktivierungsmechanismus von TRPV1 durch Capsaicin

unterscheidet (zusammengefasst von Gouin et al., 2017). Elektrophile reaktive Agonisten wie Zimtaldehyd können über kovalente Modifikation der Cysteinreste innerhalb der zytoplasmatischen N-terminalen Domäne den Kanal aktivieren. Dabei wird die α,β -ungesättigte Bindung von Zimtaldehyd durch die nukleophilen Thiolgruppen der Cysteine über eine Michael-Addition angegriffen. Dadurch wird eine Konformationsänderung und Aktivierung von TRPA1 induziert (Macpherson et al., 2007). Die Öffnung des Kanals (Abbildung 8) beruht vermutlich auf einer Bewegung des β -Faltblattes, sodass ein Teil der C-terminalen Region verschoben wird und sich das S6-Tor öffnen kann (Suo et al., 2020).

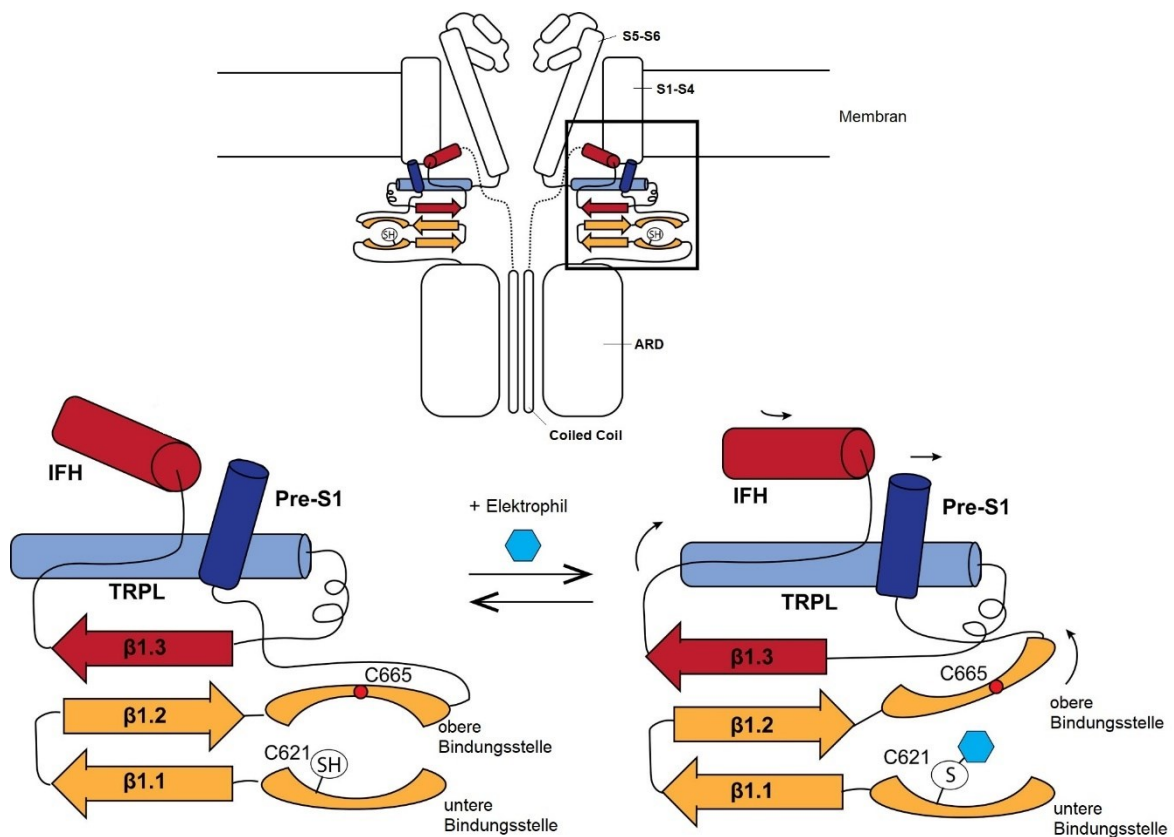


Abbildung 8: Vorgeschlagener Mechanismus der elektrophilen Modulation von TRPA1. Die Bindungsstelle nimmt dabei eine Art Muschelschalen-Konformation ein (linke Seite). Sobald der Cysteinrest „621“ kovalent modifiziert wird (rechte Seite), kippt der obere Teil der Bindungsstelle um. Dadurch wird eine Bewegung des β -Faltblattes ausgelöst und nachfolgend die Position von IFH verändert. Durch die Positionsänderung kann IFH mit dem S4-S5-Linker interagieren und ein Öffnen des S6-Tors induzieren. (adaptiert nach: Suo et al., 2020)

ARD: „Ankyrin repeat domain“; C621/665: Cysteinrest 621/665; IFH: „interfacial helix“; S1-6: Transmembransegment 1-6; TRPL: „TRP like domain“

Das Zytosol von Eukaryoten ist reich an cysteinhaltigen Antioxidantien, um oxidativen Stress durch Elektrophile zu reduzieren. Demnach wurde geschlussfolgert, dass die Detektion von Elektrophilen durch TRPA1 sehr effizient sein muss, um mit den Antioxidantien

konkurrieren zu können (Suo et al., 2020). Für die kovalente Modifikation durch elektrophile Agonisten wurden verschiedene Cysteinreste identifiziert, die sich zwischen Spezies und Agonisten unterscheiden können (Hinman et al., 2006; Macpherson et al., 2007). Dabei nimmt der N-terminale Cysteinrest „Cys621“ wohl eine kritische Rolle für die Kanalöffnung von TRPA1 ein (Suo et al., 2020). Insgesamt deuten diese Erkenntnisse darauf hin, dass vielmehr die Reaktivität der Agonisten - als deren spezielle Struktur - entscheidend ist, um TRPA1 aktivieren zu können (Hinman et al., 2006). Nicht-elektrophile Agonisten wie Menthol und Thymol aktivieren TRPA1 hingegen vermutlich über einen Ligandenbindungsmechanismus (H. Hu et al., 2010; zusammengefasst von Rhyu et al., 2021). Je nach Art der Bindung kann eine Desensibilisierung oder eine anhaltende Reaktion der Aktivierung erfolgen (C. Liu et al., 2021).

Es wurde berichtet, dass Änderungen der Calciumkonzentrationen zu einer Aktivierung oder Inaktivierung von TRPA1 führen, wodurch eine außerordentliche Möglichkeit der Kanalmodulation durch Ca^{2+} besteht (zusammengefasst von Gouin et al., 2017). So kann die Aktivierung von TRPA1 potenziert werden, indem eine Erhöhung von extrazellulärem oder intrazellulärem Ca^{2+} erfolgt, wobei für letztere offenbar ein Calciumeinstrom durch TRPA1 notwendig ist (zusammengefasst von Nilius et al., 2011). Allerdings kann eine Erhöhung von extrazellulärem Ca^{2+} den Kanal auch inaktivieren, sodass die Aktivierung durch elektrophile Verbindungen wie Zimtaldehyd unterbunden wird; hingegen kann bei zu geringen extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen die Aktivierung auch verzögert werden (zusammengefasst von Nilius et al., 2011). Eine Erhöhung von intrazellulärem Ca^{2+} kann die Inaktivierung von TRPA1 zur Folge haben, wobei hierfür höhere Konzentrationen erforderlich sind als für die Förderung der Aktivierung (zusammengefasst von Chen & Hackos, 2015). Genaue Mechanismen der Kanalmodulation durch Ca^{2+} sind nicht vollständig verstanden und es wurden unterschiedliche Domänen beschrieben, die als Bindungsstellen und zur Interaktion dienen könnten (zusammengefasst von Chen & Hackos, 2015; Nilius et al., 2011).

2.4.3 Antagonisten von TRPV1 und TRPA1

In Anbetracht der Beteiligung von TRP-Kanälen an verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen, sind Antagonisten von TRPV1 und TRPA1 ebenfalls von Interesse als potenzielle therapeutische Wirkstoffe. Diese können an den Kanälen binden, eine Aktivierung durch Agonisten unterdrücken und potenziell nachteilige Effekte einer

Kanalaktivierung verhindern (zusammengefasst von Toews und Bylund 2005). Für diese Arbeit wurden die beiden Antagonisten Capsazepin und AP-18 verwendet, die im Folgenden kurz vorgestellt werden und ebenfalls in der Literatur häufig erwähnt und diskutiert werden.

Capsazepin (*N*-[2-(4-chlorophenyl)ethyl]-7,8-dihydroxy-1,3,4,5-tetrahydro-2-benzazepine-2-carbothioamide) ist ein kompetitiver Antagonist und ein synthetisches Analogon von Capsaicin (Abbildung 9). Dieser hemmt die Capsaicin-induzierte Aktivierung von TRPV1, indem er selbst an der Agonistenbindungsstelle von TRPV1 bindet und den Kanal in einen nicht leitenden, geschlossenen Zustand versetzt (Bevan et al., 1992; zusammengefasst von Brito et al., 2014). Ein kompetitiver Antagonist konkurriert mit dem Agonisten um die Bindungsstelle am Rezeptor. Dabei wird die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung des Agonisten in Abhängigkeit der Konzentration des Antagonisten verschoben, sodass höhere Konzentrationen des Agonisten notwendig sind, um eine Bindung mit dem Rezeptor eingehen zu können (Hofmann, 2017). Als synthetisches Analogon von Capsaicin weisen die beiden Verbindungen eine ähnliche Halsgruppe auf, unterscheiden sich aber wesentlich in den Kopf- und Schwanzregionen (vgl. Abbildung 3) (Yang et al., 2015).

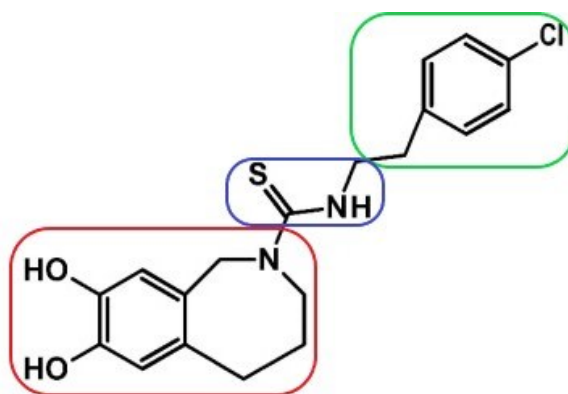


Abbildung 9: Strukturformel von Capsazepin ($C_{19}H_{21}ClN_2O_2S$). Bestehend aus dem 7,8-Dihydroxybenzazepin-Anteil („Kopf“, rot), Thioharnstoffderivat („Hals“, blau) und der Chlorophenylgruppe („Schwanz“, grün). (adaptiert nach: Mizogami & Tsuchiya, 2022)

Capsazepin interagiert ebenfalls mit der hydrophoben Tasche von TRPV1, induziert allerdings keine Kanalöffnung, was unter anderem auf die strukturellen Unterschiede der Kopfregion mit der substituierten Vanilloidgruppe zurückzuführen ist (zusammengefasst von Carnevale & Rohacs, 2016). Die genauen Mechanismen der Hemmung sind dennoch nicht vollständig verstanden (Gonzalez-Nilo et al., 2016).

AP-18 ((*NZ*)-*N*-[(*E*)-4-(4-chlorophenyl)-3-methylbut-3-en-2-ylidene]hydroxylamine) ist ein selektiver Antagonist von TRPA1, der die durch Zimtaldehyd induzierte Aktivierung von TRPA1 verhindert (Abbildung 10). Ebenso wie Zimtaldehyd interagiert AP-18 mit Aminosäureresten von TRPA1, allerdings ohne dabei eine Kanalöffnung zu induzieren (DeFalco et al., 2010; Petrus et al., 2007). AP-18 könnte auch als eine Art negativer allosterischer Modulator fungieren, da nicht alle Bindungsstellen mit denen der Agonisten übereinstimmen (zusammengefasst von Koivisto et al., 2014). AP-18 geht vermutlich auch keine Reaktionen mit Cysteinresten ein (B. Xiao et al., 2008). Somit kann AP-18 die Aktivierung von TRPA1 zwar blockieren, aber ein gewisser Grad an physiologischer Aktivität kann bestehen bleiben (zusammengefasst von Koivisto et al., 2022). Interessanterweise führen bereits leichte Veränderung an AP-18, wie die Deletion von Methylgruppen, zu einem Agonisten-Verhalten (DeFalco et al., 2010).

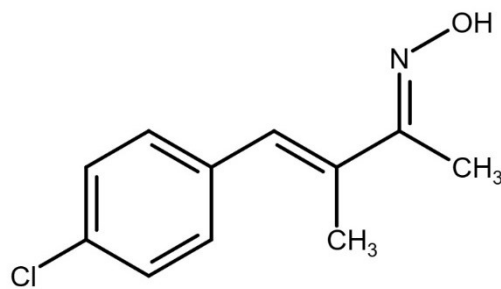


Abbildung 10: Strukturformel von AP-18 (C₁₁H₁₂ClNO).

2.5 TNF- α und IL-8 vermittelte Entzündungsreaktionen

Entzündungsreaktionen können durch verschiedene physikalische, chemische, und mechanische äußere Umwelteinflüsse sowie durch Infektionen mit Viren, Bakterien oder Parasiten ausgelöst werden. Das Ziel dieser ist es, den Organismus zu schützen, die Reizstoffe zu beseitigen und für eine Geweberegeneration zu sorgen (Ansorge & Täger, 2014; zusammengefasst von Zelová & Hošek, 2013). Makroskopisch sind Entzündungen durch Rötungen, Schwellungen, Temperaturerhöhung, Schmerzen und einen Funktionsverlust des Gewebes gekennzeichnet. Nach Auffassung der modernen Medizin sind Entzündungsreaktionen bei fast allen krankhaften Veränderungen involviert und damit ein zentrales Thema für die menschliche Gesundheit (Ansorge & Täger, 2014). Auf die Schädigung oder Reizung erfolgt

das Auslösen der unspezifischen, angeborenen Immunantwort, die zu den genannten makroskopischen Veränderungen führt, die Freisetzung verschiedener Hormone, Zytokine und Chemokine umfasst und schließlich die spezifische Immunantwort mit Beteiligung von T- und B-Zellen einleitet. Letztlich können die vermittelten immunologischen Abwehrmechanismen auch selbst zur Zerstörung und Schädigung der Zellen und des Gewebes beitragen (Ansorge & Träger, 2014). TNF- α spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese von entzündlichen Prozessen in der Haut, indem es die Genexpression verschiedener Mediatoren reguliert, wie die frühe Expression von *CXCL8*/IL-8 (Banno et al., 2004; Colombo et al., 2017). Interleukin-8 (IL-8) gehört zur Familie der CXC-Chemokine und wird über das *CXCL8*-Gen codiert (Heinrich, Haan et al. 2014). In Abwesenheit von Entzündungen ist IL-8 kaum im Gewebe nachweisbar, kann aber in Folge einer Entzündungsreaktion um das 100-Fache stromabwärts von proinflammatorischen Zytokinen, darunter IL-1, IL-6 und TNF- α , induziert werden (zusammengefasst von Hoffmann et al., 2002). Die Expression und Sekretion von *CXCL8*/IL-8 wurde in dieser Arbeit untersucht, um entzündliche Prozesse zu bewerten. Auf die Rolle dieser proinflammatorischen Zytokine an Entzündungsreaktionen wird im Folgenden eingegangen, bevor die Beteiligung von TRPV1 und TRPA1 an Entzündungsreaktionen erläutert wird.

TNF- α wird von verschiedenen Zellen exprimiert, darunter aktivierte Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten, Fibroblasten und Keratinozyten (zusammengefasst von Baud & Karin, 2001). Nach Bindung an die TNF- α Zelloberflächenrezeptoren (TNFR) 1 oder 2, werden spezifische Rezeptorkomplexe aktiviert (zusammengefasst von Baud & Karin, 2001). Über Ligandenbindung an TNFR wird die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, darunter NF- κ B und AP-1, induziert. Diese sind an der Genexpression von verschiedenen Mediatoren, darunter *CXCL8*/IL-8 beteiligt, die Prozesse des Zellwachstums, der Immunfunktionen und akuten sowie chronischen Entzündungen beeinflussen. Über TNFR1 kann zusätzlich die Aktivierung von Caspasen induziert werden, wodurch apoptotische Effekte vermittelt werden (Abbildung 11 a; Banno et al., 2004). In einer Übersichtsarbeit von Baud und Karin (2001) wurde berichtet, dass einige der induzierten Gene die Unterdrückung der TNF- α vermittelten Apoptose unterstützen, die insbesondere von NF- κ B abhängt, wodurch wiederum Entzündungsreaktionen verstärkt werden. Die Aktivität von AP-1 wird über Phosphorylierung durch verschiedene MAP-Kinasen, darunter JNK und p38, reguliert, während NF- κ B im nicht-stimulierten Zustand durch I κ B-Proteine im Zytoplasma gehemmt und zurückgehalten wird. Die Promotorregion von TNF- α enthält ebenfalls Bindungsstellen für NF- κ B

und AP-1, wodurch ein positiver Rückkopplungsmechanismus entsteht und zur Verstärkung der Entzündungsreaktionen beigetragen wird (zusammengefasst von Baud & Karin, 2001).

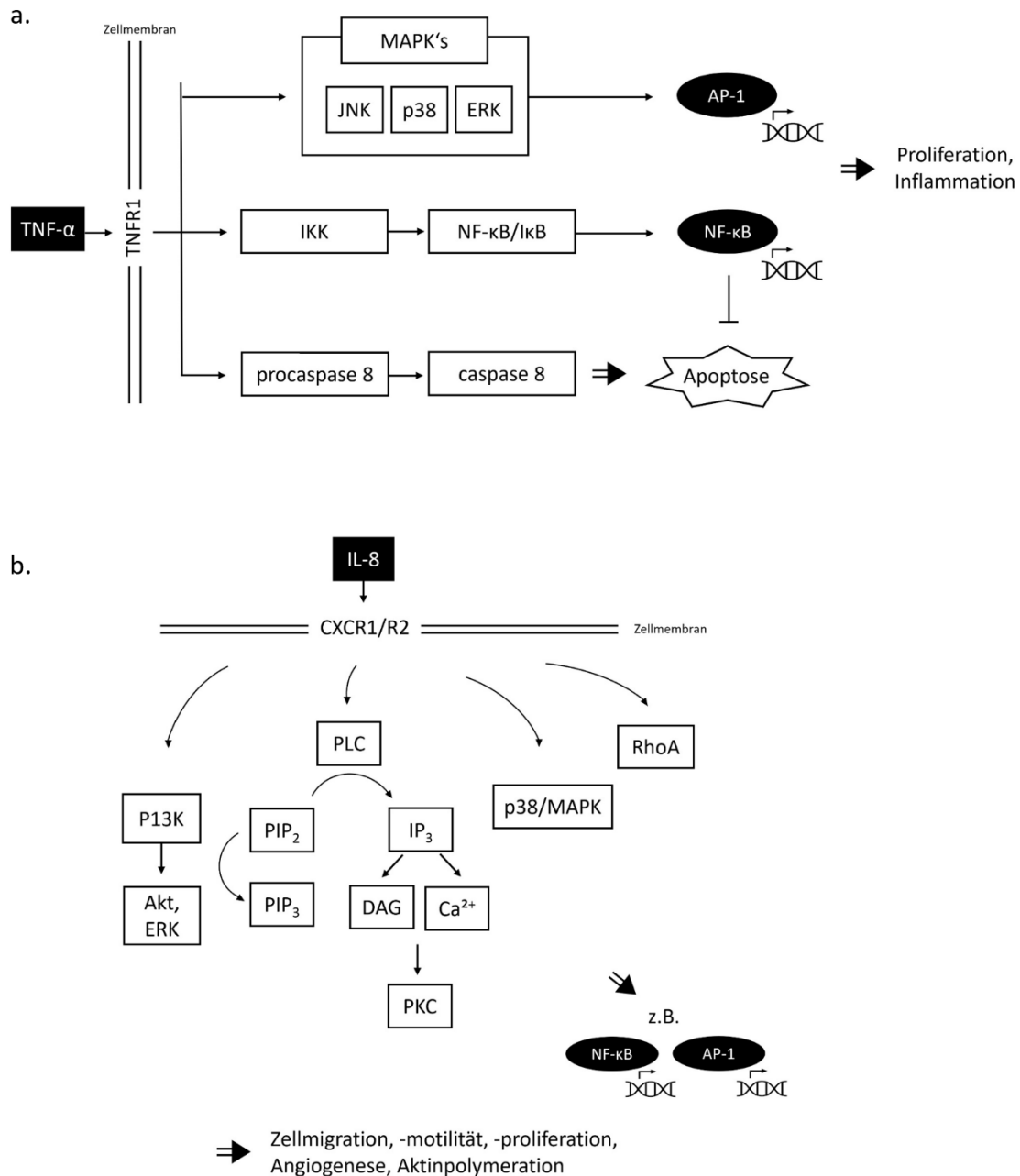


Abbildung 11: TNF- α Signalweg und IL-8 Signalweg. Vereinfachte Darstellung der stromabwärts vermittelten Signale von TNF- α (a) und IL-8 (b), die im Zusammenhang mit entzündlichen Reaktionen stehen. Erläuterungen siehe Text. (eigene Darstellung, a. adaptiert nach: Baud & Karin, 2001; b. adaptiert nach: Metzmaeckers et al. 2020; Waugh & Wilson, 2008)

Akt: Proteinkinase B; *AP-1*: Aktivator-Protein-1; *CXCR1/2*: G-protein-gekoppelter Chemokin Rezeptor 1/2; *DAG*: Diacylglycerin; *ERK*: extrazellulär Signal-regulierte Kinase; *IκB*: Inhibitor von NFκB; *IKK*: IκB-Kinase; *IP₃*: Inositol-1,4,5-Trisphosphat; *JNK*: c-Jun-N-terminale Kinase; *MAPK*: Mitogen aktivierte Proteinkinase; *NF-κB*: „nuclear factor kappa“ B; *P13K*: Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase; *PIP₂*: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; *PIP₃*: Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat; *PKC*: Proteinkinase C; *PLC*: Phospholipase C; *RhoA*: Ras homolog gene family, member A; *TNFR1*: TNF-Rezeptor Typ 1

Während proinflammatorischer Signalwege spielt IL-8 eine wichtige Rolle. Es ist an der Regulation von verschiedenen Transkriptionsfaktoren, Zellprozessen, der Apoptose, der Migration und Invasion und Entzündungszellen sowie der Angiogenese beteiligt (Heinrich, Haan et al. 2014; zusammengefasst von Waugh & Wilson, 2008). IL-8 stellt insbesondere einen potenten chemotaktischen Faktor für neutrophile Granulozyten dar, deren Rekrutierung ein Kennzeichen akuter Entzündungen ist. Neben Endothelzellen, Epithelzellen, Fibroblasten und Monozyten sind auch Keratinozyten an der Sezernierung von IL-8 beteiligt und tragen zur Migration von Neutrophilen und T-Lymphozyten in der Epidermis bei (Heinrich, Haan et al. 2014; zusammengefasst von Lowes et al., 2007).

Die IL-8 induzierten Signalwege werden über Bindung an die G-protein-gekoppelten Chemokin-Rezeptoren (CXCR) 1 und 2 vermittelt (Abbildung 11 b). Dies führt zur Aktivierung von Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K) und Phospholipasen, darunter PLC, sowie von PKC und MAP-Kinasen. Diese Signalwege induzieren die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und AP-1, beeinflussen die Proteintranslation und verschiedene Zellprozesse (zusammengefasst von Waugh & Wilson, 2008). Zudem werden G-Proteine wie RhoA aktiviert, die an der Organisation des Cytoskeletts und der Zellmigration beteiligt sind (Heinrich, Haan et al. 2014). Die aktivierte PI3-Kinase kann, über Phosphorylierung von PIP₂, die Bildung von PIP₃ induzieren, welches an der räumlichen Orientierung der Zellen entlang des chemotaktischen Gradienten und insbesondere der Zellgeschwindigkeit beteiligt ist (Hoeller & Kay, 2007; zusammengefasst von Rohacs, 2015; Wu, 2005). Außerdem resultiert eine PLC-abhängige Hydrolyse von PIP₂ in der Bildung von DAG und IP₃, wodurch die intrazelluläre Freisetzung von Ca²⁺ aus dem endoplasmatischen Retikulum erfolgt sowie PKC aktiviert wird (Heinrich, Haan et al. 2014). Die rekrutierten Immunzellen wandern entlang eines IL-8 induzierten Gradienten zur Stelle der Entzündung bzw. der Gewebeschädigung, wo sie verschiedene Aufgaben zur Abwehr körperfremder Materialien sowie zur Entsorgung geschädigter, abgestorbener Zellen übernehmen können (Heinrich, Haan et al. 2014).

IL-8 ist wesentlich an der Heilung akuter Wunden und beim Beginn der Entzündungsreaktionen beteiligt, indem es als pro-angiogenes Molekül die Neubildung von Blutgefäßen sowie den Migrations- und Proliferationsprozess von Keratinozyten und anderen beteiligten Zellen fördert. Im späteren Verlauf der Wundheilung, wenn der Umbau und die Neustrukturierung des Gewebes stattfinden, ist hingegen eine Unterdrückung der Gefäßneubildung erforderlich, um beispielsweise Blutgerinnsel zu vermeiden und die Narbenbildung zu unterstützen. In dieser Phase werden vor allem CXCL10 und CXCL11 von basalen

Keratinocyten exprimiert und die Freisetzung von IL-8 unterdrückt. Eine exakte Regulation der Freisetzung von Chemokinen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren ist damit unerlässlich, um den Wundheilungsprozesse zielführend ablaufen zu lassen und die Funktionen der Haut aufrechterhalten zu können (zusammengefasst von Ridiandries et al., 2018).

Dysregulationen der induzierten Signalwege können in einer erhöhten Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemolockstoffen resultieren und damit die Aktivierung von Neutrophilen sowie den Entzündungsprozess aufrechterhalten (zusammengefasst von Raziyeve et al., 2021; Ridiandries et al., 2018). Letztlich können TNF- α und IL-8 auf diese Weise an der Pathogenese verschiedener chronischer Erkrankungen beteiligt sein (zusammengefasst von Lowes et al., 2007; Park et al., 2010). Patienten mit chronischen diabetischen Wunden weisen beispielsweise eine erhöhte Expression von IL-8 auf (zusammengefasst von Ridiandries et al., 2018). Ebenso können Hauterkrankungen wie atopische Dermatitis oder Psoriasis auftreten, die zu den häufigsten chronisch entzündlichen Hauterkrankungen zählen und mit einer erhöhten Expression von TNF- α und IL-8 sowie einer Infiltration von Entzündungszellen einhergehen (zusammengefasst von Cibrian et al. 2020; Lowes et al., 2007). Es ist bekannt, dass Entzündungsreaktionen im Zusammenhang mit dem metabolischen Syndrom stehen und Störungen des Fett- und Glukosestoffwechsels induzieren können (zusammengefasst von Popa et al., 2007). Psoriasis weist eine Prävalenz von 2-3 % in der weltweiten Bevölkerung auf (zusammengefasst von Cibrian et al. 2020). Sie ist durch eine Hyperproliferation und aberrante Differenzierung von Keratinocyten gekennzeichnet, die sich als gerötete, schuppige, erhabene Plaques äußern (zusammengefasst von Lowes et al., 2007). Zahlreiche Interleukine sind an der Pathogenese von Psoriasis beteiligt, IL-8 unterstützt dabei insbesondere eine beschleunigte Angiogenese, Rekrutierung von Neutrophilen und Proliferation von Keratinocyten (Tsai & Tsai, 2017). Derartige Prozesse der Hyperproliferation und Zellrekrutierung setzten eine erhöhte Nährstoffversorgung voraus, sodass die Expression von Glukose- und Aminosäuretransporten in Keratinocyten angeregt ist (zusammengefasst von Cibrian et al. 2020). Neben erhöhten Zytokinspiegeln korrelieren erhöhte Spiegel von Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin und Triglyceriden im Blut sowie in der Epidermis mit dem Schweregrad von Psoriasis (zusammengefasst von Pietrzak et al., 2010). Daneben wurden, sowohl bei Patienten mit atopischer Dermatitis als auch mit Psoriasis, erhöhte Spiegel von zirkulierenden Aminosäuren und Metaboliten des Glykolyseweges beobachtet (zusammengefasst von Cibrian et al. 2020). Chronische Wirkungen von Entzündungsmediatoren wie TNF- α können damit zu veränderten Stoffwechselprozessen beitragen (zusammengefasst von Popa et al., 2007). Über die Induktion der verschiedenen Immun-

und Entzündungsreaktionen kann Psoriasis mit Komorbiditäten auftreten wie kardiovaskulären Erkrankungen, Arthritis, entzündlichen Darmerkrankungen, Adipositas und Diabetes mellitus (zusammengefasst von Gisondi et al., 2020; Lowes et al., 2007). Atopische Dermatitis geht ebenso mit einer Dysregulation des Immunsystems einher. Eine erhöhte Infiltration von TH2-Zellen vermittelt die Produktion von IgE und trägt zur Expression von Entzündungsmediatoren bei (Wollenberg, 2008). Erhöhte Spiegel von IL-8 im Serum und in der Haut korrelieren dabei mit dem Schweregrad der Erkrankung (Amarbayasgalan et al. 2013). Unter anderem kann atopische Dermatitis von einer IgE-vermittelten Nahrungsmittelallergie begleitet werden, die Auslöser für Ekzeme sein kann und wiederum zu einer erhöhten Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen beiträgt (Heratizadeh et al., 2011).

Insgesamt besteht eine komplexe Kommunikation zwischen Keratinozyten und Immunzellen, die durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus in der Freisetzung von verschiedenen Entzündungsmediatoren und Chemokinen resultiert, wodurch auch Keratinozyten als aktive Akteure bei Entzündungsreaktionen auftreten (zusammengefasst von Lowes et al., 2007; Southall et al., 2003).

2.6 Die Rolle von TRPV1 und TRPA1 bei Entzündungen

Aufgrund der weiten Verbreitung von TRPV1 und TRPA1 in verschiedenen Zelltypen, inklusive Immunzellen, neuronalen Zellen und nicht-neuronalen Zellen wie Keratinozyten sowie ihrer außerordentlich hohen Selektivität, nehmen sie eine wichtige Rolle bei pathologischen Prozessen ein, sind an der Zellkommunikation mit immunologischen Systemen sowie an verschiedenen Entzündungsreaktionen beteiligt (zusammengefasst von Khalil et al., 2018; Silverman et al., 2020). Das Expressionsniveau der Kanäle kann dabei unter Entzündungsreaktionen verändert sein (zusammengefasst von Alawi & Keeble, 2010; Luostarinen et al., 2021).

Insbesondere im Rahmen von neurogener Entzündung ist die Rolle von TRPV1 bzw. TRPA1 etabliert, welche in einer Übersichtsarbeit von Gouin et al. (2017) zusammengefasst wurde. Die Aktivierung von TRP-Kanälen durch exogene Reize oder Hautverletzungen führt zum Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Dies resultiert in einer übermäßigen Freisetzung von Neuropeptiden (z.B. Substanz P und CGRP) und der Expression von Genen, die

für entzündungsfördernde Zytokine codieren wie IL-8, TNF- α , Matrix-Metalloproteinasen und Prostaglandinen. Dabei trägt die nicht-neuronale Expression der beiden Kanäle, auf beispielsweise Keratinozyten, zur Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration und Verstärkung der Entzündungsreaktionen bei, wodurch die Hauthomöostase, Differenzierung und weitere Immunfunktionen beeinflusst werden. Auf diese Weise kann die Aktivierung von TRPA1 in Keratinozyten zur Expression von IL-1 α , IL-1 β und PGE2 beitragen, die wesentlich an der Vermittlung von Juckreiz beteiligt sind (zusammengefasst von Gouin et al., 2017). Die neurogene Entzündung äußert sich schließlich in der Haut als Überempfindlichkeit und erhöhte Schmerzreaktion, führt zu Erythemen, Schwellungen, Hautverdickungen und trägt zu chronisch entzündlichen Hauterkrankungen bei wie Psoriasis, atopischer Dermatitis, Juckreiz und Rosazea, die häufig durch eine erhöhte Expression von peptidhaltigen Nervenfasern gekennzeichnet sind (zusammengefasst von Gouin et al., 2017; Marek-Jozefowicz et al. 2023). Die in Folge der Gewebeschädigung freigesetzten endogenen Neuropeptide und Mediatoren (z.B. Histamin, ATP, Bradykinin, NGF) können wiederum die Aktivierung von TRPV1 und TRPA1 über GPCR vermittelte Phosphorylierungen unterstützen (siehe Kapitel 2.4.1 und 2.4.2), wodurch ein positiver Rückkopplungsmechanismus entsteht. Letztlich können Entzündungsmediatoren über derartige intrazelluläre Sensibilisierungsmechanismen auch die Kanaldesensibilisierung beeinträchtigen und chronische Entzündungsreaktionen zusätzlich verstärken (zusammengefasst von Gouin et al., 2017). Damit besteht eine enge Kommunikation zwischen Keratinozyten, Immunzellen und den TRP-Kanälen (zusammengefasst von Gouin et al., 2017; Marek-Jozefowicz et al. 2023).

Die Rolle von TRPV1 und TRPA1 an verschiedenen schmerz- und entzündungsassoziierten Erkrankungen erweist sich als außerordentlich komplex (zusammengefasst von Alawi & Keeble, 2010; Silverman et al., 2020). In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass pathologische Zustände wie diabetische Neuropathie (Hong & Wiley, 2005; Pabbidi & Premkumar, 2017), periphere neuropathische Schmerzen (zusammengefasst von Iftinca et al., 2021), arthritische Erkrankungen (Chakrabarti et al., 2018; Engler et al., 2007; Morgan et al., 2019), Atemwegserkrankungen (Guan et al., 2021; J. Li et al., 2019; McGarvey et al., 2014) sowie Erkrankungen des Magen-Darm-Trakts (Lapointe et al., 2015; Matthews et al., 2004; Ustaoglu et al., 2021) mit der Expression von TRPV1 im Zusammenhang stehen, diese erhöht ist und unter anderem mit Hyperalgesie und Allodynie einhergehen (zusammengefasst von Alawi & Keeble, 2010, Silverman et al., 2020). Diese Beobachtungen führten zu Bemühungen, Antagonisten von TRPV1 als Behandlung von entzündlichen Zuständen zu

erforschen, wobei zum Teil überraschenderweise gegenteilige Effekte bewirkt wurden (zusammengefasst von Alawi & Keeble, 2010; Silverman et al., 2020). TRPV1 wurde traditionell als „pathologischer“ Rezeptor angesehen und Capsaicin aufgrund der algogenen Wirkung als Werkzeug benutzt, um grundlegende Mechanismen bei der Vermittlung von Schmerzen aufzudecken. Mittlerweile steigt das Interesse gegenüber Capsaicin als schmerz- und entzündungslinderndes Mittel (zusammengefasst von Alawi & Keeble, 2010; Arora et al., 2021).

Antiinflammatorische und protektive Effekte von TRPV1 wurden - hauptsächlich basierend auf Tierstudien - beispielsweise bei Erkrankungen des Magen-Darm-Trakts (Gao et al., 2020; Massa et al., 2006; Vinuesa et al., 2012; Zhang et al., 2022), des Herz-Kreislauf-Systems (Wang et al., 2017; Zhong et al., 2020), in Bezug auf Hypertonie und Adipositas (L. Li et al., 2022), bei arthritischen Erkrankungen (Lv et al., 2022), Insulinsresistenz (Tang & Fan, 2019) oder entzündlichen Hauterkrankungen wie allergische Kontaktdermatitis (Bánvölgyi et al., 2005) festgestellt. Bezüglich entzündlicher Hauterkrankungen wurden protektive Effekte sowohl über die Aktivierung als auch die Blockade von TRPV1 vermittelt - je nach Art der Erkrankung, beteiligten Zell- und Gewebetypen (zusammengefasst von T. Xiao et al., 2023). Die antiinflammatorischen Wirkungen wurden unter anderem daraus abgeleitet, dass eine Deletion von TRPV1 bzw. eine verringerte Expression mit dem Auftreten und der Schwere der Erkrankungen assoziiert war (zusammengefasst von Alawi & Keeble, 2010; Bagood & Isseroff, 2021). TRPV1 Agonisten werden scheinbar paradoxerweise als juckreiz- und schmerzlindernde Mittel verwendet, um beispielweise neuropathische und osteoarthritische Schmerzen zu therapieren. In diesem Fall wird die Wirkung auf die Desensibilisierung und Defunktionalisierung (siehe spätere Erläuterungen in Kapitel 7.4.1.1) von TRPV1 exprimierenden Neuronen zurückgeführt (zusammengefasst von Iftinca et al., 2021).

Insbesondere TRPA1 wird eine tragende Rolle bei akuten und chronischen Schmerzen sowie Entzündungsreaktionen zugeschrieben, indem dieser Kanal sowohl unter Entzündungsreaktionen hochreguliert ist als auch selbst an der Expression von Entzündungsmediatoren und zur Aufrechterhaltung von Entzündungsreaktionen beteiligt ist (zusammengefasst von Bautista et al., 2013; Talavera et al., 2020). Proinflammatorische Wirkungen wurden unter anderem in Bezug auf diabetische Neuropathie (Koivisto & Pertovaara, 2013), Migräne (Demartini et al., 2017; Jiang et al., 2018), Atemwegserkrankungen wie Asthma (Mukhopadhyay et al., 2011), Osteoarthritis und andere Gelenkentzündungen (Moilanen et al., 2015), entzündliche Darmerkrankungen (Engel et al., 2011) sowie allergische Kontaktdermatitis (Kang et al., 2017) beschrieben (zusammengefasst von Bautista et al., 2013; Talavera et al.,

2020). Ebenso wurde TRPA1 eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese von histamin-unabhängigem Juckreiz zugeschrieben. Bei Studien an Mäusen mit atopischer Dermatitis wurde gezeigt, dass ein Knock-Out von TRPA1 mit einem verminderten Kratzverhalten einherging (B. Liu et al., 2013). Eine erhöhte Genexpression des Kanals korrelierte wiederum mit der Juckreizintensität (Nattkemper et al., 2018). Bei HaCaT-Zellen wurde außerdem durch die Verwendung von Medikamenten, die zur Behandlung von Hautentzündungen eingesetzt werden, wie Calcineurin-Inhibitoren (z.B. Ciclosporin, Tacrolimus) oder dem Glukokortikoid Dexamethason, eine signifikante Reduktion der TNF- α induzierten Hochregulation von TRPA1 festgestellt, die mit den antiinflammatorischen Wirkungen dieser Medikamente einhergehen könnte (Luostarinen et al., 2021). Zimtaldehyd, der beschriebene Agonist von TRPA1, gilt als Kontaktallergen bzw. Hapten und ist Bestandteil von Duftmischungen, die für Standard Epikutantests bei Patienten mit Ekzemen oder entzündlichen Dermatosen eingesetzt werden. Entsprechend kann Zimtaldehyd als Mitursache oder Ursache von entzündlichen Hauterkrankungen und allergischer Kontaktdermatitis diagnostiziert werden (Wilkinson et al., 2019). Bei der allergischen Kontaktdermatitis handelt es sich um eine T-Zell-vermittelte Typ 4 Reaktion des Immunsystems. Die Sensibilisierung erfolgt über Bindung des Haptens an Hautproteine, wodurch ein immunologischer Komplex entsteht, der zur Aktivierung von T-Zellen und schließlich zur Zytokinfreisetzung führt. Nach erneutem Kontakt mit dem Allergen kommt es zur Ausbildung einer Dermatitis, die Juckreiz, Schwellungen, Rötungen, die Bildung von Vesikeln und Schuppungen der Haut aufweist (Brar 2021). Im Gegensatz dazu wurde Zimtaldehyd auch über TRPA1-vermittelte Signalwege mit positiven Wirkungen auf adipöse und diabetische Zustände in Verbindung gebracht (Hoi et al., 2020; Legrand et al., 2020).

Ob und wie antiinflammatorische Wirkungen der TRP-Kanäle, insbesondere von TRPV1, über eine erhöhte Freisetzung von antiinflammatorischen Neuropeptiden (z.B. Somatostatin) unterstützt werden oder gar die entzündungsfördernden Neuropeptide an der Auflösung der Entzündung und der antiinflammatorischen Wirkungen beteiligt sind, bleibt schwer zu klären und führte zu paradoxen Ergebnissen (zusammengefasst von Alawi & Keeble, 2010). Viele Studien haben sich diesbezüglich auf die neuronale Expression von TRP-Kanälen beschränkt. Allerdings könnte auch die Rolle von nicht-neuronal exprimierten TRP-Kanälen an diesen Reaktionen entscheidend sein und verschiedene inflammatorische Signalwege beeinflussen (zusammengefasst von Khalil et al., 2018). Beispielsweise sind viele Erkrankungen, bei denen TRPV1 mit antiinflammatorischen Wirkungen verbunden ist, nicht direkt mit

Schmerzen assoziiert, wodurch die nicht-neuronale Expression in den Vordergrund rückt (zusammengefasst von Alawi & Keeble, 2010). Insgesamt besteht ein großes Interesse daran, die Funktionen und die Beteiligung von TRPV1 und TRPA1 bei entzündlichen Reaktionen genauer zu erforschen und so möglicherweise bestimmte TRP-Modulatoren therapeutisch nutzen zu können (zusammengefasst von Alawi & Keeble, 2010; Chen & Hackos, 2015). In dieser Arbeit wird sich auf die nicht-neuronale Expression der beiden Kanäle fokussiert.

2.7 Humane Keratinozyten als Zellmodell

Um die Beteiligung von TRPV1 und TRPA1 bei entzündlichen Prozessen in nicht-neuronalen Hautzellen zu untersuchen, wurde die HaCaT-Zelllinie („Human adult low Calcium high Temperature“) verwendet. Dabei handelt es sich um eine spontan immortalisierte humane Zelllinie aus Keratinozyten, die ursprünglich aus einem Melanom der oberen Rückenhaut eines 62-jährigen männlichen Patienten isoliert wurde. Ein langfristiges Wachstum dieser Zellen in Primärkultur erwies sich bei erhöhter Temperatur (38,5°C) und unter niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen als optimal (Boukamp et al., 1988). Keratinozyten sind der häufigste Zelltyp der Epidermis, die sich wiederum in verschiedene Schichten aus Keratinozyten einteilen lässt (zusammengefasst von Proksch et al., 2008). Die äußerste Schicht ist das sogenannte *Stratum corneum*, darauf folgen das *Stratum lucidum* (in der Regel nur in der Leistenhaut), *Stratum granulosum*, *Stratum spinosum* und *Stratum basale* (Abbildung 12).

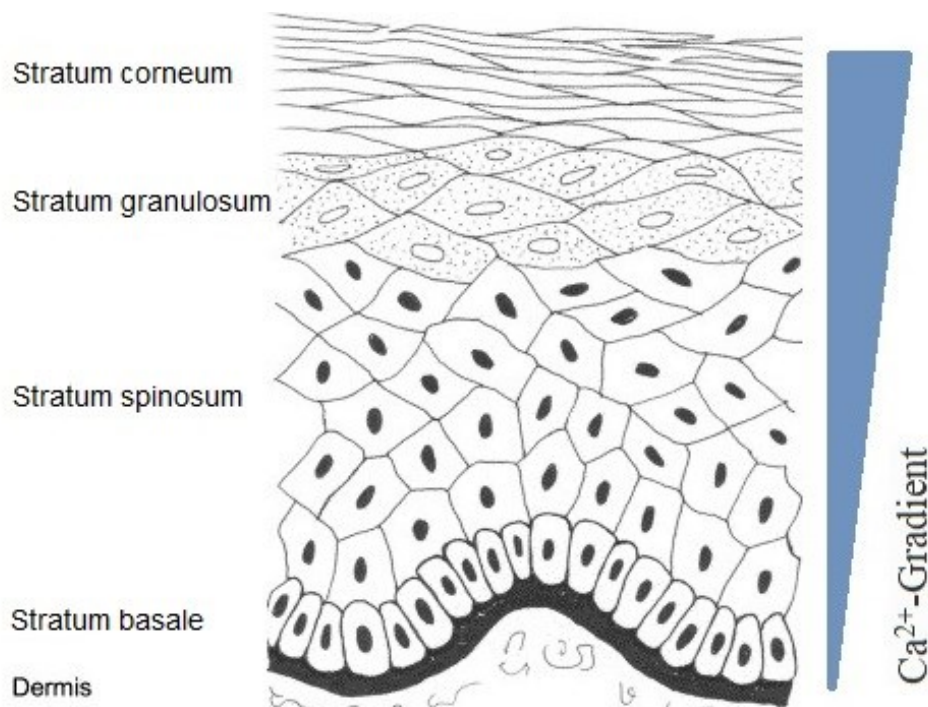


Abbildung 12: Struktur der Epidermis mit den verschiedenen Schichten an Keratinozyten. Bestehend aus *Stratum corneum*, *Stratum granulosum*, *Stratum spinosum* und *Stratum basale*. Proliferierende Keratinozyten im *Stratum basale* weisen eine säulenartige Struktur auf. Mit Beginn des Differenzierungsprozesses verändern Keratinozyten beim Übergang in die unterschiedlichen Schichten ihre Gestalt. Im *Stratum corneum* sind die Keratinozyten zu abgeflachten, kernlosen Zellen differenziert (Korneozyten), die abgetragen und durch neue Zellen der unteren Epidermisschichten ersetzt werden. Calcium dient als ein Initiator der Differenzierung, wodurch ein Calcium-Gradient in der Epidermis gebildet wird und die Konzentration an Calciumionen mit steigender Entfernung zur Dermis zunimmt. (Text zusammengefasst von Blaydon & Kelsell, 2014; Bild adaptiert nach: Wickett & Visscher, 2006)

Um die Barrierefunktion aufrecht zu erhalten, unterliegen die Keratinozyten einem ständigen Differenzierungsprozess, bei dem sich die Zellen von proliferierten kernhaltigen Keratinozyten in der Basalschicht, zu verhornten abgestorbenen Korneozyten im Stratum corneum ausdifferenzieren (zusammengefasst von Blaydon & Kelsell, 2014). Keratin und Filaggrin stellen die Hauptproteinmasse der Epidermis dar und werden in charakteristischen Mustern während der Zellreifung synthetisiert (zusammengefasst von Baroni et al., 2012; X. Zhang et al., 2019). Auslöser der Keratinozytendifferenzierung ist - neben der Zelldichte - Calcium. In der Epidermis existiert ein Ca^{2+} -Gradient, wobei basale Keratinozyten einer niedrigen Konzentration an Ca^{2+} ausgesetzt sind. In Richtung suprabasaler Keratinozyten steigt die Konzentration an und sorgt für einen differenzierten Zustand der Keratinozyten (Deyrieux & Wilson, 2007; van Wilson, 2013). Calciumionen sind demnach wichtige Regulatoren in der Epidermis, die an der Hautbarriere, der Differenzierung sowie der Proteinsynthese beteiligt sind (zusammengefasst von Baroni et al., 2012).

Die strukturellen Eigenschaften des *Stratum corneums*, bestehend aus abgestorbenen verhornten Keratinozyten (Korneozyten), die eine Art Polymerschicht mit Lipiden bilden, sorgen in erster Linie für eine wirksame Barriere gegen das Eindringen von Fremdstoffen und verhindern einen unerwünschten Wasserverlust (zusammengefasst von Blaydon & Kelsell, 2014; Murata et al., 2022). Daneben sind zahlreiche Zell-Zell-Verbindungen wesentlich an der Barrierefunktion beteiligt, wie die Tight Junctions Proteine Occludin und Claudin, die einen parazellulären Transport verhindern. Weitere Adhärenzverbindungen sowie Desmosomen verleihen der Epidermis Stabilität und stellen eine Verbindung zum Zytoskelett her (zusammengefasst von Blaydon & Kelsell, 2014). Um die Barrierefunktion aufrecht zu erhalten, unterliegen die Keratinozyten einem ständigen Differenzierungsprozess, bei dem sich die Zellen von proliferierten kernhaltigen Keratinozyten in der Basalschicht, zu verhornten abgestorbenen Korneozyten im *Stratum corneum* ausdifferenzieren (Abbildung 12; zusammengefasst von Blaydon & Kelsell, 2014). Keratin und Filaggrin stellen die Hauptproteinmasse der Epidermis dar und werden in charakteristischen Mustern während der Zellreifung synthetisiert (zusammengefasst von Baroni et al., 2012; X. Zhang et al., 2019). Auslöser der Keratinozytendifferenzierung ist - neben der Zelldichte - Calcium. In der Epidermis existiert ein Ca^{2+} -Gradient, wobei basale Keratinozyten einer niedrigen Konzentration an Ca^{2+} ausgesetzt sind. In Richtung suprabasaler Keratinozyten steigt die Konzentration an und sorgt für einen differenzierten Zustand der Keratinozyten (Deyrieux & Wilson, 2007; van Wilson, 2013). Calciumionen sind demnach wichtige Regulatoren in der Epidermis, die

an der Hautbarriere, der Differenzierung sowie der Proteinsynthese beteiligt sind (zusammengefasst von Baroni et al., 2012).

Normalerweise besteht in der Epidermis ein Gleichgewicht zwischen der Proliferation und der Abschuppung der obersten verhornten Hautschicht, wodurch im Schnitt alle 28 Tage eine Erneuerung der Epidermis erfolgt. Im *Stratum granulosum* ist Profilaggrin, als Vorstufe von Filaggrin, an der Aggregation von Keratin-Filamenten zu engen Bündeln beteiligt, wodurch schließlich die charakteristischen Korneozyten durch einen Zusammenfall der Zellen entstehen (zusammengefasst von Baroni et al., 2012; Proksch et al., 2008). Bei einigen Hauterkrankungen ist dieses Gleichgewicht und die Keratinozytendifferenzierung gestört (zusammengefasst von Baroni et al., 2012). Psoriasis äußert sich daraufhin in einer erhöhten Proliferationsrate, wobei die Epidermis im Gegensatz zum normalen Erscheinungsbild der Haut eine deutliche Verdickung aufweist. Zusätzlich sind die Veränderungen durch epidermale Reten gekennzeichnet, die als wellenartige Fortsätze in die Dermis reinragen, während die kernhaltigen Schichten reduziert oder gar nicht vorhanden sind. Dies hat zur Folge, dass sich nicht vollständig differenzierte Keratinozyten im *Stratum corneum* ansammeln und damit die Schutzbarriere der Epidermis wesentlich beeinträchtigt wird (zusammengefasst von Lowes et al., 2007). Ebenso ist bei atopischer Dermatitis die Barrierefunktion der Haut beeinträchtigt, wodurch das Eindringen von Allergenen bzw. Sensibilisatoren begünstigt wird. Dies resultiert aus einem Mangel an Filaggrin, einer erhöhten Protease-Aktivität und einer Imbalance sowie einem Mangel von intrazellulären Lipiden im *Stratum corneum*, wodurch der Wasserverlust begünstigt wird und sich als charakteristisches Erscheinungsbild der „trockenen Haut“ und Mikrofissuren äußert (Wollenberg, 2008).

HaCaT-Zellen sind aufgrund ihrer einfachen Vermehrung ein weit verbreitetes Keratinozyten-Zellmodell. Änderungen der Calciumkonzentration des Zellkulturmediums ermöglichen einen Wechsel zwischen basalen und differenzierten Zuständen (Boukamp et al., 1988; Deyrieux & Wilson, 2007). Es wurde berichtet, dass HaCaT-Zellen im basalen Zustand - verglichen zum differenzierten - eine erhöhte Fähigkeit zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie IL-8 aufweisen (Colombo et al., 2017).

HaCaT-Zellen besitzen ein theoretisch unbegrenztes Wachstumspotential, wobei sie nicht-tumorigen sind und normale Morphogenese- und Differenzierungsmerkmale aufweisen. In vivo bilden sie nach Transplantation wieder eine normale Struktur der Epidermis aus (Boukamp et al., 1988; Deyrieux & Wilson, 2007).

3 Zielsetzung und Hypothesen

Die Aktivierungs- und Regulationsmechanismen von TRPV1 und TRPA1 sowie ihre Beteiligung an verschiedenen physiologischen Prozessen sind komplex (zusammengefasst von Alawi & Keeble, 2010; Khalil et al., 2018). TRPV1 und TRPA1 werden von einer Reihe von Entzündungsmediatoren sensibilisiert und sind teilweise selbst direkt oder indirekt an der Freisetzung von Entzündungsmediatoren beteiligt (zusammengefasst von Bautista et al., 2013). Ihre Expression wurde in Zusammenhang mit verschiedenen entzündlichen Prozessen gestellt, darunter schmerz- und juckreizassoziierte entzündliche Hauterkrankungen wie Psoriasis und atopische Dermatitis (zusammengefasst von Bautista et al., 2013; Silverman et al., 2020). Antagonisten der Kanäle standen dabei als potenzielle analgetische Wirkstoffe im Fokus vieler Arbeiten (zusammengefasst von Alawi & Keeble, 2010; Khalil et al., 2018). Dennoch wurde auch Capsaicin, als Agonist von TRPV1, scheinbar paradoxerweise als analgetisches Mittel für einige schmerzassoziierte Erkrankungen eingesetzt, obwohl es gleichzeitig starke Hautirritationen auslösen kann, die mit dem typischen brennenden Gefühl einhergehen, welches ebenfalls beim Verzehr von Chilischoten, die als Hauptbestandteil Capsaicin enthalten, auftritt (zusammengefasst von Arora et al., 2021).

Die nicht-neuronale Expression der TRP-Kanäle ist diesbezüglich weniger gut untersucht und ihre Rolle bezüglich pro- oder antiinflammatorischer Wirkungen bei verschiedenen Zuständen im Körper ist nicht eindeutig geklärt. Um diese in epidermalen Keratinozyten zu untersuchen, wurden HaCaT-Zellen mit ausgewählten Agonisten und Antagonisten von TRPV1 und TRPA1 behandelt. Dabei wurde ein Entzündungsmodell durch die Gabe von TNF- α erzeugt, welches stromabwärts die Expression und Freisetzung von IL-8 in diesen Keratinozyten vermittelt. TNF- α und IL-8 sind wesentlich an der Vermittlung und Entstehung von Entzündungen, darunter Hautentzündungen, beteiligt (zusammengefasst von Lowes et al., 2007; Park et al., 2010). In dieser Arbeit wird das Zellmodell aus basalen Keratinozyten bestehen. Dabei werden die Hypothesen aufgestellt, dass die Aktivierung von TRPV1 durch seinen spezifischen Agonisten Capsaicin, die Entzündungsreaktionen auf das proinflammatorische Zytokin TNF- α in diesem Zellmodell abschwächt. Und auf der anderen Seite, die Aktivierung von TRPA1 durch seinen spezifischen Agonisten Zimtaldehyd, die Entzündungsreaktionen entsprechend fördert.

Um diese Hypothesen zu testen, wurden HaCaT-Zellen zunächst für 24 h mit den jeweiligen Agonisten und Antagonisten allein bzw. in Kombination und anschließend erneut für 6 h

bzw. 48 h mit oder ohne TNF- α behandelt. Danach wurde die Genexpression von *CXCL8*, *TRPV1* und *TRPA1* aus dem isolierten Zellmaterial der behandelten Zellen mittels RT-qPCR gemessen. Die von den Zellen sezernierte Menge an IL-8 wurde mittels ELISA im Zellkulturüberstand ermittelt. Mithilfe dieser Daten soll die Rolle der Modulation der TRP-Kanäle bezüglich pro- und antiinflammatorischer Wirkungen ermittelt und anschließend diskutiert werden. Die kombinierte Behandlung aus Agonisten und Antagonisten dient dazu, um Rückschlüsse treffen zu können, ob die inflammatorischen Wirkungen von Capsaicin bzw. Zimtaldehyd über TRPV1 bzw. TRPA1 vermittelt werden. MTT-Tests wurden im Vorhinein durchgeführt, um geeignete Konzentrationen von TNF- α sowie den jeweiligen Agonisten und Antagonisten zu eruieren. Zusätzlich wurde die Genexpression von *CXCL8*, *TRPV1* und *TRPA1* sowie die Sekretion von IL-8 in Reaktion auf unterschiedliche Dosen und Zeitpunkte von TNF- α untersucht, um im Vorfeld eine geeignete Behandlungsdosis und -dauer von TNF- α zu ermitteln.

4 Material

4.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Auflistung der Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Einmalkanüle, Sterican® Standardkanülen, Gr. 2, steril	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Einmalspritze, Injekt® Solo, steril (2 mL)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Laborhandschuhe, XCEED® Nitril-Schutzhandschuhe	STARLAB INTERNATIONAL GmbH, Hamburg, DE
Mehrkanalpipette (300 µL)	STARLAB INTERNATIONAL GmbH, Hamburg, DE
Mikrozentrifugenröhrchen, TubeOne®, RNase-frei, DNase-frei, DNA-frei (1,5 mL)	STARLAB INTERNATIONAL GmbH, Hamburg, DE
optische Versiegelungsfolie, Opti-Seal	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Olden- dorf, DE
Pasteurpipette, ohne Wattestopfen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
PCR Platte, 96-Well, farblos, "Fast" Typ (Semi Sub Skirt, Low Profile, Eckschnitt A1)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Olden- dorf, DE
PCR Platte, Multiplate™ 96-Well, low profile, unskirted	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, US
Pipettenspitzen, Filterspitzen TipOne® (10 µL; 100 µL; 200 µL; 300 µL; 1000 µL)	STARLAB INTERNATIONAL GmbH, Hamburg, DE
Präzisionswischtücher, Kimtech® Science	Kimtech, KIMBERLY-CLARK PROFES- SIONAL, Dallas, US
Reaktionsgefäß (1,5 mL)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
ROTILABO®-Spritzenfilter, PVDF, steril (Porengröße 0,22µm; Ø Membran 30mm)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Schraubröhre, steril (15 mL; 50 mL)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Serologische Pipetten, steril (5 mL; 10 mL; 25 mL; 50 mL)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Zellkulturplatte, steril, Standard F (6-Well; 12-Well; 24-Well; 96-Well)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Tücher, Rotizell®-Tissue	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Zellkulturflasche, steril (T25; T75; T175)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE

4.2 Gegenstände und Geräte

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Gegenstände und Geräte

Gegenstände und Geräte	Hersteller
C-1000 Touch™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, US
CO ₂ Inkubator	BINDER GmbH, Tuttlingen, DE
Elektrische Mehrkanalpipette, Xplorer, 8-Kanalpipette	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Elektrische Pipettierhilfe, PIPETBOY acu 2	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, CH
Hochgeschwindigkeits-Tischzentrifuge, Centrifuge 5804 R	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Mikroliterpipette, Research plus® (0,1 – 2,5 µL; 0,5 – 10µL; 2 – 20 µL; 10 – 100 µL; 20 – 200 µL; 100 – 1000 µL)	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank, MSC Advantage 1.2	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Mikroplattenschüttler	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Mikroskop, IT400 Trino	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Mikrovolumen-Spektralphotometer, NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Mikrozentrifuge, Centrifuge 5418 R	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Mikrozentrifuge, PerfectSpin Mini	PEQLAB, VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Minitaumelmischer	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Präzisionswaage, Entris 224I-1S	Satorius AG, Göttingen, DE
Spark® Multimode Mikroplatten-Reader	Tecan Group AG, Männedorf, CH
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, US
Tecan NanoQuant® Platte	Tecan Group AG, Männedorf, CH
Vakuumzentrifuge, Concentrator 5301	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Vortexer, RS-VA 10	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, DE
Wasseraufbereitungsanlage, Reinstwassersystem, arium pro	Sartorius AG, Göttingen, DE
Wasserbad, open bath steel	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Zählkammer Neubauer improved (Kammertiefe 0,1mm; 0,0025 mm ²)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Becherglas (50 mL)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE

4.3 Chemikalien

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien und biologischen Materialien

Produkte	Hersteller
AP-18	Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE
Capsaicin	Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE

Capsazepin	Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE
<i>CXCL8</i> Forward Primer	VBC-Biotech Services GmbH, Wien, AT
<i>CXCL8</i> Reverse Primer	VBC-Biotech Services GmbH, Wien, AT
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Abcam, Cambridge, UK
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), high glucose, GlutaMAX™	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Erythrosin B (0,1% PBS; 0,22 µm filtriert)	Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE
Ethanol vergällt, ≥ 96 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
<i>GAPDH</i> Forward Primer	Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE
<i>GAPDH</i> Reverse Primer	Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE
HaCaT Zelllinie	CLS Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, DE
<i>HPRT1</i> Forward Primer	Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE
<i>HPRT1</i> Reverse Primer	Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE
Keratinocyte Growth Medium 2 (0,125 ng/mL EGF; 0,004 mL/mL BPE; 0,06 mM CaCl ₂)	PromoCell GmbH, Heidelberg, DE
Luna® Universal qPCR Master Mix	New England Biolabs, Inc., Massachusetts, US
Nuklease-freies Wasser, autoklaviert, DEPC-behandelt	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Penicillin-Streptomycin, steril filtriert (10000 Einheiten Penicillin, 10 mg/mL Streptomycin, 0,9 % NaCl)	Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, Phosphate-buffered saline)	Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE
RNase AWAY	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Thiazolylblau, MTT-Reagenz	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
TNF-α, recombinant human	Abcam, Cambridge, UK
<i>TRPA1</i> Forward Primer	Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE
<i>TRPA1</i> Reverse Primer	Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE
<i>TRPV1</i> Forward Primer	Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE
<i>TRPV1</i> Reverse Primer	Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE
TrypLE™ Express Enzym (1X), phenolrot	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US
Zimtaldehyd	Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Kits

Produkte	Hersteller
Human IL-8 ELISA Kit (ab214030)	Abcam, Cambridge, UK
LunaScript™ RT SuperMix Kit	New England Biolabs, Inc., Massachusetts, US
Monarch® Total RNA Miniprep Kit	New England Biolabs, Inc., Massachusetts, US

Tabelle 5: Eigenschaften der verwendeten Primer für die humanen Gene

Gen		Sequenz (5' → 3')	Produkt- größe [bp]	Referenz
<i>GAPDH</i>	fw	AGGTCGGAGTCAACGGATTG	95	Walker et al., 2017
	rv	GGGGTCATTGATGGCAACAATA		
<i>HPRT1</i>	fw	CCTGGCGTCGTGATTAGTGA	137	Riedel et al., 2014
	rv	CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT		
<i>TRPA1</i>	fw	GCAGCCAGTTATGGGCGTAT	116	Rohm et al., 2014
	rv	TTTGCTGCCAGATGGAGAGG		
<i>TRPV1</i>	fw	CCGGTGGTGCTTCAGGGTGG	100	Rohm et al., 2013
	rv	GCGCTTGACGCCCTCACAGT		
<i>CXCL8</i>	fw	ACTGAGAGTGATTGAGAGTAGAC	112	Josino Soares et al., 2014
	rv	AACCCTCTGCACCCAGTTTTC		

fw: forward; *rv*: reverse

4.3.1 Zusammensetzung der Lösungen

Tabelle 6: Zusammensetzung 10 x PBS

Chemikalien	Menge [g/500 mL]
NaCl	40,0314
Na ₂ HPO ₄	7,098
KCl	1,0064
KH ₂ PO ₄	1,3609

Tabelle 7: Zusammensetzung MTT-Reagenz

Chemikalien	Menge
Thiazolylblau	250 mg
PBS	50 mL

4.4 Programme

Graphpad Prism (Version 9.4.0 & 9.5.1), LinRegPCR (Version 2021.2), Microsoft 365 Excel (Version 2207), Plattenlesegerät Software (SparkControl 3.1), StepOne™ Software (Version 2.1).

5 Methoden

5.1 Zellkultur

Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden mit der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT durchgeführt. Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C und in einer Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert. Bis zum Ausstreuen und Behandeln der Zellen wurden diese in Zellkulturflaschen mit Schräghals (T-175) in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) kultiviert. Der Calciumchlorid des Mediums beträgt 1,8 mM und wird im Folgenden als Medium mit hohem Calciumgehalt (hCa²⁺) bezeichnet. Bevor die Zellen mit dem hCa²⁺-Medium in Kontakt kommen, wurde dieses mit 1 % Penicillin-Streptomycin versetzt. In einem Abstand von spätestens vier Tagen wurden die Zellen je nach Bedarf passagiert. Dabei wurden die Zellen bezüglich auffälliger Veränderungen und der Zelldichte regelmäßig mikroskopisch beobachtet. Gegebenenfalls wurde das hCa²⁺-Medium durch frisches ersetzt, sofern die Zellen noch nicht passagiert werden konnten.

Die gesamten Arbeitsschritte der Zellkultur, das Passagieren, das Ausstreuen sowie die einzelnen Behandlungen erfolgten unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank. Alle Arbeitsgegenstände und Materialien wurden gründlich desinfiziert bzw. autoklaviert und zusätzlich fand eine UV-Bestrahlung statt.

5.1.1 Passagieren und Ausstreuen der Zellen

Zu Beginn des Passagierens wurde frisches Medium im Wasserbad bei 37°C erwärmt. 50 mL des erwärmten Mediums wurden mit 500 µL Penicillin-Streptomycin versetzt. Das alte Medium wurde mithilfe einer sterilen Pasteurpipette aus der Zellkulturflasche (T-175) abgesaugt, 5 mL PBS wurden gegen die nicht bewachsene Wand der Flasche pipettiert und für wenige Sekunden langsam über die adhärennten Zellen auf dem Flaschenboden geschwenkt, um Reste des Mediums sowie abgestorbene Zellen zu entfernen. Anschließend wurde das PBS abgesaugt und 2,5 mL TrypLE™ Express der Zellkulturflasche hinzugefügt. Durch leichtes Schwenken wurden die Zellen damit benetzt und für 10 - 12 min zurück in den Inkubator gestellt, bis ein Ablösen der Zellen vom Flaschenboden ersichtlich war. Dieser Ablöseprozess wurde durch leichtes Klopfen gegen die Flasche unterstützt. Um diese Reaktion zu stoppen, wurden 7,5 mL des vorbereiteten frischen Mediums zugesetzt. Mithilfe

einer Pipette wurden die Zellen mit der TrypLE™ Express-Lösung durch Auf- und Abpipettieren nachgespült. Die entstandene Zellsuspension wurde aus der Flasche abpipettiert und eine definierte, von der Zelldichte abhängende, Menge (750 - 1500 µL) zurück in die entleerte Zellkulturflasche gegeben und mit dem frischen Medium aufgefüllt. Nach drei Passagen wurde die Flasche durch eine neue ersetzt.

Für die weiteren Behandlungen musste die Zelldichte ermittelt werden. Dies wurde mithilfe einer Zählkammer (Neubauer® improved, 0,1 mm Tiefe, 0,0025 mm²) durchgeführt. Dafür wurden 50 µL der Zellsuspension mit 200 µL Erythrosin B gemischt und gefärbt. Anschließend wurde ein Tropfen der gefärbten Zellsuspension auf die Zählkammer aufgetragen. Durch die Färbung konnten die lebenden Zellen anschließend unter dem Mikroskop in jedem der acht Quadrate ausgezählt werden. Die Zelldichte wurde rechnerisch mit folgender Formel ermittelt, die sich aus der Verdünnung der Zellsuspension (1:5) und dem Verdünnungsfaktor in der Zählkammer (10⁴) ableitet:

$$\text{Zellzahl pro mL} = \frac{\text{Anzahl der Zellen pro Quadrat}}{8} \times 5 \times 10^4$$

Anschließend wurde eine entsprechende Menge der Zellsuspension (ohne Erythrosin B) mit Medium versetzt, welches zuvor erwärmt und mit 1 % Penicillin-Streptomycin versetzt wurde. Die Menge des Mediums hängt dabei von der verwendeten Zellkultur-Platte ab, in die die Zellsuspension anschließend ausgestreut wurde. Die Zelldichte und das Volumen des Mediums sind der Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8: Zellanzahl, Fläche und Volumen der verwendeten Zellkultur Platten

Zellkultur-Platte	Zelldichte pro Well [Zellanzahl]	Fläche pro Well [cm²]	Medium pro Well [mL]
12-Well	61.500	12-Well	2
24-Well	30.000	24-Well	1
96-Well	10.000	96-Well	0,2

Ein wichtiger Unterschied zwischen dem Passagieren und Ausstreuen bzw. anschließendem Behandeln der Zellen besteht im verwendeten Medium. In diesem Fall wurde für das Ausstreuen und Behandeln ausschließlich serumfreies „Keratinocyte Growth Medium 2“ (mit 0,125 ng/mL EGF und 0,004 mL/mL BPE) verwendet, welches einen Calciumchloridgehalt von 0,06 mM aufweist und im Folgenden als Medium mit niedrigem Calciumgehalt (nCa^{2+}) bezeichnet wird.

Bis zur jeweiligen Behandlung wurden die Zellen vier Tage in den Zellkultur-Platten bei 37°C in einer Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert.

5.2 MTT-Test zur Bestimmung der Zellvitalität

Für alle Versuche, die eine Bewertung der Zelllebensfähigkeit erforderten (in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben), wurde zunächst ein MTT-Test durchgeführt. Auf diese Weise konnte die Konzentration der TNF- α Behandlung sowie der Agonisten und Antagonisten von TRPV1 bzw. TRPA1 bestimmt werden, bei denen nicht von toxischen Effekten ausgegangen werden kann.

Der MTT-Test ermöglicht die Messung der zellulären Stoffwechselaktivität, deren Grundlage die Reduktion einer gelben, wasserlöslichen MTT-Reagenz (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) bildet und von Mosmann (1983) entwickelt wurde. Die Reduktion dieses Monotetrazoliumsalses kann durch Oxidoreduktase-, Dehydrogenase-Enzyme und Elektronendonatoren in lebensfähigen Zellen vermittelt werden und führt zur Bildung blau-violetter, unlöslicher Formazan-Kristalle. Diese können mithilfe von DMSO gelöst werden und die Farbintensität kann mithilfe eines Mikroplattenlesers bei 570 nm bestimmt werden, was dem Absorptionsmaximum der Formazan-Kristalle entspricht (Ghasemi et al., 2021; Mosmann, 1983). Da diese Reduktion nur in lebensfähigen, stoffwechselaktiven Zellen stattfindet, verläuft die Messung der Farbintensität proportional zur Höhe der Stoffwechselaktivität (Kamiloglu et al., 2020).

Nachdem HaCaT-Zellen in 96-Well-Platten (10.000 Zellen/Well) ausgestreut, vier Tage unter Kontrollbedingungen (in nCa^{2+} -Medium) kultiviert und anschließend entsprechend behandelt wurden (siehe Kapitel 5.2.1 & 5.2.2), wurde das MTT-Reagenz hergestellt. Dazu wurde frisches nCa^{2+} -Medium erwärmt, mit 1 % Penicillin-Streptomycin versetzt und eine

1:6 Verdünnung der MTT-Stammlösung mit dem Medium vorbereitet. Anschließend wurde das alte Medium aus jedem Well der behandelten Platten abgesaugt und 100 µL des vorbereiteten MTT-Arbeitsreagenzes in jedes Well mit behandelten Zellen - inklusive dreier Kontrollen - pipettiert. Die Platte wurde für 15 min bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert, wobei ein leicht brauner, nicht zu dunkler Farbumschlag auftreten sollte. Das MTT-Arbeitsreagenz wurde abgesaugt und die Formazan-Kristalle mit 150 µL DMSO pro Well gelöst. Der Farbumschlag wurde anschließend für jede Behandlungen im Mikroplattenleser bei einem Absorptionsmaximum von 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm gemessen.

5.2.1 Bestimmung der Konzentration von TNF- α

Für den MTT-Test mit verschiedenen Konzentrationen von TNF- α , wurde nach entsprechender Kultivierung der Zellen (96-Well-Platte, 10.000 Zellen/Well) das nCa²⁺-Medium aus den Wells abgesaugt und frisches, auf Raumtemperatur erwärmtes Medium (nCa²⁺, 1 % P/S) mit TNF- α versetzt. Eine Stammlösung von 2 µg/mL TNF- α (gelöst in ddH₂O) wurde mit der jeweiligen Menge an nCa²⁺-Medium versetzt, sodass folgende Konzentrationen hergestellt wurden: 0; 10; 20; 40 ng/mL TNF- α . Anschließend wurde das Medium mit den verschiedenen Konzentrationen von TNF- α auf die Wells verteilt. Die Lösungsmittelkontrolle (K_{H2O}) enthielt dabei 2 % ddH₂O - was dem Volumen von ddH₂O der höchsten Konzentration von TNF- α entspricht. Die Zellen wurden daraufhin für 48 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde der MTT-Test wie oben beschrieben durchgeführt.

5.2.2 Bestimmung der Konzentration der Agonisten und Antagonisten von TRPV1 bzw. TRPA1

Um eine geeignete Konzentration der Agonisten und Antagonisten von TRPV1 und TRPA1 zu ermitteln, wurde ebenfalls ein MTT-Test durchgeführt. Die HaCaT-Zellsuspension wurde mit nCa²⁺-Medium (1 % Penicillin-Streptomycin) auf 96-Well-Platten in einer Dichte von 10.000 Zellen/Well ausgestreut. Die weiteren Schritte entsprechen der eben beschriebenen Vorgehensweise (Kapitel 5.2.1). In diesem Fall wurde nicht TNF- α , sondern die jeweiligen Agonisten und Antagonisten von TRPV1 bzw. TRPA1 in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet.

Capsaicin, welches als Agonist von TRPV1 verwendet wurde, wurde in DMSO gelöst (3,3 mg Capsaicin in 36 μ L DMSO; 300 mM) und anschließend mithilfe eines sterilen Spritzenfilters (Porengröße 0,22 μ m) gefiltert. Ebenso wurde eine Stammlösung von Capsazepin hergestellt (2,8 mg in 743 μ L DMSO; 10 mM), welches als Antagonist für TRPV1 verwendet wurde. Diese wurden bei -20°C gelagert und für die weiteren Behandlungen nach Bedarf aufgetaut. Ebenso wurde eine bereits bestehende Stammlösung von AP-18 (10 mM), welches als TRPA1 Antagonist benutzt wurde, tiefgefroren und aufbewahrt. Lediglich der TRPA1 Agonist Zimtaldehyd wurde vor erst kurz vor jeder Behandlung mit DMSO verdünnt, um die jeweilige Konzentration der Behandlung herzustellen. Zunächst wurden Einzelkonzentrationen der Verbindungen getestet. Alle Verbindungen wurden in einer entsprechenden Menge DMSO gelöst und anschließend 1 μ L dieser Lösung mit 1 mL Medium (nCa^{2+}) vermischt, sodass die Konzentrationen, welche der Tabelle 9 entnommen werden können, hergestellt wurden.

Tabelle 9: Einzelkonzentrationen der Agonisten/Antagonisten von TRPV1 und TRPA1

	TRPV1							TRPA1						
	Agonist				Antagonist			Agonist				Antagonist		
Verbindung	Capsaicin				Capsazepin			Zimtaldehyd				AP-18		
Konzentration [µM]	10	50	100	300	0,1	1	10	10	50	100	300	0,1	1	10

Anschließend wurde eine weitere Platte mit Zellen ausgestreut, wobei diesmal eine kombinierte Behandlung aus den Agonisten und deren jeweiligen Antagonisten dem Medium zugefügt wurden. Die Konzentration der Agonisten konnte bereits mithilfe des ersten MTT-Tests bestimmt werden und wurde für Capsaicin auf 10 μ M festgelegt und für Zimtaldehyd auf 50 μ M. Die Agonisten (in der festgelegten Konzentration) wurden dann gemeinsam mit den drei verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen Antagonisten (entsprechend der in Tabelle 9 dargestellten Konzentrationen der Antagonisten) auf die Wells verteilt.

Für die Kontrollbehandlung ohne Agonisten und/oder Antagonisten wurde das nCa^{2+} -Medium mit 0,1 % DMSO versetzt. Nach der Behandlung wurden die Platten jeweils für 24 h bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Anschließend wurde der bereits beschriebene MTT-Test durchgeführt.

5.3 Experimente zur Optimierung der Konzentration von TNF- α

Für die später folgenden Versuchsdurchführungen mussten verschiedene Konzentrationen der TNF- α Behandlung an HaCaT-Zellen getestet werden.

Dafür wurde eine HaCaT-Zellsuspension mit nCa²⁺-Medium auf 24-Well-Platten (30.000 Zellen/Well) ausgestreut und für vier Tage kultiviert. Danach wurden die Zellen mit TNF- α behandelt. Das alte Medium wurde abgesaugt und frisches auf Raumtemperatur erwärmtes Medium (nCa²⁺, 1 % Penicillin-Streptomycin) wurde mit dem entsprechenden Volumen einer TNF- α Stammlösung (2 μ g/mL; gelöst in ddH₂O) versetzt, sodass folgende Konzentrationen in einer Verdünnungsreihe erstellt werden konnten: 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40 ng/mL. Jede Konzentration wurde für je zwei Wells vorbereitet und vorsichtig auf die darin anhaftenden Zellen pipettiert. Die Lösungsmittelkontrolle (K_{H2O}) enthielt dabei wieder 2 % ddH₂O. Die behandelten Zellen wurden 48 h kultiviert.

5.4 Experimente zur Optimierung der Behandlungsdauer von TNF- α

Der Ablauf für die Behandlung mit TNF- α zu unterschiedlichen Zeitpunkten entspricht der eben beschriebenen Behandlung (siehe Kapitel 5.3). Mit dem Unterschied, dass die Zellen mit einer festgelegten Konzentration von 20 ng/mL TNF- α behandelt und anschließend für 3, 6, 12, 24 bzw. 48 h kultiviert wurden. Die Kontrollbehandlung (entspricht der Behandlungsdauer von 0 h) wurde direkt entnommen.

5.5 Vorbehandlung mit TRP-Agonisten bzw. Antagonisten und anschließender Behandlung mit TNF- α

Für diese Behandlung wurden die HaCaT-Zellsuspensionen unterschiedlicher Passagen mit nCa²⁺-Medium auf 24-Well-Platten bzw. 12-Well-Platten in entsprechender Zellzahl ausgestreut und vier Tage kultiviert. Der Wechsel auf die 12-Well-Platten erfolgte, da dabei bessere Erfolge bei der RNA-Isolierung erzielt wurden. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen zunächst mit den Agonisten und/oder Antagonisten von TRPV1 bzw. TRPA1 behandelt. Frisches und erwärmtes nCa²⁺-Medium (mit 1 % Penicillin-Streptomycin) wurde mit den Stammlösungen der Agonisten und Antagonisten verdünnt, sodass die Konzentrationen,

welche der Tabelle 10 entnommen werden können, hergestellt wurden. Jede so hergestellte Konzentration wurde für zwei Wells pro Platte vorbereitet und vorsichtig auf die darin anhaftenden Zellen pipettiert. Auf diese Weise wurden je zwei Wells nur mit dem Agonisten (a), nur mit dem Antagonisten (b) oder zusammen mit dem Agonisten und Antagonisten (c) behandelt (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Konzentration der jeweiligen Agonisten und Antagonisten für die kombinierte Behandlung

	a) Agonist	b) Antagonist	c) Agonist & Antagonist	
TRPV1				
Verbindung	Capsaicin	Capsazepin	Capsaicin	Capsazepin
Konzentration [µM]	10	1	10	1
TRPA1				
Verbindung	Zimtaldehyd	AP-18	Zimtaldehyd	AP-18
Konzentration [µM]	50	1	50	1

Für die Kontrollbehandlung ohne Agonisten bzw. Antagonisten wurde deren Lösungsmittel DMSO im Verhältnis 1:500 mit dem Medium verdünnt (0,2 % DMSO) und auf zwei bis vier Wells verteilt. DMSO ist aufgrund der amphiphilen Eigenschaften ein ideales Lösungsmittel für schwer lösliche Stoffe und weit verbreitet in der Toxikologie und Pharmakologie. Zudem kann es Zellmembranen und biologische Barrieren überwinden und erhöht damit die Permeabilität und Absorption gelöster biologischer Verbindungen, wobei von DMSO in niedrigen Dosen (< 10 %) eine geringe Toxizität angenommen wird. Dennoch kann DMSO die Zellprozesse beeinflussen und ebenso wurden entzündungshemmende und antioxidative Eigenschaften beschrieben, die insbesondere im Bereich der Dermatologie für Interesse sorgten (Verheijen et al., 2019; zusammengefasst von Karim et al., 2022). Um derartige Effekte von DMSO auszuschließen, wurde es als Lösungsmittelkontrolle verwendet.

Jede so behandelte Platte wurde in doppelter Ausfertigung hergestellt, um später zwei verschiedene Endzeitpunkte der Behandlung entnehmen zu können. Die Zellen wurden 24 h kultiviert und anschließend mit 20 ng/mL TNF- α behandelt. Hierfür wurde das Medium aus den Wells abgesaugt und frisches erwärmtes Medium (nCa²⁺, 1 % Penicillin-Streptomycin) zusammen mit der entsprechenden Konzentration an TNF- α auf die Wells verteilt. Dabei wurde die eine Hälfte der Wells, die zuvor mit den TRP-Agonisten/Antagonisten bzw. der

DMSO-Kontrolle behandelt wurde, zusätzlich mit TNF- α behandelt. Für die andere Hälfte der Wells wurde das TNF- α Lösungsmittel ddH₂O dem Medium zugesetzt, sodass eine Lösungsmittelkontrolle mit 1 % ddH₂O als Kontrollbehandlung in die Wells pipettiert werden konnte. Anschließend wurde je ein Duplikat der Platten für 6 h und das andere für 48 h kultiviert, sodass die jeweiligen Behandlungen zu zwei verschiedenen Zeitpunkten verglichen werden konnten.

5.6 Isolierung der RNA

Für die späteren Analysen der Genexpression (Kapitel 5.8) wurde zunächst die RNA der Zellen isoliert. Die Isolierung von intakter RNA und die Aufreinigung von mRNA ist notwendig, um diese in cDNA (komplementäre DNA) umzuschreiben und schließlich die jeweiligen Gene untersuchen zu können. Die Extraktion und Isolation von RNA aus den Zellen muss in einem effizienten und sorgfältigen Verfahren erfolgen. Von besonderer Relevanz ist die Hemmung widerstandsfähiger ubiquitärer RNasen, die einen schnellen Abbau der Transkripte bewirken. Demnach sollten die bereitgestellten Reagenzien frei von RNase-Kontaminationen sein. Die Isolierung sollte, in Anbetracht der kurzen Halbwertszeit der RNA, gut geplant sein und Störfaktoren wie starke mechanische Beanspruchung, hohe Temperaturen und extreme pH-Werte vermieden werden (Mehra, 1996; Poulson, 1973).

Für die folgenden Arbeitsschritte der RNA-Isolierung wurden RNase-freie Mikroreaktionsgefäße verwendet und sämtliche Geräte, Materialien sowie Arbeitsflächen wurden zuvor mit RNase-away gereinigt. Es wurde das „Monarch[®] Total RNA Miniprep Kit“ von New England Biolabs[®] verwendet. Die Zentrifugationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur (mind. 15°C) und 16,000 x g.

Nach entsprechender Behandlung und Kultivierung der Zellen (beschrieben in den Kapiteln 5.3 - 5.5) wurde zunächst der Überstand des Zellmediums aus den Platten in Mikroreaktionsgefäße abpipettiert und für die späteren ELISA-Untersuchungen (siehe Kapitel 5.9) bei -20°C tiefgefroren. Die einzelnen Schritte der RNA-Isolierung erfolgten gemäß dem Protokoll des Herstellers. Nachdem die behandelten Zellen lysiert und in ein RNase-freies Mikroreaktionsgefäß pipettiert wurden, wurde entweder direkt mit den weiteren Schritten der RNA-Isolation fortgefahren, oder die Proben tiefgefroren und nach Bedarf aufgetaut.

Für die Elution der RNA wurde 50 µL oder zweimal 30 µL nuklease-freies Wasser verwendet. Die so eluierte RNA wurde für die weiteren Schritte unmittelbar auf Eis gelegt.

5.6.1 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde mithilfe des „Spark® Tecan“ Mikroplattenlesegeräts bestimmt. Zum Teil wurde für die photometrische Messung, aufgrund von technischen Ausfällen, auf den NanoDrop™ zurückgegriffen. Zunächst wurde ein Leerwert gemessen, indem 2 µL nuklease-freies Wassers doppelt auf die NanoQuant® Platte pipettiert wurde. Daraufhin wurden je 2 µL der aufgereinigten RNA-Proben in Duplikaten auf die Platte pipettiert und bei Absorptionen von 230 nm, 260 nm und 280 nm gemessen.

Die unterschiedlichen Wellenlängen beruhen auf den unterschiedlichen Absorptionsmaxima von Nukleinsäuren (260 nm), organischen Verbindungen (230 nm) und Proteinen (280 nm). Somit dienen die Verhältnisse A260/A280 und A260/A230 als Maß für die Reinheit der Proben (Nolan, 2013).

Die RNA-Konzentration [ng/µL] der jeweiligen Probe wurde, nach Abzug des Leerwertes, zusätzlich zu diesen Verhältnissen von der Software ermittelt. Der A260/A280 Quotient sollte bei einer reinen RNA-Probe zwischen 1,8 und 2,0 liegen, während darunterliegende Werte auf eine Verunreinigung durch beispielsweise Proteine hinweisen (Arnemann, 2019). Der A260/A230 Quotient sollte einen Wert von über 1,8 aufweisen, wobei darunterliegende Werte auf Reste von Lösungsmitteln oder anderen organischen Verunreinigungen hinweisen können (Arnemann, 2019). Die isolierte RNA wurde anschließend für das Umschreiben in cDNA verwendet und restliche Proben bei -80°C gelagert.

5.7 Synthese der cDNA

Einzelsträngige RNA kann mittels reverser Transkriptase in eine stabilere komplementäre DNA (cDNA) umgewandelt werden, welche anschließend für die Polymerase Kettenreaktion verwendet wird. Die reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige 5'→3' DNA-Polymerase, die in zahlreichen biologischen Prozessen involviert ist und die Transkription ermöglicht (Boone et al., 2018).

Für die cDNA-Synthese wurde das „LunaScript™ RT SuperMix Kit“ von New England Biolabs® verwendet. Alle Arbeitsschritte fanden dabei auf Eis statt. Mithilfe der zuvor ermittelten RNA-Konzentrationen konnte die Menge an Probe, die für 0,5 µg RNA benötigt wird, errechnet werden. Zum Teil musste die RNA-Probe (der Behandlungen mit Agonisten und Antagonisten) in einem Vakuumkonzentrator aufkonzentriert werden, um die notwendige Probenmenge zu erzielen.

Das Reaktionsgemisch, bestehend aus der jeweiligen Menge der RNA-Probe, dem „LunaScript™ RT SuperMix“ und nuklease-freiem Wasser, wurde gemäß dem Schema der Tabelle 11 hergestellt und auf eine Well-Platte pipettiert. Anschließend wurde die Platte versiegelt und für 10 Sekunden kurz zentrifugiert.

Tabelle 11: Reaktionsgemisch für die cDNA-Synthese

Komponente	Volumen
RNA Probe	max. 16 µL
LunaScript™ RT SuperMix	4 µL

auffüllen mit nuklease-freiem Wasser bis Endvolumen von 20 µL

Anschließend erfolgte die eigentliche cDNA-Synthese im C-1000 Touch™ Thermal Cycler. Die Zyklusschritte des verwendeten Programms sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Zyklusschritte des Programms für die cDNA-Synthese im C-1000 Touch™ Thermal Cycler

Zyklusschritt	Temperatur [°C]	Zeit [Minuten]
Primer Annealing	25	2
cDNA-Synthese	55	10
Enzymdeaktivierung	95	1
Kühlphase/Erhaltungsphase	4	∞

Die synthetisierten cDNA-Proben wurden anschließend im Verhältnis 1:5 mit nuklease-freiem Wasser verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

5.8 Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (RT-qPCR)

Die quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) ist eine enzymatische Reaktion, die zur Amplifikation von DNA eingesetzt wird und zum Nachweis der Genexpression dient. Für die Quantifikation der DNA wird ein Fluoreszenz-Farbstoff als Detektionsmittel eingesetzt. Dieser wird in die neu synthetisierten Stränge eingebaut und erzeugt ein Fluoreszenzsignal, welches während des PCR-Zyklus gemessen wird und proportional zur Menge des amplifizierten Produkts ansteigt. Auf diese Weise kann die Menge der amplifizierten DNA bestimmt werden sowie die ursprünglich in der Probe vorhandene Menge berechnet werden (Kubista et al., 2006; Müller & Prange, 2016).

Die Polymerase-Kettenreaktion läuft in drei Schritten ab. Zunächst erfolgt eine Denaturierung der doppelsträngigen DANN in Einzelstränge. Im zweiten Schritt (Annealing) binden spezifische Primer bzw. Oligonukleotide über Basenpaarung an den zu amplifizierenden Bereich der DANN. Anschließend findet eine Elongation des DANN-Doppelstrangs durch DANN-Polymerasen statt. Durch Erhöhung der Temperatur auf 95°C kann die Elongation abgebrochen werden. Diese Schritte können in mehreren Zyklen (in der Regel 25 - 30) in einem Thermocycler wiederholt werden und dienen zur exponentiellen Amplifikation der DANN (Müller & Prange, 2016). Die Sequenzen der verwendeten und bereits validierten Primer sind der Tabelle 5 (Kapitel 4.3) zu entnehmen. *GAPDH* und *HPRT1* wurden als Referenzgene verwendet.

Zur Herstellung einer Arbeitslösung wurden die Primer (100 µM Stammlösung) im Verhältnis 1:10 mit nuklease-freiem Wasser verdünnt und bei -20°C gelagert. Für die RT-qPCR wurde der „Luna® Universal qPCR Master Mix“ von New England Biolabs® verwendet. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis und in einer abgedunkelten Umgebung ohne direkte Sonneneinstrahlung. Die benötigten Komponenten wurden zuvor aufgetaut. Es wurden sterile Mikroreaktionsgefäße verwendet und die Arbeitsflächen sowie alle benötigten Geräte sorgfältig gereinigt, um Kontamination zu vermeiden.

Das Pipettierschema für den Reaktionsmix, mit einer festgelegten Primerkonzentration von 200 nM, ist der Tabelle 13 zu entnehmen.

Tabelle 13: Zusammensetzung des Reaktionsmixes (ohne Probe) für die Durchführung der RT-qPCR.

Komponente	Volumen [µL] für 1 Reaktion
Luna® Universal qRT-PCR Master Mix (2 x)	5
Forward Primer	0,2
Reverse Primer	0,2
NFW	3,6

Pro zu amplifizierende Probe wurden 29,7 µL des gut durchmischten Reaktionsmixes in ein Mikroreaktionsgefäß pipettiert. Diesem wurden 3,3 µL der jeweiligen Probe hinzugefügt und kurz zentrifugiert. Hiervon wurden jeweils 10 µL auf drei Wells einer 96-Well-Platte verteilt. Pro zu analysierendes Gen wurde ein Leerwert pipettiert, der aus dem Reaktionsmix besteht und statt der Probe nuklease-freies Wasser enthält. Die Platte wurde mit einer optischen Versiegelungsfolie versiegelt und für 10 Sekunden kurz zentrifugiert. Anschließend wurde die Platte im StepOnePlus™ gemessen. Das verwendete Temperaturprogramm ist in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Temperaturprogramm für die RT-qPCR im StepOnePlus™

Zyklusschritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	60	1
Denaturierung	95	15	45
Elongation	60	30	

Schmelzkurve: 60 - 95°C in 0,5 Schritten

5.9 ELISA

Um die Sekretion von IL-8 im Überstand des Zellkulturmediums der behandelten HaCaT-Zellen zu messen, wurde das „Human IL-8 ELISA Kit“ von Abcam verwendet. Dabei handelt es sich um einen quantitativen Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

(ELISA), der über eine spezifische Antikörper-Antigen-Reaktion zum Nachweis von Proteinen und Zielantigenen dient. Bei einem Sandwich ELISA wird das Antigen zwischen zwei Schichten von Antikörpern, bestehend aus einem Capture-Antikörper und einem Detektions-Antikörper, gemessen. Der Detektions-Antikörper ist dabei an ein Enzym gebunden. Nach Zugabe des entsprechenden Substrats sind die Antigene über eine Farbreaktion nachweisbar. Der Sandwich ELISA weist eine sehr hohe Empfindlichkeit auf (zusammengefasst von Aydin, 2015).

Der hier verwendete ELISA nutzt eine SimpleStep Technologie, die die Durchführungszeit verkürzt. Der Boden der Wells ist mit monoklonalen Antikörpern beschichtet. Probe und Antikörper-Cocktail werden in die Wells gegeben. Der Cocktail besteht aus einem Detektions- und Capture-Antikörper, die an den Analyten aus der Probe binden. Dieser Analyt-Antikörper-Komplex wird wiederum von den monoklonalen Antikörpern gebunden. Danach erfolgen Waschschrte und ein Detektionsreagenz wird hinzugefügt. Eine Farbentwicklung, die proportional zur Menge des gebundenen Analyten ist, ermöglicht eine Quantifikation der Ergebnisse (Loi, 2021).

Der ELISA wurde gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Der zuvor entnommene und tiefgefrorene Medium-Überstand der verschieden behandelten Platten (Kapitel 5.3 - 5.5) wurde bei Raumtemperatur aufgetaut. Für die dosis- und zeitabhängige Untersuchung (Kapitel 5.3 und 5.4) wurde der Medium-Überstand aller Proben im Verhältnis 1:10 mit sample DNS verdünnt. Für die kombinierte Behandlung mit dem Agonisten und Antagonisten von TRPV1 bzw. TRPA1 und anschließender Behandlung mit oder ohne TNF- α (Kapitel 5.5), wurden die mit TNF- α behandelten Proben ebenfalls im Verhältnis 1:10 verdünnt und die Kontrollbehandlungen (ohne TNF- α) unverdünnt verwendet. Diese Verdünnung wurde gewählt, da sie innerhalb der Hersteller vorgegebenen IL-8 Standardkurve liegt, die zur Quantifikation der Analyten notwendig ist.

Die erstellten finalen Konzentrationen der IL-8 Standardlösungen sind in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Zusammensetzung der Standardlösungen zur Bestimmung von IL-8

Standard	Sample Diluent NS [μL]	[μL] hinzugefügter Standard	Finale Konzentration [pg/mL]
1	375	25 Stammlösung	250
2	150	150 Standard 1	125
3	150	150 Standard 2	62,50
4	150	150 Standard 3	31,25
5	150	150 Standard 4	15,63
6	150	150 Standard 5	7,81
7	150	150 Standard 6	3,91
8	150	-	0

Die erstellten Standards und Proben wurden in Duplikaten auf die „SimpleStep Pre-Coated 96-Well-Microplate“ aufgetragen (50 μL/Well). Ein zuvor hergestellter Antikörper-Cocktail (Tabelle 16) wurde den Standards und Proben hinzugefügt (50 μL/Well).

Tabelle 16: Zusammensetzung für 3 mL Antikörper-Cocktail

Komponente	Volumen [mL]
Human IL-8 Capture Antibody 10X	0,3
Human IL-8 Detector Antibody 10X	0,3
Antibody Diluent 4BI	2,4

Die Platte wurde für 1 h bei Raumtemperatur im Mikrolattenschüttler bei 400 rpm inkubiert. Durch den speziell konjugierten Capture-Antikörper, der an den monoklonalen Antikörper auf der ELISA-Platte bindet, kann die Bildung des Sandwich Antikörper-Antigen-Komplexes in einem Schritt durchgeführt werden (Loï, 2021).

Anschließend wurden drei Waschschritte durchgeführt, um ungebundene Antigene und überschüssige Detektionsantikörper zu entfernen.

Die Zusammensetzung des Waschpuffers ist der Tabelle 17 zu entnehmen.

Tabelle 17: Zusammensetzung des Waschpuffers

Komponente	Volumen [mL]
Wash Buffer PT 10X	5
Deionized water	45

Nach dem letzten Waschschriff und Ausklopfen der Flüssigkeit wurden 100 μ L TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) Substratlösung pro Well pipettiert. Dieser Schritt sowie die anschließende 10-minütige Inkubation im Mikroplattenschüttler bei 400 rpm wurden im Dunkeln durchgeführt. Die TMB-Substratlösung kann die Enzymaktivität durch einen Farbumschlag messbar machen. Um die Reaktion abzustoppen, wurden pro Well 100 μ L TMB stop solution pipettiert und die Platte erneut für 1 min im Mikroplattenschüttler bei 400 rpm gemixt. Dabei ist ein Farbumschlag von blau nach gelb ersichtlich. Die Extinktion wurde anschließend bei einer optischen Dichte von 450 nm gemessen.

5.10 Statistische Auswertung

Die Aufbereitung der Daten erfolgte mittels Microsoft 365 Excel Version 2207. Für die statistische Auswertung wurde GraphPad Prism Version 9.4.0 und 9.5.1 verwendet. Die Daten sind jeweils als arithmetische Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung angegeben. Die Verwendung der nachfolgend beschriebenen statistischen Tests zur Ermittlung der statistischen Signifikanz sind den jeweiligen Bildunterschriften in Kapitel 6 zu entnehmen.

5.10.1 MTT-Test zur Bestimmung der Zellvitalität

Für die Auswertung des MTT-Tests wurde der Mittelwert der Leerwerte von den ermittelten Rohdaten abgezogen. Diese Daten wurden in Relation zum Mittelwert der jeweiligen Kontrollen (Lösungsmittel aus ddH₂O oder DMSO) der Passagen gesetzt. Ausreißer wurden mithilfe des NALIMOV-Tests identifiziert und von der Analyse ausgeschlossen. Um die statistische Signifikanz zu ermitteln, wurden die aufbereiteten Daten zunächst auf

Normalverteilung mittels D'Agostino & Pearson, Anderson-Darling, Shapiro-Wilk und Kolmogorov-Smirnov Test sowie auf Varianzhomogenität mittels Brown-Forsythe Test geprüft. Wiesen die Daten eine Normalverteilung auf, wurde die statistische Signifikanz mittels einfaktorieller Varianzanalyse (bei vorliegender Varianzhomogenität) bzw. mittels Brown-Forsythe und Welch-ANOVA (bei nicht vorliegender Varianzhomogenität) ermittelt, gefolgt von einem Dunnett post-hoc Test. Wiesen die Daten keine Normalverteilung auf, wurde die statistische Signifikanz mittels Kruskal-Wallis Test ermittelt, gefolgt von einem Dunnett post-hoc Test. Der statistische Unterschied wurde jeweils durch $p < 0,05$ angegeben.

5.10.2 RT-qPCR

Für die Auswertung der RT-qPCR wurden die ermittelten Amplifikationsdaten mithilfe der Software LinRegPCR (Version 2021.2) evaluiert und aufbereitet. Dabei wurden die Baseline- und Effizienz-Ausreißer ermittelt sowie die Anfangskonzentration der Proben (N_0 -Werte). Die Daten wurden exportiert und die errechneten N_0 -Werte für die weitere Analyse verwendet. Zunächst wurden Ausreißer der Referenzgene *GAPDH* und *HPRT1* ermittelt. Dafür wurden die N_0 -Werte der Replikate einer Probe auf den Mittelwert der entsprechenden Probe normalisiert und anschließend die x-fache Änderung der Genexpression in Bezug auf den Mittelwert der entsprechenden Kontrolle berechnet. Die Mittelwerte und Standardabweichung aller Proben einer Behandlung wurden je Gen ermittelt und die Ausreißer mittels Nalimov-Tests identifiziert. Diese, von Ausreißern bereinigten, N_0 -Werte der Referenzgene wurden für die weitere Analyse herangezogen. Die N_0 -Werte der jeweiligen Probenreplikate der zu untersuchenden Gene (*TRPV1*, *TRPA1*, *CXCL8*) wurden auf das geometrische Mittel der Referenzgene der entsprechenden Proben normalisiert. Anschließend wurde die x-fache Änderung der Genexpression in Bezug auf den Mittelwert der entsprechenden Kontrolle berechnet. Mittelwerte und Standardabweichungen der Proben wurden ermittelt. Ausreißer wurden mithilfe des NALIMOV-Tests identifiziert und von der Analyse ausgeschlossen. Die statistische Signifikanz wurde wie zuvor beschrieben (siehe 5.10.1) ermittelt.

5.10.3 ELISA

Für die Auswertung der ELISA-Daten wurde zunächst die Extinktion der Standardreihe verwendet. Der Mittelwert des Standards „8“ (Leerwert) wurde von den Mittelwerten jeden Standards abgezogen und eine Standardgerade erstellt. Die ermittelte Geradengleichung ($y = mx + b$) wurde verwendet um die IL-8 Freisetzung (in pg/mL) der Proben zu bestimmen. Dafür wurde der Mittelwert des Leerwertes von den Rohdaten abgezogen. Anschließend konnte davon der Wert des Schnittpunktes mit der y-Achse (b) subtrahiert werden und durch die Steigung der Geraden (m) dividiert werden. Proben, die zuvor verdünnt wurden, wurden mit dem entsprechenden Faktor multipliziert. Die so ermittelten Werte der IL-8 Freisetzung wurden in Relation zum Mittelwert der jeweiligen Kontrolle gesetzt. Mittelwert und Standardabweichung wurden ermittelt. Ausreißer wurden mithilfe des NALIMOV-Tests identifiziert und von der Analyse ausgeschlossen. Die statistische Signifikanz wurde wie zuvor beschrieben (siehe 5.10.1) ermittelt.

6 Ergebnisse

6.1.1 MTT-Test zur Bestimmung der Zellvitalität

Mithilfe des MTT-Tests wurde die zelluläre Stoffwechselaktivität der HaCaT-Zellen gemessen. Diese diente zur Ableitung der Zellvitalität, die sich nach entsprechender Behandlung der HaCaT-Zellen ergab. Auf Grundlage dieser Daten konnten geeignete Konzentration von TNF- α sowie der Agonisten und Antagonisten von TRPV1 bzw. TRPA1 ermittelt werden, sodass für die nachfolgenden Experimente negative Effekte auf die Zellvitalität ausgeschlossen werden konnten.

6.1.1.1 MTT-Test zur Bestimmung der Konzentration von TNF- α

Die Ergebnisse des MTT-Tests bei Behandlung der HaCaT-Zellen mit TNF- α können der Abbildung 13 entnommen werden. Die Werte sind als prozentuale Veränderung in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle K_{H2O} (2 % ddH₂O) dargestellt.

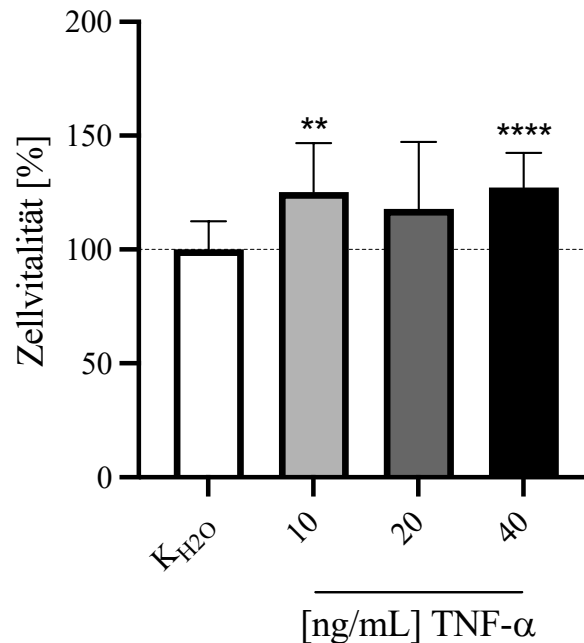


Abbildung 13: MTT zur Bestimmung der Zellaktivität in HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit TNF- α in unterschiedlichen Konzentrationen. HaCaT-Zellen wurden über einen Zeitraum von 4 Tagen unter Kontrollbedingungen kultiviert (niedriger Calciumgehalt: 0,06 mM Ca²⁺, EGF, BPE). Danach für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von TNF- α (10; 20; 40 ng/mL) oder dem Lösungsmittel (2 % ddH₂O) behandelt. Die Daten sind als prozentuale Abweichung zur Lösungsmittelkontrolle K_{H2O} dargestellt. Statistik: Mittelwert + SD; technische Replikate: 4-5; biologische Replikate: 3; Brown-Forsythe und Welch-ANOVA, ** p < 0,01, **** p < 0,0001.

Nach 24-stündiger Behandlung der HaCaT-Zellen mit 10, 20 bzw. 40 ng/mL TNF- α wurde keine signifikante Abnahme der Zellvitalität beobachtet. Stattdessen war bei 10 und 40 ng/mL TNF- α eine signifikante Erhöhung der Zellvitalität (mit p = 0,003 und p < 0,0001) ersichtlich. Über alle Behandlungen lag die durchschnittliche Zellvitalität zwischen 117,86 % und 127,31 %. Damit werden keine toxischen Effekte in dem getesteten Bereich der TNF- α Konzentrationen gezeigt und erwartet.

6.1.1.2 MTT-Test zur Bestimmung der Konzentration von TRP-Agonisten bzw. Antagonisten

Die Ergebnisse des MTT-Tests bei Behandlung der HaCaT-Zellen mit den Agonisten (I) und Antagonisten (II) von TRPV1 (Capsaicin, Capsazepin) sowie TRPA1 (Zimtaldehyd, AP-18) können der Abbildung 14 entnommen werden. Die Werte sind als prozentuale Veränderung in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle K_{DMSO} (0,1 % DMSO) dargestellt.

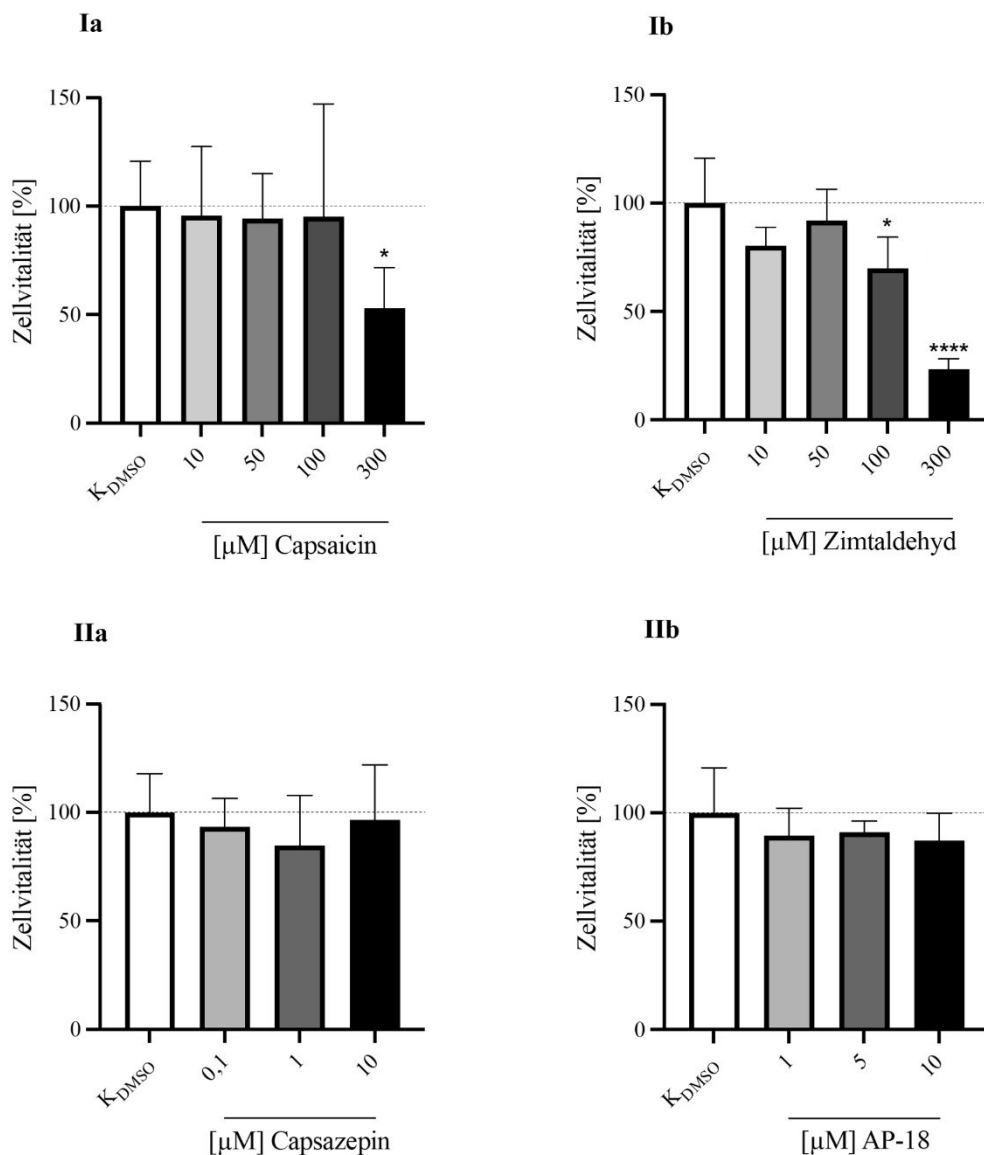


Abbildung 14: MTT zur Bestimmung der Zellaktivität in HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit Agonisten (I) und Antagonisten (II) von TRPV1 (a) bzw. TRPA1 (b). HaCaT-Zellen wurden über einen Zeitraum von 4 Tagen unter Kontrollbedingungen kultiviert (niedriger Calciumgehalt: 0,06 mM Ca^{2+} , EGF, BPE). Danach für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von Ia Capsaicin (10; 50; 100; 300 µM), IIb Capsazepin (0,1; 1; 10 µM), Ib Zimtaldehyd (10; 50; 100; 300 µM), IIb AP-18 (1; 5; 10 µM) oder dem Lösungsmittel (0,1 % DMSO) behandelt. Die Daten sind als prozentuale Abweichung zur Lösungsmittelkontrolle K_{DMSO} dargestellt. Statistik: Mittelwert + SD; technische Replikate: 3-4 (Ia, Ib, IIb), 3-5 (IIa); biologische Replikate: 3 (Ia, Ib, IIb), 4 (IIa); One-way ANOVA (Ia, IIa, IIb); Brown-Forsythe und Welch-ANOVA (Ib); * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$.

Nach 24-stündiger Behandlung der HaCaT-Zellen mit 300 μ M Capsaicin (Abbildung 14 Ia) wurde eine signifikante Abnahme der Zellvitalität im Vergleich zur Kontrolle festgestellt. Die durchschnittliche Zellvitalität nahm dabei einen Wert von $52,96 \pm 18,72 \%$ ($p < 0,05$) an. Die Behandlung mit 300 μ M Capsaicin lässt demnach auf einen zytotoxischen Effekt schließen, der sich aus der verminderten zellulären Stoffwechselaktivität der HaCaT-Zellen ableitet. Die niedrigeren Konzentrationen von Capsaicin zeigten keine signifikante Abnahme der Zellvitalität. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Konzentration von Capsaicin für die nachfolgenden Versuche auf 10 μ M festgelegt. Ähnliche Konzentrationen wurden auch an anderer Stelle bei Studien mit HaCaT-Zellen verwendet (Lee et al., 2009; W. H. Li et al., 2007). Die Behandlung der HaCaT-Zellen mit 100 μ M bzw. 300 μ M Zimtaldehyd (Abbildung 14 Ib) zeigte jeweils eine signifikante Abnahme der Zellvitalität, die einen durchschnittlichen Wert von $70 \pm 14,34 \%$ ($p < 0,05$) bzw. $23,36 \pm 4,97 \%$ ($p < 0,0001$) annahm und damit laut ISO-Norm 10993-5 auf eine schwach zytotoxische bzw. stark zytotoxische Wirkung dieser Konzentrationen zurückschließen lässt. Bei der Behandlung mit 50 μ M Zimtaldehyd wurde keine signifikante Abnahme der Zellvitalität beobachtet ($92,12 \pm 14,47 \%$) und diese Konzentration wurde für die nachfolgenden Experimente festgelegt, von der keine zytotoxischen Effekte zu erwarten sind.

Die Behandlungen mit dem jeweiligen Antagonisten von TRPV1 bzw. TRPA1 (Abbildung 14 IIa & IIb) zeigten über alle Konzentrationen keine signifikante Abnahme der Zellvitalität. Die Konzentration der Antagonisten wurde schließlich anhand eines weiteren MTT-Tests ermittelt, bei welchem eine kombinierte Behandlung der festgelegten Konzentrationen der Agonisten zusammen mit den unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen Antagonisten durchgeführt wurde.

Die Ergebnisse des MTT-Tests nach 24-stündiger Behandlung der HaCaT-Zellen können der Abbildung 15 entnommen werden. Die Werte sind als prozentuale Veränderung in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle K_{DMSO} (0,1 % DMSO) dargestellt.

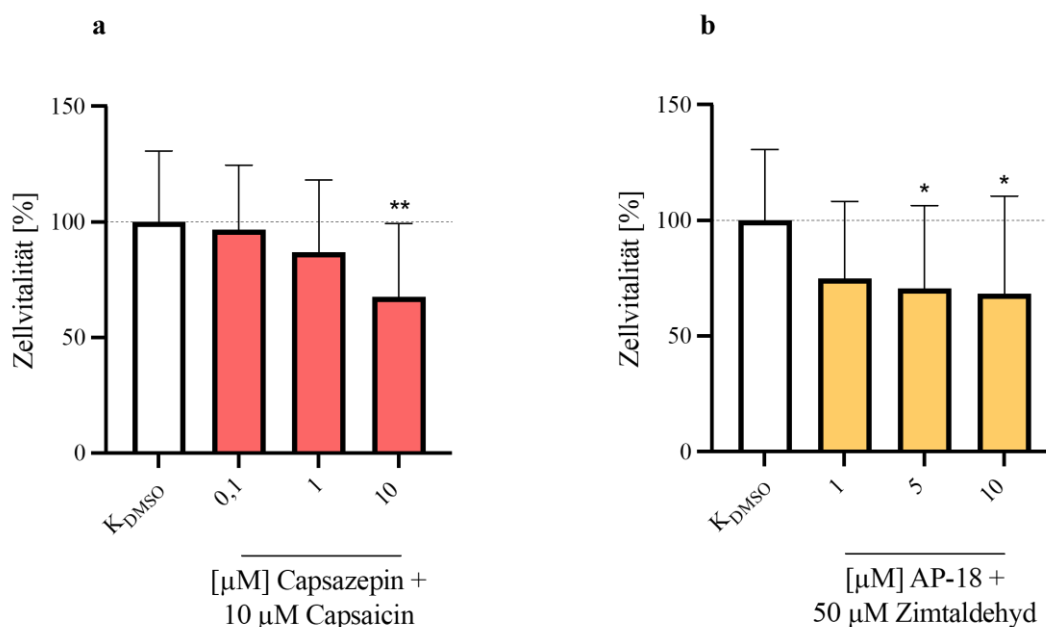


Abbildung 15: MTT zur Bestimmung der Zellaktivität in HaCaT-Zellen nach 24-stündiger kombinierter Behandlung mit Capsaicin und Capsazepin (a) bzw. Zimtaldehyd und AP-18 (b). HaCaT-Zellen wurden über einen Zeitraum von 4 Tagen unter Kontrollbedingungen kultiviert (niedriger Calciumgehalt: 0,06 mM Ca²⁺, EGF, BPE). Danach für 24 h mit a) 10 µM Capsaicin in Kombination mit unterschiedlichen Konzentrationen von Capsazepin (0,1; 1; 10 µM) bzw. b) 50 µM Zimtaldehyd in Kombination mit unterschiedlichen Konzentrationen von AP-18 (1; 5; 10 µM) oder dem Lösungsmittel (0,1 % DMSO) behandelt. Die Daten sind als prozentuale Abweichung zur Lösungsmittelkontrolle K_{DMSO} dargestellt. Statistik: Mittelwert + SD; technische Replikate: 4-5; biologische Replikate: 4; One-way ANOVA, * p < 0,05, ** p < 0,01.

Nach 24-stündiger Behandlung der HaCaT-Zellen mit 10 µM Capsazepin (Abbildung 15 a) wurde eine signifikante Abnahme der Zellvitalität ($67,69 \pm 31,66$ %; p = 0,005) im Vergleich zur Kontrolle festgestellt. Da bei dieser Konzentration zytotoxische Effekte zu erwarten sind, wurde für Capsazepin eine Konzentration von 1 µM für die weiteren Experimente festgelegt. Diese Konzentration zeigte keine signifikante Abnahme der Zellvitalität ($86,81 \pm 31,37$ %). Da die Konzentration des Agonisten (Capsaicin) vergleichsweise hoch gewählt wurde, wurde in diesem Fall die Dosis von 1 µM der geringeren Dosis von 0,1 µM vorgezogen, um antagonistische Effekte erzielen zu können. Bei der Behandlung von 50 µM Zimtaldehyd in Kombination mit 5 µM bzw. 10 µM AP-18 (Abbildung 15 b) wurde jeweils eine signifikante Abnahme der Zellvitalität beobachtet, die einen zytotoxischen Effekt dieser Konzentrationen ableiten lässt. Somit wurde für die weiteren Versuche eine Konzentration für AP-18 von 1 µM festgelegt. Die ausgewählten Konzentrationen liegen in Konzentrationsbereichen, die

bereits am Institut für andere Experimente und Forschungsarbeiten verwendet wurden (Hoi et al., 2020; Lieder et al., 2020; Rohm et al., 2013; Rohm et al., 2015; Walker et al., 2017).

6.2 Optimierung und Bestimmung der TNF- α Behandlung

Um weiterführend eine optimale Dosis der Behandlung mit TNF- α zu ermitteln, die für die späteren Experimente geeignet ist, wurden die HaCaT-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von TNF- α behandelt. Anschließend wurde die DNA isoliert und eine RT-qPCR durchgeführt. Die Ergebnisse der RT-qPCR können der Abbildung 16 (a) und 17 entnommen werden. Die Genexpression von *TRPV1* (Abbildung 17 a), *TRPA1* (Abbildung 17 b) und *CXCL8* (Abbildung 16 a) ist jeweils als x-fache Änderung bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle K_{H_2O} dargestellt, nachdem die HaCaT-Zellen für 48 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von TNF- α behandelt wurden. Zusätzlich zur Genexpression wurde der Überstand des Zellkulturmediums der behandelten Zellen entnommen, um die Messung der sezernierten Menge an IL-8 mittels ELISA-Test durchzuführen (Abbildung 16 b). Diese ist ebenfalls als x-fache Änderung zur Lösungsmittelkontrolle K_{H_2O} angegeben.

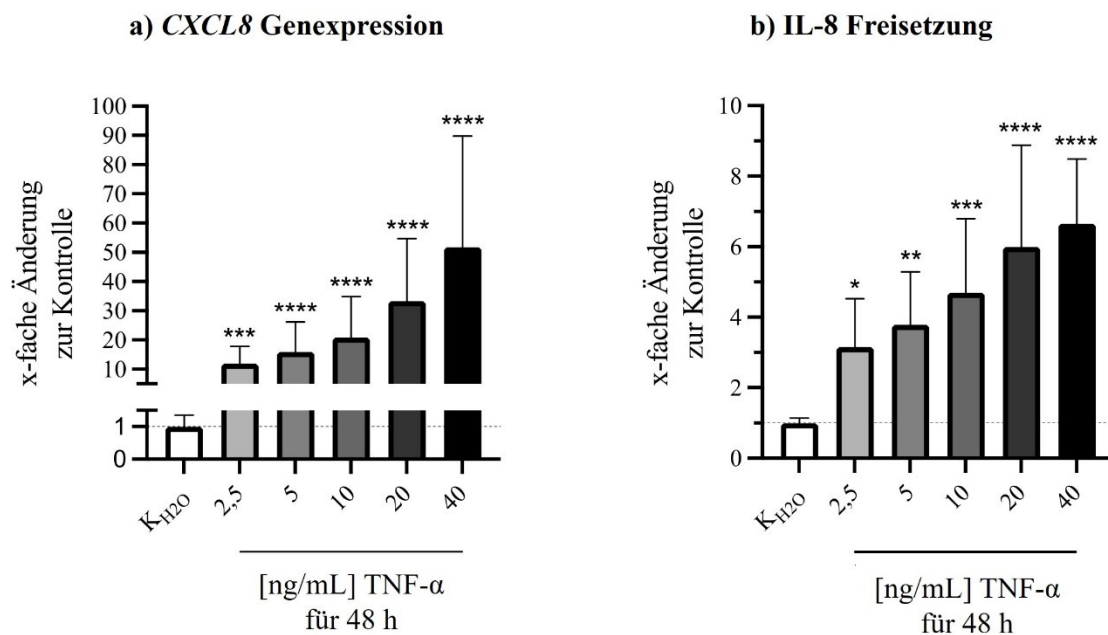


Abbildung 16: Bestimmung der relativen Änderung der Genexpression mittels RT-qPCR (a) und Freisetzung mittels ELISA (b) von *CXCL8*/IL-8 in HaCaT-Zellen nach 48-stündiger Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von TNF- α . HaCaT-Zellen wurden über einen Zeitraum von 4 Tagen unter Kontrollbedingungen kultiviert (niedriger Calciumgehalt: 0,06 mM Ca^{2+} , EGF, BPE). Danach für 48 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von TNF- α (2,5; 5; 10; 20; 40 ng/mL) oder dem Lösungsmittel (2 % ddH₂O) behandelt. Die Daten der RT-qPCR (a) sind zu den Referenzgenen *GAPDH* und *HPRT1* normalisiert. Die Freisetzung von IL-8 wurde mittels ELISA (b) aus dem Überstand des Zellmediums der behandelten HaCaT-Zellen ermittelt. Die Daten sind als prozentuale Abweichung zur Lösungsmittelkontrolle K_{H_2O} dargestellt. Statistik: Mittelwert + SD; technische Replikate: 3-6 (a) bzw. 2 (b); biologische Replikate: 6 (a) bzw. 5 (b); Kruskal-Wallis (a); One-way ANOVA (b); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

In Abbildung 16 ist der Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen der TNF- α Behandlung auf die Expression und Sekretion von *CXCL8/IL-8* in HaCaT-Zellen dargestellt. Bei allen getesteten Konzentrationen war die x-fache Änderung der Genexpression und Sekretion von *CXCL8/IL-8* im Vergleich zu K_{H2O} signifikant erhöht, wobei höhere Konzentrationen von TNF- α eine stärkere Erhöhung induzierten, was als dosisabhängiger Effekt der TNF- α Behandlung angesehen werden kann. Die Behandlung der HaCaT-Zellen mit 20 ng/mL bzw. 40 ng/mL TNF- α induzierte eine signifikant erhöhte x-fache Änderung der relativen Genexpression von $33,36 \pm 21,34$ bzw. $51,71 \pm 38,10$ im Vergleich zu K_{H2O} ($p < 0,0001$). Ebenso war bei diesen Behandlungen die x-fache Änderung der von den Zellen freigesetzten Menge an IL-8 mit $5,99 \pm 2,88$ bzw. $6,65 \pm 1,83$ im Vergleich zu K_{H2O} signifikant erhöht ($p < 0,0001$). Ein signifikanter Effekt der TNF- α Behandlung auf die IL-8 Freisetzung konnte mittels Tukey post-hoc Test (Daten nicht gezeigt) zwischen der Behandlung von 2,5 ng/mL TNF- α zu 20 ng/mL bzw. 40 ng/mL TNF- α festgestellt werden (mit $p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$) sowie zwischen 5 ng/mL und 40 ng/mL TNF- α (mit $p < 0,05$).

In Abbildung 17 ist die x-fache Änderung der Genexpression von *TRPV1* (a) und *TRPA1* (b) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle K_{H_2O} dargestellt.

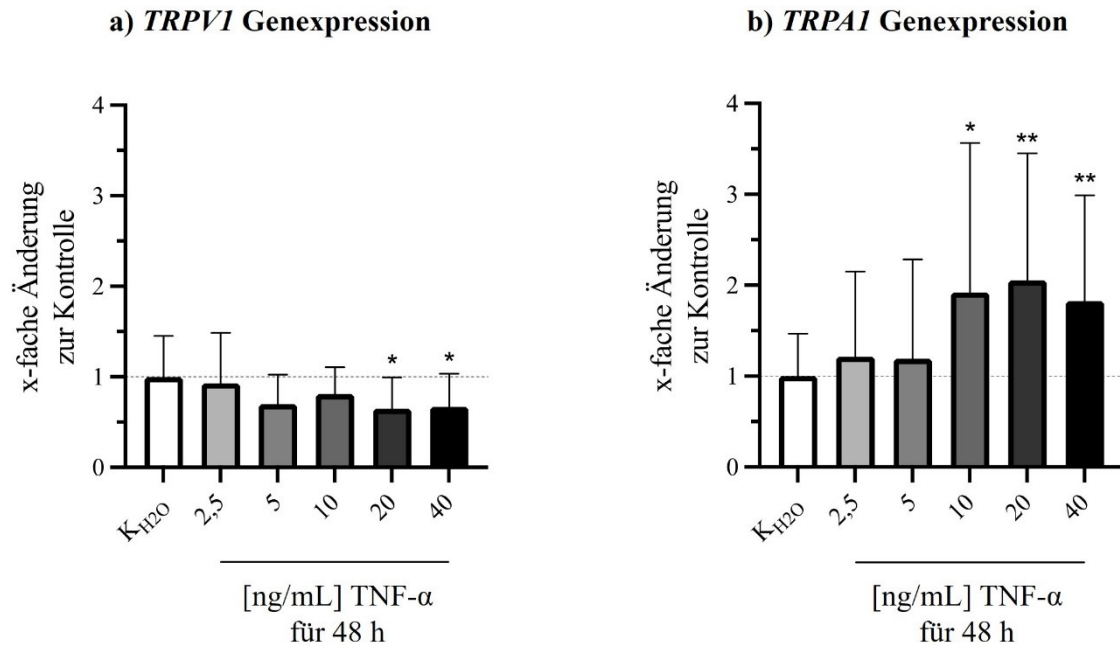


Abbildung 17: Relative Änderung der Genexpression von *TRPV1* (a) bzw. *TRPA1* (b) in HaCaT-Zellen nach 48-stündiger Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von TNF- α . HaCaT-Zellen wurden über einen Zeitraum von 4 Tagen unter Kontrollbedingungen kultiviert (niedriger Calciumgehalt: 0,06 mM Ca^{2+} , EGF, BPE). Danach für 48 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von TNF- α (2,5; 5; 10; 20; 40 ng/mL) oder dem Lösungsmittel (2 % ddH₂O) behandelt. Die Daten sind zu den Referenzgenen *GAPDH* und *HPRT1* normalisiert und als prozentuale Abweichung zur Lösungsmittelkontrolle K_{H_2O} dargestellt. Statistik: Mittelwert + SD; technische Replikate: 3-6; biologische Replikate: 5-6; One-way ANOVA (a); Brown-Forsythe und Welch-ANOVA (b); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Die 48-stündige Behandlung mit TNF- α in unterschiedlichen Konzentrationen zeigte keinen dosisabhängigen Effekt auf die Genexpression von *TRPV1*. Die Behandlung mit 20 ng/mL bzw. 40 ng/mL TNF- α führte zu einer signifikanten Abnahme der x-fachen Änderung der Genexpression mit $0,65 \pm 0,34$ ($p = 0,02$) bzw. $0,67 \pm 0,37$ ($p = 0,04$) im Vergleich zu K_{H_2O} . Insgesamt wurde bei allen Konzentrationen von TNF- α eine durchschnittlich niedrigere x-fache Änderung der *TRPV1*-Genexpression beobachtet, die von mindestens $0,65 \pm 0,34$ bis höchstens $0,93 \pm 0,55$ reichte.

Für *TRPA1* wurde hingegen eine erhöhte x-fache Änderung der Genexpression festgestellt. Im Vergleich zu K_{H_2O} war diese signifikant erhöht und nahm bei Behandlung mit 10 ng/mL TNF- α einen Wert von $1,92 \pm 1,64$ ($p = 0,04$) an, mit 20 ng/mL TNF- α einen von $2,05 \pm 1,4$ ($p = 0,006$) und mit 40 ng/mL TNF- α einen von $1,82 \pm 1,17$ ($p = 0,009$).

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Konzentration von TNF- α für die weiteren Behandlung auf 20 ng/mL festgelegt, da bei dieser Konzentration signifikante Effekte der Genexpression von *TRPA1* (erhöhte x-fache Änderung der Genexpression) und *TRPV1* (niedrigere x-fache Änderung der Genexpression) beobachtet wurden. Zudem wurde über alle Konzentrationen eine signifikante x-fache Änderung der Genexpression und Freisetzung von *CXCL8/IL-8* beobachtet, wodurch die Wirkung der Behandlungen bezüglich inflammatorischer Reaktionen untersucht und interpretiert werden kann. Eine zytotoxische Wirkung von 20 ng/mL TNF- α konnte mittels MTT-Tests ausgeschlossen werden.

6.3 Optimierung und Bestimmung der TNF- α Behandlungsdauer

Neben der Konzentration musste eine geeignete Dauer der Behandlung mit TNF- α bestimmt werden. Dazu wurde die Genexpression aus dem Zellmaterial mittels RT-qPCR von *CXCL8*, *TRPV1* und *TRPA1* ermittelt. Die HaCaT-Zellen wurden dabei einer unterschiedlichen Behandlungsdauer mit 20 ng/mL TNF- α ausgesetzt. Die Ergebnisse sind der Abbildung 18 (a) und 19 zu entnehmen, wobei die Genexpression jeweils als x-fache Änderung im Vergleich zur Kontrolle (keine TNF- α Behandlung) dargestellt ist. Ebenso wurde die IL-8 Freisetzung im Überstand des Zellkulturmediums der HaCaT-Zellen mittels ELISA gemessen. Die Ergebnisse sind der Abbildung 18 (b) zu entnehmen und als x-fache Änderung zur Kontrolle (keine TNF- α Behandlung) dargestellt.

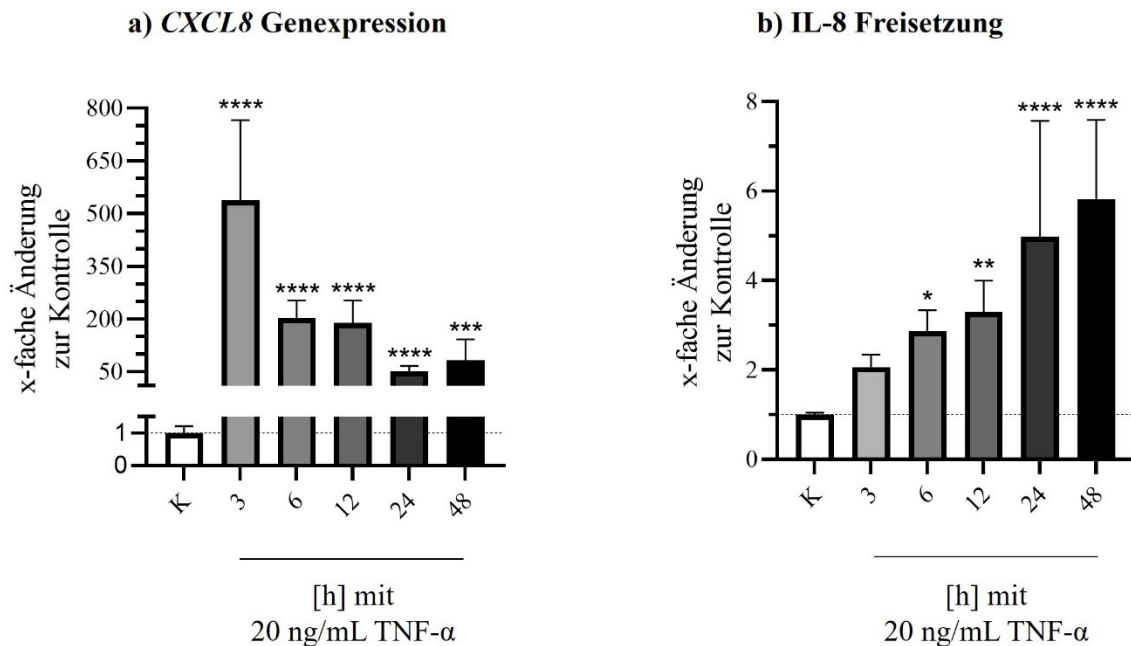


Abbildung 18: Bestimmung der relativen Änderung der Genexpression mittels RT-qPCR (a) und Freisetzung mittels ELISA (b) von *CXCL8*/IL-8 in HaCaT-Zellen nach Behandlung mit 20 ng/mL TNF- α für unterschiedliche Dauer. HaCaT-Zellen wurden über einen Zeitraum von 4 Tagen unter Kontrollbedingungen kultiviert (niedriger Calciumgehalt: 0,06 mM Ca²⁺, EGF, BPE). Danach mit 20 ng/mL TNF- α behandelt und die Proben nach 3, 6, 12, 24 bzw. 48 h oder direkt (Kontrolle) entnommen. Die Daten der RT-qPCR (a) sind zu den Referenzgenen *GAPDH* und *HPRT1* normalisiert. Die Freisetzung von IL-8 wurde mittels ELISA (b) aus dem Überstand des Zellmediums der behandelten HaCaT-Zellen ermittelt. Die Daten sind als prozentuale Abweichung zur Kontrolle K (0 h) dargestellt. Statistik: Mittelwert + SD; technische Replikate: 3 (a) bzw. 2 (b); biologische Replikate: 5; Brown-Forsythe und Welch-ANOVA (a); One-way ANOVA (b); * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001.

Die x-fache Änderung der Genexpression von *CXCL8* war im Vergleich zur Kontrolle über alle Zeitpunkte der Behandlung signifikant erhöht (p < 0,0001 bzw. für 48 h mit p < 0,001).

Dabei wurde nach 3 h die höchste Änderung der Genexpression induziert, die signifikant um das $537,19 \pm 228,64$ -Fache im Vergleich zur Kontrolle erhöht war. Danach wurde - im Vergleich zur 3-stündigen Behandlung - ein Abfall der x-fachen Änderung der Genexpression von *CXCL8* bis zur Behandlungsdauer von 24 h beobachtet, wobei die Änderung der Genexpression im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht blieb. Bereits nach 6-stündiger Behandlung mit $\text{TNF-}\alpha$ betrug die x-fache Änderung der Genexpression von *CXCL8* nur noch $202,69 \pm 50,75$ im Vergleich zur Kontrolle und war damit um mehr als die Hälfte im Vergleich zum vorherigen Zeitpunkt reduziert. Nach 48 h stieg die x-fache Änderung der Genexpression auf einen Wert von $82,85 \pm 59,14$ an. Bei der Behandlungsdauer von 12 h und 48 h wurde keine signifikante x-fache Änderung der Genexpression von *CXCL8* im Vergleich zur vorherigen Behandlungsdauer von 6 h bzw. 12 h beobachtet (Daten nicht gezeigt). Abgesehen davon könnte ein zeitabhängiger Effekt der $\text{TNF-}\alpha$ Behandlung auf die *CXCL8*-Genexpression angenommen werden. Dabei nimmt die relative Genexpression, trotz erhöhter x-facher Änderung der Genexpression im Vergleich zur Kontrolle, von 3 h bis 24 h mit steigender Behandlungsdauer ab.

Die x-fache Änderung der sezernierten Menge von IL-8 im Überstand des Zellkulturmediums (Abbildung 18 b) war über alle Zeitpunkte im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Lediglich nach 3-stündiger Behandlung mit $\text{TNF-}\alpha$ wurde keine signifikante Erhöhung beobachtet. Nach 6-stündiger Behandlung betrug die x-fache Änderung der IL-8 Freisetzung $2,87 \pm 0,47$ ($p < 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle und stieg mit der Behandlungsdauer weiter an. Die höchste x-fache Änderung wurde dabei nach 48 h beobachtet ($5,82 \pm 1,77$ mit $p < 0,0001$). Damit könnte ebenfalls ein zeitabhängiger Effekt der $\text{TNF-}\alpha$ Behandlung auf die IL-8 Freisetzung angenommen werden.

Der Abbildung 19 können die Ergebnisse der Genexpression von *TRPV1* (a) und *TRPA1* (b) entnommen werden.

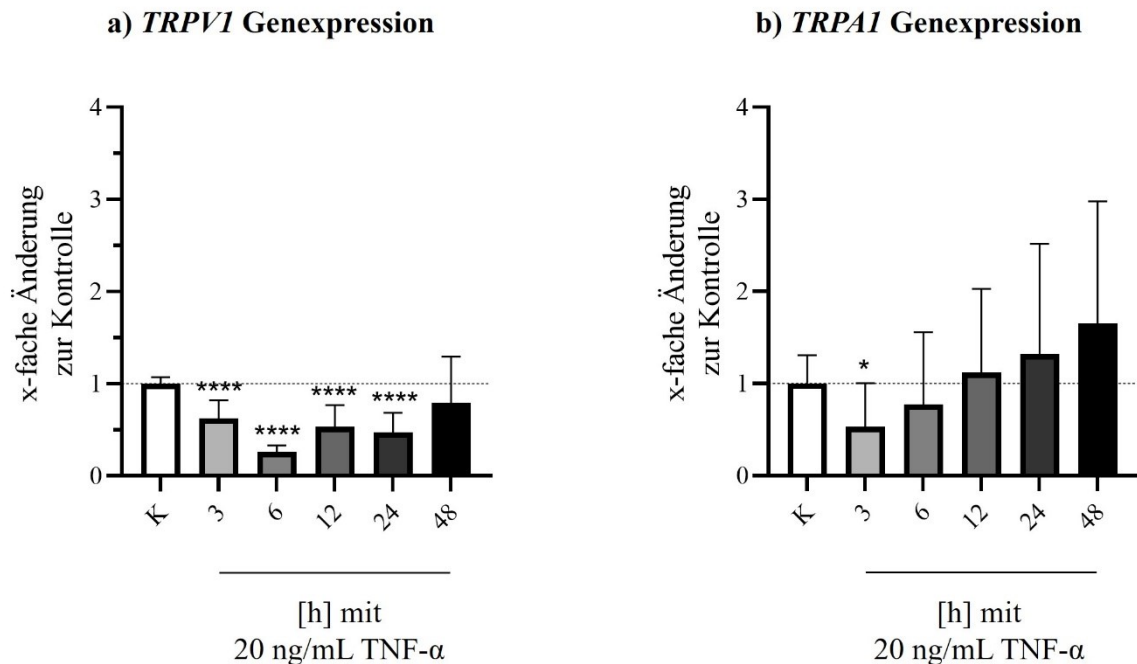


Abbildung 19: Relative Änderung der Genexpression von *TRPV1* (a) und *TRPA1* (b) in HaCaT-Zellen nach Behandlung mit 20 ng/mL TNF- α für unterschiedliche Dauer. HaCaT-Zellen wurden über einen Zeitraum von 4 Tagen unter Kontrollbedingungen kultiviert (niedriger Calciumgehalt: 0,06 mM Ca²⁺, EGF, BPE). Danach mit 20 ng/mL TNF- α behandelt und die Proben nach 3, 6, 12, 24 bzw. 48 h oder direkt (Kontrolle) entnommen. Die Daten sind zu den Referenzgenen *GAPDH* und *HPRT1* normalisiert und als prozentuale Abweichung zur Kontrolle K (0 h) dargestellt. Statistik: Mittelwert + SD; technische Replikate: 3; biologische Replikate: 5; Brown-Forsythe und Welch-ANOVA; * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$.

Die x-fache Änderung der Genexpression von *TRPV1* (Abbildung 19 a) war bei der Behandlungsdauer von 3 h bis 24 h signifikant im Vergleich zur Kontrolle verringert ($p < 0,0001$). Die stärkste Änderung der Genexpression von *TRPV1* wurde bei 6 h beobachtet, wobei diese um das $0,26 \pm 0,07$ -Fache im Vergleich zur Kontrolle reduziert war. Von 12 h auf 48 h stieg die x-fache Änderung der Genexpression im Vergleich zur Behandlungsdauer von 6 h wieder an. Die 6-stündige Behandlung mit TNF- α zeigte zudem eine signifikant niedrigere x-fache Änderung der Genexpression im Vergleich zur 12-stündigen, 24-stündigen und 48-stündigen Behandlungsdauer (Daten nicht gezeigt). Lediglich nach 48-stündiger Behandlung wurde keine signifikante x-fache Änderung der Genexpression von *TRPV1* im Vergleich zur Kontrolle festgestellt, wobei diese ebenfalls reduziert war. Die x-fache Änderung der Genexpression von *TRPA1* zeigte mit zunehmender Behandlungsdauer von TNF- α einen Anstieg im Vergleich zur Kontrolle. Allerdings wurde für die 3-stündige und 6-stündige Behandlung mit TNF- α eine um das $0,53 \pm 0,48$ -Fache signifikante ($p = 0,03$) bzw. um das

$0,78 \pm 0,78$ -Fache verringerte Genexpression im Vergleich zur Kontrolle festgestellt. Ab der 12-stündigen Behandlungsdauer mit 20 ng/mL TNF- α war die x-fache Änderung der Genexpression von *TRPA1* im Vergleich zur Kontrolle erhöht und nahm bei 48 h einen Wert von $1,65 \pm 1,32$ an. Ein signifikanter Effekt wurde dennoch nur bei der 3-stündigen Behandlung beobachtet. Basierend auf diesen Ergebnissen konnte kein zeitabhängiger Effekt der TNF- α Behandlung für die Genexpression von *TRPV1* und *TRPA1* abgeleitet werden. Wobei die x-fache Änderung der Genexpression von *TRPA1* mit der Zeit erhöhte Werte aufwies und für *TRPV1* über die gesamte Behandlungsdauer im Vergleich zur Kontrolle verringert war.

Um die Effekte der Agonisten und Antagonisten auf kurzfristige und langfristige (chronische) Entzündungsreaktionen in HaCaT-Zellen zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Zeitpunkte für die nachfolgenden Versuche festgelegt. Ein kurzfristiger Effekt sollte nach 6 h untersucht werden. Zu diesem Zeitpunkt wurde eine verringerte x-fache Änderung der Genexpression von *TRPV1* und *TRPA1* im Vergleich zur Kontrolle festgestellt (Abbildung 19). Ein langfristiger Effekt sollte anschließend nach 48-stündiger TNF- α Behandlung untersucht werden. Zu diesem Zeitpunkt war die x-fache Änderung der Genexpression von *TRPA1* im Vergleich zur Kontrolle erhöht (Abbildung 19 b). Auch die Freisetzung von IL-8 stieg in Abhängigkeit von der Zeit an (Abbildung 18 b) und wies nach 48-stündiger Behandlung - im Vergleich zur 6-stündigen Behandlung - eine signifikant erhöhte x-fache Änderung der Freisetzung von IL-8 auf ($p < 0,001$; Daten nicht gezeigt).

6.3.1 Einfluss der TRPV1 Agonisten bzw. Antagonisten auf die TNF- α induzierte Entzündungsreaktion in HaCaT-Zellen

Die Ergebnisse der RT-qPCR zur Messung der Genexpression von *CXCL8* und *TRPV1* nach 24-stündiger Behandlung mit 10 μ M Capsaicin (TRPV1 Agonist) und/oder 1 μ M Capsazepin (TRPV1 Antagonist) ohne anschließende TNF- α Behandlung, sind der Abbildung 20 zu entnehmen. Dieser Versuch dient als Kontrollbehandlung für die anschließende TNF- α Behandlung (Abbildung 21). Die x-fache Änderung der Genexpression ist jeweils auf die Lösungsmittelkontrolle (0,2 % DMSO, 1 % ddH₂O) bezogen.

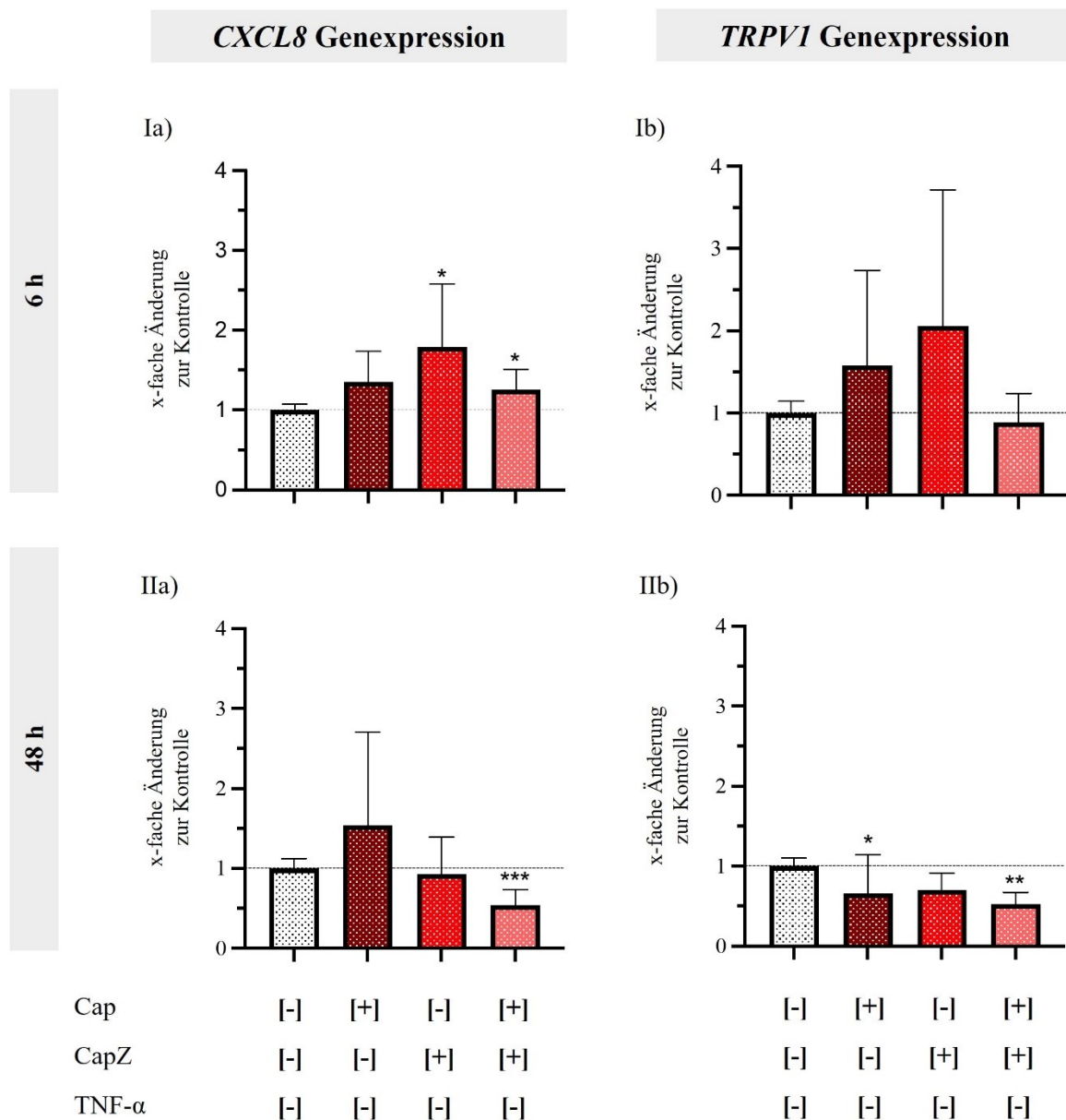


Abbildung 20: Relative Änderung der Genexpression von *CXCL8* (a) und *TRPV1* (b) nach 24-stündiger Vorbehandlung mit TRPV1 Agonist/ Antagonist und anschließender Kontrollbehandlung ohne TNF- α zu zwei Zeitpunkten (I, II). HaCaT-Zellen wurden über einen Zeitraum von 4 Tagen unter Kontrollbedingungen kultiviert (niedriger Calciumgehalt: 0,06 mM Ca²⁺, EGF, BPE) und anschließend für 24 h mit Agonist (10 μ M Capsaicin; gelöst in DMSO) und/oder Antagonist (1 μ M Capsazepin; gelöst in DMSO) von TRPV1 vorbehandelt. Die Proben wurden nach darauffolgender Kontrollbehandlung mit dem TNF- α Lösungsmittel (1 % ddH₂O) nach 6 h und 48 h entnommen. Die Daten sind zu den Referenzgenen *GAPDH* und *HPRT1* normalisiert und als prozentuale Abweichung zur Kontrolle (Vorbehandlung: 0,2 % DMSO; anschließende Behandlung 1 % ddH₂O) dargestellt. Statistik: Mittelwert + SD; technische Replikate: 3; biologische Replikate: 3; One-way ANOVA (Ib, IIb); Brown-Forsythe und Welch-ANOVA (Ia, IIa); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Cap: Capsaicin; CapZ: Capsazepin

Für die Genexpression von *CXCL8* wurde nach weiterer 6-stündiger Inkubation (Abbildung 20 a) im Anschluss an die Vorbehandlung mit Capsazepin bzw. der kombinierten Behandlung aus Capsaicin und Capsazepin, eine signifikant erhöhte x-fache Änderung der

Genexpression im Vergleich zur Kontrolle gezeigt ($1,79 \pm 0,79$ mit $p < 0,05$ bzw. $1,26 \pm 0,25$ mit $p = 0,04$). Die x-fache Änderung der Genexpression bei Behandlung mit Capsaicin allein erreichte dabei annähernd das Niveau der kombinierten Behandlung, allerdings ohne einen signifikanten Anstieg. Ein ähnlicher Trend ist für die Genexpression von *TRPV1* (Abbildung 20 Ib) zu beobachten. Die Behandlung mit Capsazepin induzierte dabei den größten Anstieg der x-fachen Änderung der Genexpression im Vergleich zur Kontrolle ($2,06 \pm 1,65$). Die kombinierte Vorbehandlung (Cap + CapZ) führte hingegen zu einer niedrigeren x-fachen Änderung der Genexpression im Vergleich zur Kontrolle ($0,89 \pm 0,35$). Für keine dieser Veränderungen wurde dabei ein signifikanter Effekt beobachtet.

Während zum Zeitpunkt von 6 h die x-fache Änderung der Genexpression von *CXCL8* und *TRPV1* im Vergleich zur Kontrolle anstieg (außer *TRPV1*-Genexpression bei kombinierter Behandlung aus Capsaicin und Capsazepin), wurde bei 48 h eine reduzierte Genexpression im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Nur die Behandlung mit Capsaicin (Abbildung 20 IIa) zeigte eine erhöhte Änderung der Genexpression von *CXCL8* im Vergleich zur Kontrolle ($1,54 \pm 1,17$). Die x-fache Änderung der Genexpression von *TRPV1* zum Zeitpunkt von 48 h (Abbildung 20 IIb) war für die Behandlung mit Capsaicin ($0,66 \pm 0,49$) sowie bei kombinierter Behandlung aus Capsaicin mit Capsazepin ($0,53 \pm 0,15$) signifikant im Vergleich zur Kontrolle verringert (mit $p = 0,04$ bzw. $p = 0,003$).

Der Abbildung 21 ist die x-fache Änderung der Genexpression von *CXCL8* und *TRPV1* bei zusätzlicher Behandlung mit 20 ng/mL TNF- α nach Vorbehandlung mit dem jeweiligen Agonisten bzw. Antagonisten zu entnehmen.

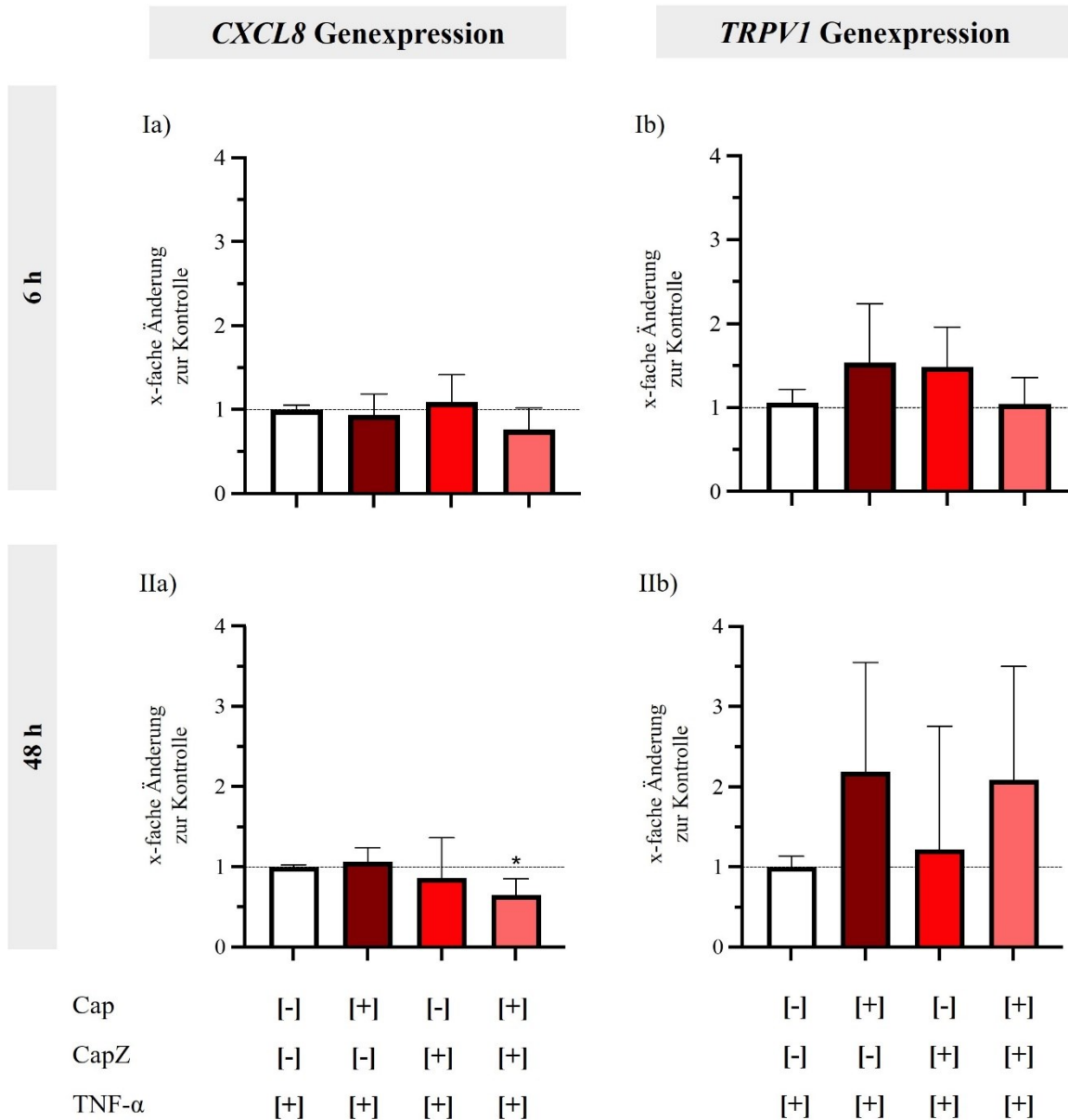


Abbildung 21: Relative Änderung der Genexpression von *CXCL8* (a) und *TRPV1* (b) nach 24-stündiger Vorbehandlung mit TRPV1 Agonist/ Antagonist und anschließender Behandlung mit TNF- α zu zwei Zeitpunkten (I, II). HaCaT-Zellen wurden über einen Zeitraum von 4 Tagen unter Kontrollbedingungen kultiviert (niedriger Calciumgehalt: 0,06 mM Ca $^{2+}$, EGF, BPE) und anschließend für 24 h mit Agonist (10 μ M Capsaicin; gelöst in DMSO) und/oder Antagonist (1 μ M Capsazepin; gelöst in DMSO) von TRPV1 vorbehandelt. Die Proben wurden nach darauffolgender Behandlung mit 20 ng/mL TNF- α (gelöst in ddH $_2$ O) nach 6 h und 48 h entnommen. Die Daten sind zu den Referenzgenen *GAPDH* und *HPRT1* normalisiert und als prozentuale Abweichung zur TNF- α Kontrolle (Vorbehandlung: 0,2 % DMSO; anschließende Behandlung 20 ng/mL TNF- α) dargestellt. Statistik: Mittelwert + SD; technische Replikate: 3; biologische Replikate: 3; One-way ANOVA (IIa); Brown-Forsythe und Welch-ANOVA (Ia, Ib); Kruskal-Wallis (IIb); * p < 0,05.

Cap: Capsaicin; CapZ: Capsazepin

Für die Genexpression von *CXCL8* wurde nach 6-stündiger sowie 48-stündiger TNF- α Behandlung kaum eine Änderung beobachtet. Dabei erreichte die Genexpression zum Zeitpunkt von 6 h (Abbildung 21 Ia) eine x-fache Änderung von $0,76 \pm 0,26$ (für Cap + CapZ) bis höchstens $1,09 \pm 0,33$ (für CapZ). Zum Zeitpunkt von 48 h (Abbildung 21 IIa) führte die kombinierte Vorbehandlung (Cap + CapZ) zu einer signifikant reduzierten x-fachen Änderung der Genexpression von $0,65 \pm 0,21$ im Vergleich zur TNF- α Kontrollbehandlung.

Bezüglich der Genexpression von *TRPV1* wurde zu keinem der beiden Zeitpunkte ein signifikanter Effekt durch die Vorbehandlungen beobachtet. Dabei war die x-fache Änderung der Genexpression von *TRPV1* bei alleiniger Behandlung mit Capsaicin sowie Capsazepin und anschließender 6-stündiger TNF- α Behandlung um das $1,53 \pm 0,70$ bzw. $1,48 \pm 0,48$ -Fache im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Das Expressionsniveau von *TRPV1* blieb durch die kombinierte Vorbehandlung (Cap + CapZ) nahezu unverändert im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 21 Ib). Nach 48-stündiger TNF- α Behandlung war die x-fache Änderung der Genexpression von *TRPV1* bei Vorbehandlung mit Capsaicin im Vergleich zur Kontrolle erhöht ($2,19 \pm 1,36$). Die Vorbehandlung mit der kombinierten Anwendung (Cap + CapZ) zeigte eine ähnlich hohe x-fache Änderung der Genexpression von $2,09 \pm 1,41$ (Abbildung 21 IIb).

Um Rückschlüsse auf eine pro- oder antiinflammatorische Wirkung schließen zu können, wurde die sezernierte Menge von IL-8 im Überstand des Zellkulturmediums mittels ELISA gemessen. Die Ergebnisse können der Abbildung 22 entnommen werden, wobei (a) die x-fache Änderung der freigesetzten Menge von IL-8 ohne weitere TNF- α Behandlung zeigt und (b) mit nachfolgender TNF- α Behandlung für jeweils 6 h und 48 h. Die x-fache Änderung der freigesetzten Menge an IL-8 ist dabei auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle K (a) bzw. TNF- α Kontrollbehandlung K_{TNF} (b) bezogen.

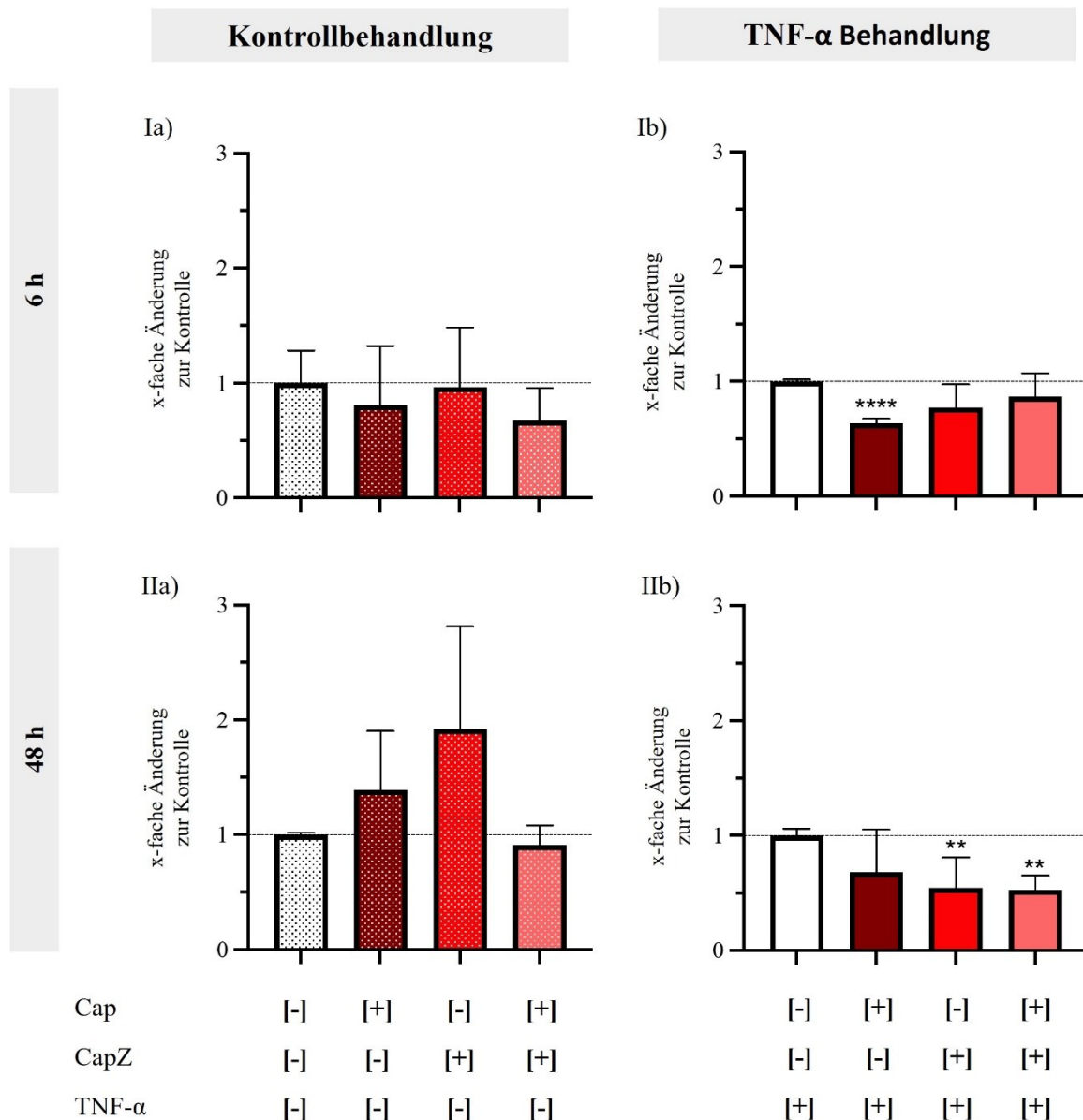


Abbildung 22: Bestimmung der relativen Änderung der Freisetzung von IL-8 mittels ELISA nach 24-stündiger Vorbehandlung mit TRPV1 Agonist/ Antagonist und anschließender Behandlung mit (b) oder ohne (a) TNF- α zu zwei Zeitpunkten (I, II). HaCaT-Zellen wurden über einen Zeitraum von 4 Tagen unter Kontrollbedingungen kultiviert (niedriger Calciumgehalt: 0,06 mM Ca^{2+} , EGF, BPE) und anschließend für 24 h mit Agonist (10 μM Capsaicin; gelöst in DMSO) und/oder Antagonist (1 μM Capsazepin; gelöst in DMSO) von TRPV1 vorbehandelt. Die Proben wurden nach darauffolgender Kontrollbehandlung mit dem TNF- α Lösungsmittel (1 % ddH₂O) oder TNF- α (20 ng/mL) nach 6 h und 48 h entnommen. Die Daten sind zu den Referenzgenen *GAPDH* und *HPRT1* normalisiert und als prozentuale Abweichung zur jeweiligen (a) Lösungsmittelkontrolle K (0,2 % DMSO; 1 % ddH₂O) bzw. (b) TNF- α Kontrolle K_{TNF} (0,2 % DMSO; 20 ng/mL TNF- α) dargestellt. Statistik: Mittelwert + SD; technische Replikate: 2; biologische Replikate: 3; One-way ANOVA (Ia, IIb); Brown-Forsythe und Welch-ANOVA (IIa, Ib); ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

Cap: Capsaicin; CapZ: Capsazepin

Für die IL-8 Freisetzung ohne weitere TNF- α Behandlung (Abbildung 22 Ia & IIa) wurde keine signifikanten Änderungen der IL-8 Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle zu beiden Zeitpunkten festgestellt. Die Behandlung mit Capsazepin zeigte dabei jeweils die größte

x-fache Änderung im Vergleich zur Kontrolle - mit einem Wert von $0,97 \pm 0,52$ bei 6 h bzw. $1,92 \pm 0,89$ bei 48 h. Auch für Capsaicin wurde bei 48 h eine erhöhte x-fache Änderung der IL-8 Freisetzung festgestellt ($1,39 \pm 0,51$). Dennoch konnte für diese Veränderungen kein signifikanter Effekt festgestellt werden. Bei der zusätzlichen Behandlung mit TNF- α wurde hingegen ein starker signifikanter Effekt bei 6-stündiger TNF- α Behandlung und Vorbehandlung mit Capsaicin festgestellt (Abbildung 22 Ib). Dabei war die IL-8 Freisetzung signifikant um das $0,63 \pm 0,04$ -Fache im Vergleich zur TNF- α Kontrolle reduziert ($p < 0,0001$). Für die anderen Behandlungen war die x-fache Änderung der IL-8 Freisetzung auch im Vergleich zur Kontrolle reduziert, aber die Effekte waren nicht signifikant. Hingegen wurde nach 48-stündiger TNF- α Behandlung (Abbildung 22 Iib) jeweils ein signifikanter Effekt bei der Capsazepin Behandlung sowie der kombinierten Behandlung (Cap + CapZ) festgestellt. Dabei war die Änderung der IL-8 Freisetzung bei Capsazepin um das $0,54 \pm 0,26$ -Fache (mit $p < 0,01$) bzw. bei kombinierter Behandlung um das $0,53 \pm 0,13$ -Fache (mit $p < 0,01$) im Vergleich zur TNF- α Kontrolle reduziert. Für die Behandlung mit Capsaicin wurde eine x-fache Änderung der IL-8 Freisetzung von $0,68 \pm 0,37$ beobachtet. Generell stimmen die Beobachtungen der IL-8 Freisetzung bei TNF- α Behandlung mit denen der *CXCL8*-Genexpression überein.

6.3.2 Einfluss des TRPA1 Agonisten bzw. Antagonisten auf die TNF- α induzierte Entzündungsreaktion in HaCaT-Zellen

Die Ergebnisse der RT-qPCR zur Messung der Genexpression von *CXCL8* und *TRPA1* nach 24-stündiger Behandlung mit 50 μ M Zimtaldehyd (TRPA1 Agonist) und/oder 1 μ M AP-18 (TRPA1 Antagonist) ohne anschließende TNF- α Behandlung, sind der Abbildung 23 zu entnehmen. Dieser Versuch dient als Kontrollbehandlung für die anschließende TNF- α Behandlung (Abbildung 24). Die x-fache Änderung der Genexpression ist jeweils auf die Lösungsmittelkontrolle (0,2 % DMSO, 1 % ddH₂O) bezogen.

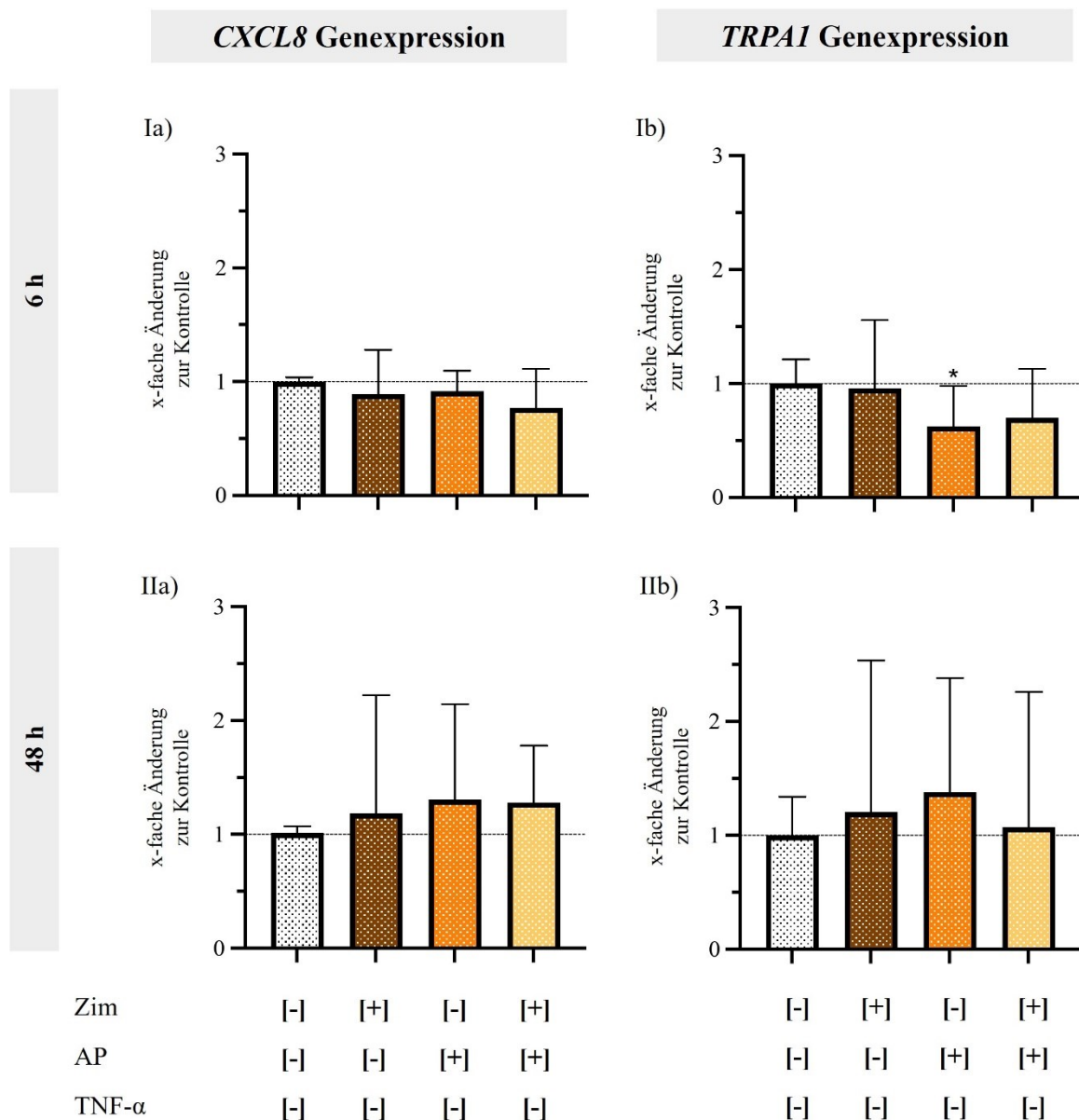


Abbildung 23: Relative Änderung der Genexpression von *CXCL8* (a) und *TRPA1* (b) nach 24-stündiger Vorbehandlung mit TRPA1 Agonist/ Antagonist und anschließender Kontrollbehandlung ohne TNF- α zu zwei Zeitpunkten (I, II). HaCaT-Zellen wurden über einen Zeitraum von 4 Tagen unter Kontrollbedingungen kultiviert (niedriger Calciumgehalt: 0,06 mM Ca²⁺, EGF, BPE) und anschließend für 24 h mit Agonist (50 μ M Zimtaldehyd; gelöst in DMSO) und/oder Antagonist (1 μ M AP-18; gelöst in DMSO) von TRPA1 vorbehandelt. Die Proben wurden nach darauffolgender Kontrollbehandlung mit dem TNF- α Lösungsmittel (1 % ddH₂O) nach 6 h und 48 h entnommen. Die Daten sind zu den Referenzgenen *GAPDH* und *HPRT1* normalisiert und als prozentuale Abweichung zur Kontrolle (Vorbehandlung: 0,2 % DMSO; anschließende Behandlung 1 % ddH₂O) dargestellt. Statistik: Mittelwert + SD; technische Replikate: 3; biologische Replikate: 4 - 5; One-way ANOVA (IIb); Brown-Forsythe und Welch-ANOVA (Ia, Ib, IIa); * p < 0,05.
 Zim: Zimtaldehyd; AP: AP-18

Für die x-fache Änderung der Genexpression von *CXCL8* wurde nach weiterer 6-stündiger und 48-stündiger Inkubation der HaCaT-Zellen (ohne TNF- α) keine signifikante Änderung der Genexpression beobachtet. Dabei erzielte die Genexpression zum Zeitpunkt von 6 h

(Abbildung 23 Ia) eine x-fache Änderung von $0,92 \pm 0,18$ (für AP-18) bis $0,77 \pm 0,35$ (für Zim + AP). Zum Zeitpunkt von 48 h (Abbildung 23 IIa) war die x-fache Änderung der Genexpression im Vergleich zur Kontrolle leicht erhöht und nahm Werte von $1,18 \pm 1,04$ (für Zim) bis höchstens $1,3 \pm 0,84$ (für AP) an. Auf einem ähnlichen Niveau befand sich die x-fache Änderung der Genexpression von *TRPA1* nach 48 h (Abbildung 23 IIb), wobei diese im Vergleich zur Kontrolle Werte von $1,07 \pm 1,19$ (für Zim + AP) bis $1,38 \pm 1,01$ (für AP-18) annahm und keine signifikanten Effekte zeigte. Beim Zeitpunkt von 6 h war die x-fache Änderung der *TRPA1*-Genexpression im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls reduziert. Für die Behandlung mit AP-18 wurde dabei ein signifikanter Effekt gezeigt, wobei die x-fache Änderung der *TRPA1*-Genexpression um $0,38 \pm 0,29$ geringer war im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$).

Der Abbildung 24 ist die x-fache Änderung der Genexpression von *CXCL8* und *TRPA1* bei zusätzlicher Behandlung mit 20 ng/mL TNF- α und nach Vorbehandlung mit den jeweiligen Agonisten bzw. Antagonisten zu entnehmen.

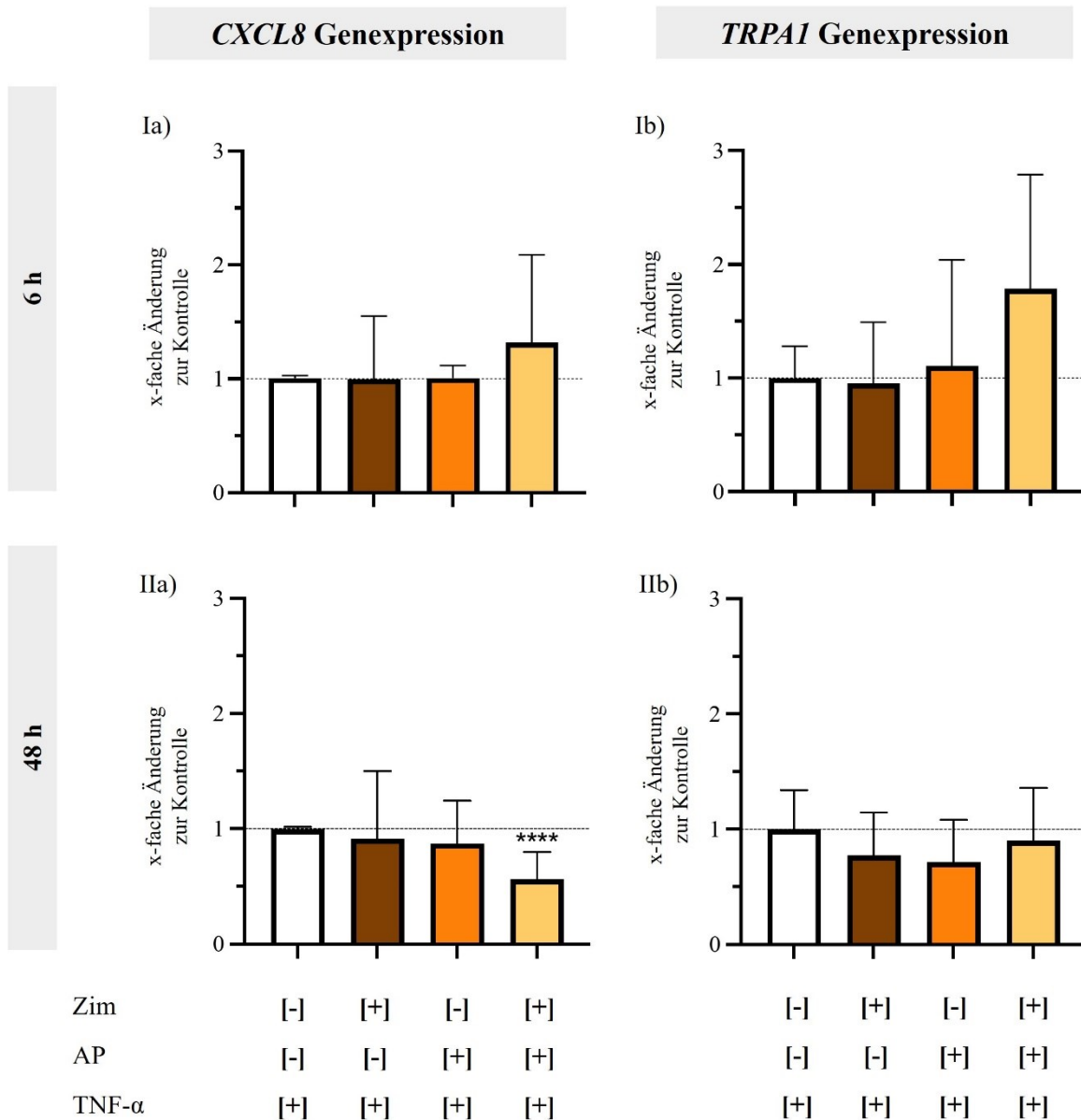


Abbildung 24: Relative Änderung der Genexpression von *CXCL8* (a) und *TRPA1* (b) nach 24-stündiger Vorbehandlung mit TRPA1 Agonist/ Antagonist und anschließender Behandlung mit TNF- α zu zwei Zeitpunkten (I, II). HaCaT-Zellen wurden über einen Zeitraum von 4 Tagen unter Kontrollbedingungen kultiviert (niedriger Calciumgehalt: 0,06 mM Ca²⁺, EGF, BPE) und anschließend für 24 h mit Agonist (50 μ M Zimtaldehyd; gelöst in DMSO) und/oder Antagonist (1 μ M AP-18; gelöst in DMSO) von TRPA1 vorbehandelt. Die Proben wurden nach darauffolgender Behandlung mit 20 ng/mL TNF- α (gelöst in ddH₂O) nach 6 h und 48 h entnommen. Die Daten sind zu den Referenzgenen *GAPDH* und *HPRT1* normalisiert und als prozentuale Abweichung zur TNF- α Kontrolle (Vorbehandlung: 0,2 % DMSO; anschließende Behandlung: 20 ng/mL TNF- α) dargestellt. Statistik: Mittelwert + SD; technische Replikate: 3; biologische Replikate: 4 (I) - 5 (II); One-way ANOVA (Ib, IIb); Brown-Forsythe und Welch-ANOVA (Ia, IIa); Kruskal-Wallis (Ib); **** $p < 0,0001$. Zim: Zimtaldehyd; AP: AP-18

Für die x-fache Änderung der Genexpression von *CXCL8* und *TRPA1* wurden nach 6-stündiger Behandlung mit TNF- α keine signifikanten Effekte beobachtet (Abbildung 24 I). Für beide Gene zeigte die kombinierte Vorbehandlung (Zim + AP) jeweils die größte x-fache Änderung der Genexpression nach 6 h. Diese war für *CXCL8* um das $1,31 \pm 0,77$ -Fache und für *TRPA1* um das $1,78 \pm 1,00$ -Fache im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle erhöht. Die anderen beiden Behandlungen zeigten nahezu kaum Veränderungen im Vergleich zur TNF- α Kontrolle. Nach 48-stündiger Behandlung mit TNF- α wurde schließlich ein signifikanter Effekt bei kombinierter Vorbehandlung aus Zimtaldehyd und AP-18 für die x-fache Änderung der Genexpression von *CXCL8* beobachtet (Abbildung 24 IIa). Diese war signifikant um $0,44 \pm 0,17$ im Vergleich zur TNF- α Kontrolle reduziert ($p < 0,0001$). Auch für die Behandlung mit Zimtaldehyd bzw. AP-18 wurde eine reduzierte x-fache Änderung der Genexpression von *CXCL8* sowie *TRPA1* im Vergleich zur TNF- α Kontrolle festgestellt. Die x-fache Änderung der Genexpression von *TRPA1* (Abbildung 24 IIb) nahm dabei Werte von $0,90 \pm 0,45$ (Zim + AP) bis $0,72 \pm 0,36$ (AP) im Vergleich zur TNF- α Kontrolle an.

Um Rückschlüsse auf eine pro- oder antiinflammatorische Wirkung schließen zu können, wurde die sezernierte Menge von IL-8 im Überstand des Zellkulturmediums mittels ELISA gemessen. Die Ergebnisse können der Abbildung 25 entnommen werden, wobei (a) die x-fache Änderung der freigesetzten Menge von IL-8 ohne weitere TNF- α Behandlung zeigt und (b) mit nachfolgender TNF- α Behandlung für jeweils 6 h und 48 h. Die x-fache Änderung der freigesetzten Menge an IL-8 ist dabei auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle K (a) bzw. TNF- α Kontrollbehandlung K_{TNF} (b) bezogen.

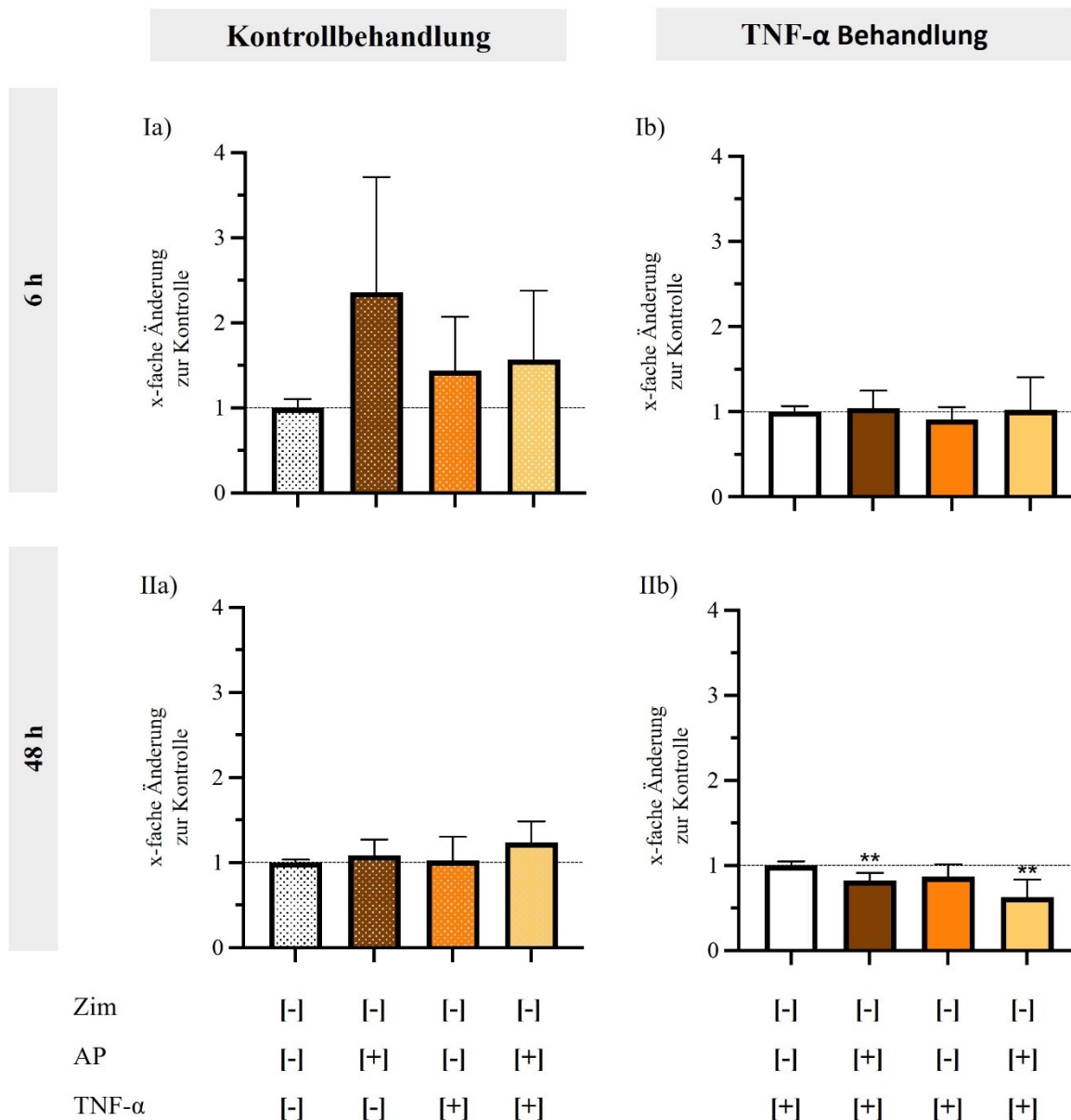


Abbildung 25: Bestimmung der relativen Änderung der Freisetzung von IL-8 mittels ELISA nach 24-stündiger Vorbehandlung mit TRPA1 Agonist/ Antagonist und anschließender Behandlung mit (b) oder ohne (a) TNF- α zu zwei Zeitpunkten (I, II). HaCaT-Zellen wurden über einen Zeitraum von 4 Tagen unter Kontrollbedingungen kultiviert (niedriger Calciumgehalt: 0,06 mM Ca^{2+} , EGF, BPE) und anschließend für 24 h mit Agonist (50 μM Zimtaldehyd; gelöst in DMSO) und/oder Antagonist (1 μM AP-18; gelöst in DMSO) von TRPA1 vorbehandelt. Die Proben wurden nach darauffolgender Kontrollbehandlung mit dem TNF- α Lösungsmittel (1 % ddH₂O) oder TNF- α (20 ng/mL) nach 6 h und 48 h entnommen. Die Daten sind zu den Referenzgenen *GAPDH* und *HPRT1* normalisiert und als prozentuale Abweichung zur jeweiligen (a) Lösungsmittelmittelkontrolle K (0,2 % DMSO; 1 % ddH₂O) bzw. (b) TNF- α Kontrolle K_{TNF} (0,2 % DMSO; 20 ng/mL TNF- α) dargestellt. Statistik: Mittelwert + SD; technische Replikate: 2; biologische Replikate: 4 - 5; One-way ANOVA (Ib); Brown-Forsythe und Welch-ANOVA (Ia, IIa, IIb); ** $p < 0,01$.
Zim: Zimtaldehyd; AP: AP-18

Für die IL-8 Freisetzung ohne TNF- α Behandlung (Abbildung 25 a) wurden keine signifikanten Änderungen im Vergleich zur Kontrolle zu beiden Zeitpunkten festgestellt. Zum Zeitpunkt von 6 h wurde bei Vorbehandlung mit Zimtaldehyd die größte x-fache Änderung

der IL-8 Freisetzung festgestellt, die einen Wert von $2,36 \pm 1,35$ im Vergleich zur Kontrolle annahm. Die Behandlung mit AP-18 sowie die kombinierte Vorbehandlung (Zim + AP) führten ebenfalls zu einer erhöhten x-fachen Änderung im Vergleich zur Kontrolle (mit $1,44 \pm 0,63$ bzw. $1,57 \pm 0,81$). Nach 48 h (Abbildung 25 IIa) waren die Unterschiede nur noch minimal und die IL-8 Freisetzung für alle drei Behandlungen nahezu auf dem Niveau der Kontrolle. Ebenso wurden nahezu keine Unterschiede der IL-8 Freisetzung durch die Vorbehandlungen nach 6-stündiger TNF- α Behandlung festgestellt (Abbildung 25 Ib), wobei die x-fache Änderung der IL-8 Freisetzung Werte zwischen $1,02 \pm 0,28$ (AP) und $1,24 \pm 0,25$ (Zim + AP) annahm. Nach 48-stündiger TNF- α Behandlung (Abbildung 25 IIb) war die x-fache Änderung der IL-8 Freisetzung im Vergleich zur TNF- α Kontrolle über alle Vorbehandlungen reduziert. Bei der Behandlung mit Zimtaldehyd wurde eine um $0,18 \pm 0,07$ ($p \leq 0,01$) signifikant reduzierte x-fache Änderung der IL-8 Freisetzung im Vergleich zur TNF- α Kontrolle festgestellt. Auch die kombinierte Vorbehandlung (Zim + AP) zeigte eine um $0,37 \pm 0,15$ ($p < 0,01$) signifikant reduzierte x-fache Änderung der IL-8 Freisetzung im Vergleich zur TNF- α Kontrolle.

7 Diskussion

Dieser Arbeit liegen die Hypothesen zugrunde, dass die Aktivierung von TRPV1 - durch den Agonisten Capsaicin - TNF- α induzierte Entzündungsreaktionen in humanen basalen Keratinozyten abschwächt, während die Aktivierung von TRPA1 - durch Zimtaldehyd - derartige Entzündungsreaktionen verstärkt. Um diese Hypothesen zu beantworten, wurden HaCaT-Zellen als Modell verwendet. Mithilfe von MTT-Tests wurden geeignete Konzentrationen der Agonisten bzw. Antagonisten ermittelt sowie für TNF- α . Die TNF- α Behandlung wurde durch weitere Versuche (RT-qPCR und ELISA), die unterschiedliche Konzentrationen sowie eine unterschiedliche Behandlungsdauer umfassten, optimiert. Schließlich wurden die HaCaT-Zellen mit den Agonisten bzw. Antagonisten oder einer Kombination aus beiden für 24 h vorbehandelt und anschließend mit oder ohne 20 ng/mL TNF- α für weitere 6 h bzw. 48 h behandelt. Danach wurde mithilfe der RT-qPCR die Genexpression von *TRPV1*, *TRPA1* und *CXCL8* ermittelt. Zudem wurde im Überstand des Zellkulturmediums die von den Zellen sezernierte Menge an IL-8 mittels ELISA gemessen. Die Ergebnisse dieser Versuche werden in den folgenden Kapiteln diskutiert.

7.1 Einfluss von TNF- α auf die Zellvitalität

Die Ergebnisse des MTT-Tests zeigten eine zum Teil signifikant erhöhte Zellvitalität der HaCaT-Zellen nach Behandlung mit TNF- α , obwohl TNF- α neben der Vermittlung von entzündungsfördernden Prozessen auch mit der Induktion von Apoptose im Zusammenhang steht. Eine erhöhte Zellvitalität in HaCaT-Zellen nach TNF- α Behandlung (10 ng/mL über 48 h) wurde bereits in anderen Studien berichtet (Wu et al., 2020). Teilweise wurde von einer Resistenz der HaCaT-Zellen gegenüber TNF- α ausgelöster Apoptose ausgegangen (Reinartz et al., 1996). Die Wirkungen von TNF- α unterliegen einer Reihe von Signalwegen, die an dieser Stelle nicht erforscht wurden, aber eine Erklärung für die erhöhte Zellvitalität darstellen.

Die Signalisierung von TNF- α erfolgt in humanen Keratinozyten vorwiegend über TNFR1, der im Gegensatz zu TNFR2 ein höheres Expressionsniveau aufweist (Lisby et al., 2007). TNFR1 ist durch sogenannte Todesdomänen gekennzeichnet, welche spezielle Protein-Protein-Interaktionsdomänen darstellen, die für apoptotische Signalwege essenziell sind (Heinrich, Koch & Brix, 2014). Durch Bindung an TNFR1 erfolgt die Aktivierung des

Transmembran-Signalkomplexes I, der die Transkription von antiapoptotischen, proinflammatorischen und katabolen Genen induziert, indem NF- κ B-Signalwege oder MAP-Kinasen (JNK, p38, ERK) aktiviert werden. Ebenso kann TNFR1, aber nicht TNFR2, Apoptose über Caspase-8-Signalwege auslösen, die über Aktivierung des Transmembran-Signalkomplexes II - auch DISC („death inducing signalling complex“) genannt- signalisiert werden (zusammengefasst von van Herreweghe et al., 2010). MAP-Kinasen sind neben der Vermittlung des Zellüberlebens wesentlich an der Regulation der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und -motilität beteiligt (zusammengefasst von Roux & Blenis, 2004). Somit wurde TNF- α über die Vermittlung von pro- und antiapoptotischen Signalen auch eine Rolle bei der Wundheilung, Zellproliferation und -differenzierung zugeschrieben (Banno et al., 2004). Wobei zwischen Wirkungen von TNF- α während der akuten Wundheilung und nachteiligen Effekten während chronischer Wunden differenziert werden muss (zusammengefasst von Sim et al., 2022). Eine Studie von Banno et al. (2004) zeigte, dass TNF- α in primären Keratinozyten Veränderungen im Aktinzytoskelett induzierte und die Zellmigration förderte, wodurch eine Beteiligung an der Zellreparatur und Zellregeneration von TNF- α möglich sein kann (Banno et al., 2004). Kumari et al. (2014) zeigten, dass der über TNFR1 vermittelte NF- κ B-Signalweg vermutlich entscheidend ist, um das Zellüberleben von Keratinozyten zu vermitteln, der bei Hemmung zur Auslösung der Apoptose und Entzündungsreaktionen beiträgt (Kumari et al., 2014; zusammengefasst von Sim et al., 2022). Die genaue Rolle von TNF- α bezüglich immunmodulatorischer Wirkungen und der daran beteiligten Vermittlung des Zelltodes (über Apoptose oder Nekroptose) ist äußerst komplex und bedarf in Zusammenhang mit der chronischen Wundheilung und entzündungsassoziierten Erkrankungen weiterer Forschung (zusammengefasst von Sim et al., 2022).

Letztlich diene der hier durchgeführte MTT-Test dazu festzustellen, ob die verwendeten Dosen von TNF- α toxische Wirkungen in HaCaT-Zellen induzieren, sodass geringere Dosen gerechtfertigt wären. Diese konnten nicht festgestellt werden, weshalb davon ausgegangen wird, dass die verwendete Konzentration von 20 ng/mL TNF- α keine toxischen negativen Wirkungen in den HaCaT-Zellen während der nachfolgenden Versuche induziert.

7.2 Einfluss von TNF- α auf die Genexpression und Freisetzung von CXCL8/IL-8

Die gezeigten dosisabhängigen Effekte der TNF- α Behandlung auf die CXCL8/IL-8 Genexpression und Freisetzung (Abbildung 16 & 17) stehen im Einklang mit Daten aus der Literatur (Cen et al., 2007; Chiricozzi et al., 2011). Während die Induktion der Genexpression von CXCL8 durch TNF- α bereits durch andere Studien gezeigt wurde, liegen kaum Studien vor, die unterschiedliche Konzentrationen und Behandlungszeiträume von TNF- α auf die CXCL8/IL-8 Genexpression und Sekretion testen - was den Gegenstand dieser Arbeit darstellt. Die durch TNF- α induzierten Entzündungsreaktionen in HaCaT-Zellen werden häufig verwendet, um die Pathogenese entzündlicher Hauterkrankungen zu untersuchen. Dabei wird TNF- α als Schlüsselfaktor für die Ausbildung zahlreicher entzündlicher Erkrankungen angesehen (Banno et al., 2004).

Die Ergebnisse der CXCL8-Genexpression zeigten bereits nach 3 h einen raschen sowie den höchsten Anstieg, der über einen Zeitraum von 48 h gemessen wurde. Banno et al. (2004) zeigten, dass epidermale Keratinozyten sehr frühe Immun- und Entzündungsreaktionen bei Behandlung mit TNF- α aufweisen. Diese beinhalteten bereits nach 1-4 h eine schnelle Reaktion auf TNF- α , indem die Expression von Genen reguliert wurde, die zur Freisetzung von Chemokinen beitragen und damit verbunden die Chemotaxis und Entzündungsreaktionen einleiten (Banno et al., 2004). Interessanterweise war der hier beobachtete zeitabhängige Effekt der Freisetzung von IL-8 genau umgekehrt zur Genexpression und zeigte zu Beginn (3 h) die niedrigste Erhöhung, während nach 48 h der stärkste Anstieg der x-fachen Änderung im Vergleich zur Kontrolle beobachtet wurde. Die CXCL8/IL-8 Genexpression und Freisetzung wird durch eine Reihe von Mechanismen reguliert, die in dieser Arbeit zwar nicht untersucht wurden, aber eine Erklärung für die beobachteten zeitabhängigen Effekte darstellen können. Diese wurden in wissenschaftlichen Übersichtsarbeiten von Ha et al. (2017) und Hoffmann et al. (2002) diskutiert, auf die im Folgenden kurz eingegangen wird. Die CXCL8 Promotorregion umfasst eine NF- κ B -Bindungsstelle, die für die Induktion essentiell ist und weitere CAAT/Enhancer bindende Protein (C/EBP) sowie eine AP-1 Bindungsstelle, die nicht essentiell aber für eine maximale Genexpression notwendig sind. Im nicht-stimulierten Zustand erfolgt die Repression der CXCL8 Promotorregion über folgende Mechanismen: Blockierung der NF- κ B-Bindungsstelle über Bindung des NF- κ B Repressing Faktors an das negative regulatorische Element NRE; Bindung des Oktamer-1 an die Oktomerbindungsstelle, wodurch die C/EBP-Bindungsstelle am gegenüberliegenden Komplementärstrang blockiert wird; Deacetylierung von Histonproteinen, durch Histon-Deacetylase

1. Infolge eines Stimulus, der durch TNF- α induziert werden kann, wird die Transkription von *CXCL8* durch verschiedene Transkriptionsfaktoren eingeleitet. NF- κ B translokalisiert in den Zellkern und bindet unmittelbar neben dem NF- κ B Repressing Faktor an die DNA. NF- κ B und AP-1 werden phosphoryliert und dienen als Transaktivatoren für die Genexpression. Das CAAT/enhancer-binding protein β (C/EBP β) ersetzt das Oktamer-1 und bindet ebenfalls an die Promotorregion. Zusätzlich wird das Histon acetyliert und die Derepression der Promotorregion gefördert. Insgesamt scheinen alle beteiligten Proteine miteinander zu interagieren und eine Art Enhanceosom zu bilden, welches durch einen optimalen Kontakt mit dem RNA-Polymerase 2 Holoenzym schließlich eine maximale Gentranskription ermöglicht (zusammengefasst von Ha et al., 2017; Hoffmann et al., 2002). Die Bildung dieses Multiproteinkomplexes wird durch NF- κ B-, JNK- und ERK-Signalwege vermittelt, deren Phosphorylierung und Aktivierung wiederum über die Bindung von TNF- α auf der Zelloberfläche vermittelt werden (zusammengefasst von Hoffmann et al., 2002).

Für eine maximale Hochregulation der *CXCL8* Expression sind neben der Derepression der Promotorregion weitere Faktoren notwendig, die in der Übersichtsarbeit von Hoffmann et al. (2002) dargestellt werden: Die Aktivierung des NF- κ B-Signalweges ist dabei vermutlich essentiell für die mRNA-Synthese, führt aber erst gemeinsam mit dem MAP-Kinase vermittelten JNK-Signalweg (und ERK) zu einer moderaten mRNA-Synthese. Neben diesen Prozessen ist die Stabilisierung der mRNA für eine signifikante Steigerung der IL-8 Synthese notwendig, die über einen MAP-Kinase vermittelten p38-Signalweg erfolgt. Der Abbau der mRNA wird über Adenosin/Uridin-reiche Elemente (ARE) auf der *CXCL8*-mRNA gesteuert, auf die auch der p38-MAPK-Signalweg zur Stabilisierung abzielt (zusammengefasst von Hoffmann et al., 2002). Mitglieder der p38-Familie werden in verschiedenen Zellen und Geweben unterschiedlich reguliert und ebenso kann die Aktivität der ARE durch entzündliche Zustände verstärkt werden (Lin et al., 2015; zusammengefasst von Herlaar & Brown, 1999). Vaccini et al. (2018) haben geschlossen, dass derartige verschiedene Faktoren die Expression und Freisetzung von *CXCL8*/IL-8 mitsteuern und somit unterschiedliche Ergebnisse zwischen verschiedenen Versuchsbedingungen und Modellen auftreten lassen. Zudem existieren posttranslationale Regulationsmechanismen. In Gegenwart eines entzündlichen Milieus sind Endothelzellen, Monozyten und Fibroblasten in der Lage, N-terminale Isoformen von IL-8 zu produzieren, wodurch die Aktivität von IL-8 posttranslational modifiziert werden kann und dadurch die chemotaktischen Eigenschaften moduliert werden können (Vacchini et al., 2018).

Diese komplexen Regulationsmechanismen können zur Erklärung beitragen, wieso die x-fache Änderung der Freisetzung von IL-8 im Vergleich zur Kontrolle erst nach 48 h eine maximale Änderung erreichte und eine erhöhte Genexpression nicht automatisch eine zeitgleich erhöhte Proteinproduktion bedeutet. Demnach wird die IL-8 Produktion vor allem transkriptionell und posttranslational reguliert, sodass die gebildete mRNA zum Zeitpunkt von 3 h womöglich zum Teil wieder abgebaut und nicht durch den p38-Signalweg stabilisiert wurde. Dies würde zudem bedeuten, dass erst eine längere Anwendung von TNF- α zu einer erhöhten chronischen Freisetzung von IL-8 führt und die Entzündungsreaktionen verstärkt.

7.3 Einfluss von TNF- α auf die Genexpression von *TRPV1* und *TRPA1*

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine TNF- α induzierte Hochregulation der *TRPA1*-Genexpression in HaCaT-Zellen unter Kulturbedingungen mit niedrigem Calciumgehalt. Aufgrund von Varianzen zwischen den biologischen Replikaten konnten keine signifikanten dosis- und zeitabhängigen Effekte der TNF- α Behandlung beobachtet werden. Dennoch zeigte sich eine erhöhte x-fache Änderung der Genexpression von *TRPA1*, die bei Behandlung mit 20 ng/mL TNF- α (für 48 h) signifikant im Vergleich zur Kontrolle erhöht war und mit der Zeit anstieg (Abbildung 17 & 19). Diese Ergebnisse sind mit denen von Luostarinen et al. (2021) vereinbar. In der dort durchgeführten Studie wurde eine signifikante dosis- und zeitabhängige Hochregulation der Genexpression von *TRPA1* in humanen Keratinozyten unter Behandlung mit TNF- α (20 ng/mL für 2 - 48 h bzw. 0,2 - 20 ng/mL für 24 h) festgestellt. Diese Hochregulation wurde insbesondere auf eine Aktivierung des entzündlichen Signalweges NF- κ B zurückgeführt und weitere Studien belegen, dass Bindungsstellen von NF- κ B im humanen *TRPA1* Promotor existieren (Hatano et al., 2012; Luostarinen et al., 2021). Ebenso wurde eine Beteiligung der JNK- und MAPK-Signalwege an der Hochregulation von *TRPA1* vorgeschlagen, was aus weiteren Versuchen mit entsprechenden Inhibitoren abgeleitet worden ist, die eine derartige Hochregulation von *TRPA1* unterdrückten (Luostarinen et al., 2021). Der bei Aktivierung des Kanals induzierte Calciumeinstrom durch TRPA1 kann wiederum die Genexpression von Entzündungsfaktoren regulieren (Bootman, 2012). Damit steht TRPA1 in besonderem Maß mit entzündlichen Signalwegen in Verbindungen, die eine gegenseitige Regulation bedingen können. Die *TRPV1*-Genexpression wurde in der hier vorliegenden Arbeit unter dem Einfluss von TNF- α weniger bis gar nicht beeinflusst

und zeigte bei einer Konzentration von 20 ng/mL TNF- α eine signifikant verringerte x-fache Änderung der Genexpression im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 17).

Die Mechanismen, die die Genexpression regulieren, sind nicht vollständig verstanden und wurden an dieser Stelle nicht weiter erforscht. Einige Erklärungsansätze können dafür angeführt werden. So könnte beispielsweise die Phosphorylierung von TRPV1 eine schnelle Kanalinsertion an die Membranoberfläche induzieren (X. Zhang et al., 2005) - dieser Mechanismus wird in Kapitel 7.4.2 genauer diskutiert. Eine Aktivierung des p38-MAPK-Signalweges, welcher unter entzündlichen Zuständen auftritt, kann eine erhöhte Proteinexpression von TRPV1 in sensorischen Neuronen auslösen (Ji et al., 2002). Ji et al. (2002) haben dabei auch gezeigt, dass erhöhte Proteinlevel nicht immer mit einer erhöhten mRNA-Expression einhergehen müssen. Verschiedene translationale und posttranslationale Modifikationen können zu diesen Diskrepanzen führen. Insbesondere durch p38 konnte ein erhöhter Transport von TRPV1 sowie eine erhöhte Translation induziert werden, ohne dabei die mRNA-Menge auf Transkriptionsebene zu beeinflussen (Ji et al., 2002). Derartige Faktoren können die Aktivität von TRPV1 beeinflussen, die auf Transkriptionsebene nicht sichtbar wäre.

Letztlich unterstützen diese Ergebnisse aber die Hypothesen, dass TRPV1 und TRPA1 in unterschiedlicher Weise an der Regulation von inflammatorischen Signalwegen beteiligt sein könnten, indem TNF- α einerseits die Hochregulation der *TRPA1*-Genexpression (zumindest mit steigender Dauer) induziert und andererseits eine Herunterregulation der *TRPV1*-Genexpression induziert, wodurch proinflammatorische Entzündungsreaktionen unterstützt werden. Es ist möglich, dass diese Beobachtungen nicht für alle Zellmodelle zutreffen und die Genexpression von *TRPV1* dabei unterschiedlich durch Entzündungsreaktionen reguliert wird. Wie bereits beschrieben führten einige Studien diesbezüglich zu Diskrepanzen (zusammengefasst von Alawi & Keeble, 2010; Silverman et al., 2020). So wurde eine erhöhte Genexpression von TRPV1 - insbesondere in Nervenfasern - mit proinflammatorischen und schmerzassoziierten Erkrankungen in Verbindung gebracht, während ebenso eine verringerte Genexpression in verschiedenen Geweben mit proinflammatorischen Erkrankungen einhergeht (zusammengefasst von Alawi & Keeble, 2010).

Diese Daten sprechen unter anderem dafür, dass die Genregulation von *TRPV1* einen Einfluss auf entzündliche Zustände hat oder selbst unter dem Einfluss dieser steht. Es wurde allgemein beschrieben, dass eine Imbalance zwischen antiinflammatorischen und proinflammatorischen Zytokinen - zugunsten von proinflammatorischen - zur Aufrechterhaltung

von Entzündungen und der Schmerzwahrnehmung beiträgt, an der die vermittelte TRP-Signalisierung beteiligt sein kann (zusammengefasst von Uçeyler et al. 2009).

7.4 Effekte der Modulation von TRPV1 und TRPA1 auf TNF- α induzierte Entzündungsreaktionen

Um die Hypothese zu prüfen, ob die Modulation von TRPV1 und TRPA1 durch die spezifischen Agonisten einen Effekt auf die TNF- α induzierte Entzündungsreaktion in nicht-neuronalen basalen Keratinozyten hat, wurde eine Vorbehandlung der HaCaT-Zellen mit Agonisten bzw. Antagonisten und anschließender TNF- α Behandlung durchgeführt. Während die vorangegangenen Experimente notwendig waren, um die Rahmenbedingungen der Behandlungen festzulegen, stellen diese Experimente die Hauptuntersuchung dieser Arbeit dar, deren Ergebnisse im Folgenden diskutiert werden.

7.4.1 Einfluss der TRPV1 Modulation auf Entzündungsreaktionen

Die Vorbehandlung der HaCaT-Zellen mit Capsaicin bzw. Capsazepin - ohne weitere TNF- α Behandlung - zeigte eine erhöhte x-fache Änderung der Genexpression von *CXCL8* bei Behandlung mit Capsazepin nach weiteren 6 h (signifikanter Effekt) und Capsaicin nach weiteren 48 h (Abbildung 20a). Da keine Behandlung mit dem Entzündungsmediator TNF- α stattgefunden hat, haben die HaCaT-Zellen womöglich auf die Behandlung an sich reagiert, die unter anderem durch den Wechsel des Zellkulturmediums und der Veränderung der Umgebung zur Auslösung von Stress beigetragen haben kann und so mitverantwortlich für eine erhöhte *CXCL8*-Genexpression war. Ein proinflammatorischer Effekt ist dabei nicht lediglich aufgrund einer veränderten *CXCL8*-Genexpression abzuleiten. Zudem wurde eine relativ große Standardabweichung ($\pm 1,14$) der x-fachen Änderung der Genexpression bei Vorbehandlung mit Capsaicin beobachtet, die letztlich auch keinen signifikanten Effekt induzierte. Die Stimulation von HaCaT-Zellen mit Capsaicin könnte eine vorübergehende Entzündungsreaktion ausgelöst haben, die aus der bekannten algogenen Wirkung von Capsaicin resultiert, aber in ihrer Stärke nicht mit den TNF- α induzierten Entzündungsreaktionen vergleichbar ist.

Interessanterweise wurde durch die kombinierte Vorbehandlung aus Capsaicin und Capsazepin ein signifikanter Effekt bezüglich der Genexpression von *CXCL8* und *TRPV1* ohne

TNF- α Behandlung beobachtet (Abbildung 20 II). Dabei war die x-fache Änderung der Genexpression jeweils nach 48 h signifikant reduziert. Demnach könnten die Einzeleffekte der Verbindungen durch die kombinierte Anwendung von Agonisten und Antagonisten aufgehoben worden sein, wodurch generell auf einen Effekt des Agonisten und Antagonisten von TRPV1 zurückgeschlossen werden könnte.

Die Wirkungen von Agonisten und Antagonisten weisen in vivo eine große Komplexität auf, die in verschiedenen Studien beschrieben wurde. So können unterschiedliche Interaktionspunkte und eine unterschiedliche Aktivierungskinetik die Modulation von TRPV1 beeinflussen, die je nach Milieu und zeitlich variieren kann (zusammengefasst von Blumberg et al., 2011). Unter anderem wurde gezeigt, dass Capsazepin auch eine Hitze- und Protonen-induzierte Aktivierung von TRPV1 hemmt (McIntyre et al., 2001). Capsazepin fungiert als kompetitiver Antagonist von Capsaicin, was nicht zwangsläufig heißt, dass die gesamte Kanalaktivität auf andere Reize gehemmt wird (zusammengefasst von Blumberg et al., 2011). Beispielsweise wurde die durch Hitze-induzierte Aktivierung von TRPV1 durch Capsazepin (1 μ M) stärker bei humanem TRPV1 gehemmt als bei Ratten (McIntyre et al., 2001).

Die beobachtete erhöhte x-fache Änderung der Genexpression von *TRPV1* unter Capsazepin Behandlung (Abbildung 20 Ib) kann nicht auf eine Aktivierung des Kanals zurückgeführt werden. Es wurde lediglich die Genexpression der Kanäle und nicht die Calciummobilisierung, die durch diese induziert wird, gemessen. Die Genregulation kann durch verschiedene Faktoren kurzfristig beeinflusst worden sein, die sowohl mit der Behandlung an sich als auch mit unspezifischen Faktoren zusammenhängen können. Letztlich wurde langfristig (nach 48 h) keine erhöhte x-fache Änderung der Genexpression mehr beobachtet - dies trifft für alle Vorbehandlungen zu. Insbesondere nach 6 h waren Unterschiede zwischen den Vorbehandlungen auf die x-fache Änderung der Genexpression sichtbar. Möglicherweise war eine langfristige Beeinflussung der Genexpression durch Capsaicin und Capsazepin nicht möglich.

Bei zusätzlicher 6-stündiger und 48-stündiger Behandlung mit TNF- α wurden kaum Veränderungen bezüglich der x-fachen Änderung der *CXCL8*-Genexpression durch die Vorbehandlungen mit Capsaicin oder Capsazepin beobachtet (Abbildung 21a). Wie bereits in den vorangegangenen Versuchen gezeigt, induziert TNF- α sehr wohl eine erhöhte Genexpression von *CXCL8* in den HaCaT-Zellen (mit einem Unterschied von einer 10er Potenz zwischen Kontrollbehandlung und TNF- α Behandlung, siehe Abbildung 16). In diesem Fall

haben die Vorbehandlungen vermutlich keinen Einfluss auf die Erhöhung der Genexpression genommen. Möglicherweise reichte die 24-stündige Behandlung mit dem Agonisten bzw. Antagonisten nicht aus, um eine veränderte Genexpression signifikant zu beeinflussen. Ebenso könnten die HaCaT-Zellen eine viel schnellere Reaktion auf TNF- α gezeigt haben, die nach 6 h nicht mehr sichtbar war und sich bereits wieder normalisierte.

Bezüglich der *TRPV1*-Genexpression (Abbildung 21b) können ebenfalls keine Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Dabei zeigten einzelne Replikate eine erhöhte x-fache Änderung der Genexpression von *TRPV1* bei Vorbehandlung mit Capsaicin bzw. der kombinierten Vorbehandlung und 48-stündiger TNF- α Behandlung (Abbildung 21 IIb). Aufgrund der hohen Varianzen bleibt die Interpretation dieser Daten erschwert. Weiterführende Untersuchungen wären diesbezüglich notwendig gewesen, wobei durch die Messungen zu weiteren Zeitpunkten möglicherweise signifikante Effekte erfasst werden könnten.

Die Ergebnisse zur Messung der IL-8 Freisetzung zeigen keinen Unterschied der relativen Freisetzung von IL-8 im Vergleich zur Kontrolle bei Behandlung mit dem TRPV1 Agonisten bzw. Antagonisten ohne TNF- α Behandlung (Abbildung 22a). Dabei wurden zum Teil hohe Varianzen beobachtet, wobei insbesondere nach der Behandlung mit Capsazepin zum Zeitpunkt von 48 h (Abbildung 22 IIa) einzelne Replikate erhöhte Werte bezüglich der x-fachen Änderung der IL-8 Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle aufwiesen. Aussagen bezüglich einer pro- oder antiinflammatorischen Wirkung können durch diese Untersuchung nicht getroffen werden. Möglicherweise wäre eine Messung der IL-8 Konzentration zu weiteren Zeitpunkten notwendig gewesen, um eine (akute) Reaktion der Agonisten bzw. Antagonisten zu untersuchen. Beispielsweise wird beim Menschen durch die topische Anwendung von hochkonzentriertem Capsaicin (z.B. 8 %) auf der Haut ein schmerzhaftes, brennendes Gefühl ausgelöst. Diese Nebenwirkung kann durch wiederholte Anwendung von niedrigen Konzentrationen oder einer kontrollierten Freisetzung aus beispielsweise Nanopartikeln reduziert werden, wobei zu Beginn ein brennendes Gefühl auftreten kann, welches sich nach einiger Zeit (z.B. nach 3 h bei Anwendung von 5,8 % Capsaicin in Form von Nanopartikeln) wieder auflöst (Malewicz et al., 2022; zusammengefasst von Arora et al., 2021).

Für TRPV1 existieren zudem Spleißvarianten, wobei eine *TRPV1b*-Variante in humanen Keratinozyten entdeckt wurde (Pecze et al., 2008). Die Gencodierung dieser Variante lässt keine Rückschlüsse darauf ziehen, dass die hier verwendeten Primer für die Spleißvariante

codieren. Allerdings wurde auch nicht überprüft, ob die *TRPV1b*-Variante in den hier verwendeten HaCaT-Zellen auf Gen- oder Proteinebene exprimiert wird und damit Einfluss auf die Effekte von Capsaicin nehmen könnte. So zeigten Vos et al. (2006), dass *TRPV1b* bei Koexpression mit *TRPV1* in menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK-293) zur Bildung von Komplexen führt und auf diese Weise dazu beitragen kann, die Aktivierung von TRPV1 durch Capsaicin (1 μ M) zu hemmen (Vos et al., 2006). Somit wären beobachtete bzw. nicht beobachtete Effekte von Capsaicin möglicherweise auf TRPV1-unabhängige Mechanismen in HaCaT-Zellen zurückzuführen. Weitere Untersuchungen wären diesbezüglich notwendig gewesen, um das Auftreten und den Einfluss einer Spleißvariante von *TRPV1* auszuschließen.

Nach 6-stündiger TNF- α Behandlung wurde mittels ELISA eine signifikante Reduktion der x-fachen Änderung der IL-8 Freisetzung unter Vorbehandlung mit Capsaicin festgestellt (Abbildung 22 Ib). Diese war im Vergleich zur Kontrolle um 40 % reduziert ($0,063 \pm 0,04$). Damit einhergehend legen die Daten der RT-qPCR eine erhöhte x-fache Änderung der *TRPV1*-Genexpression nahe (Abbildung 21b). Demnach konnte Capsaicin die TNF- α induzierte IL-8 Freisetzung in HaCaT-Zellen signifikant im Vergleich zur Kontrolle reduzieren, wodurch die Hypothese, dass Capsaicin durch Aktivierung von TRPV1 die TNF- α induzierten Entzündungsreaktionen in humanen basalen Keratinozyten abschwächt, bestätigt werden kann - zumindest nach 6-stündiger TNF- α Behandlung.

Ähnliche Effekte wurden bei einer Studie an männlichen Sprague-Dawley-Ratten beschrieben, die einer plantaren Inzision unterzogen wurden. Eine vorherige einmalige Injektion mit Capsaicin (1 %) reduzierte dabei die Proliferation von Keratinozyten sowie die Produktion von pro-nozizeptiven Entzündungsmediatoren - darunter TNF- α und IL-1 β - im Bereich der Schnittwunde, was zur analgetischen Wirkung von Capsaicin beiträgt (Guo et al., 2023). Ebenso zeigte eine zweistündige Behandlung von Capsaicin (16 μ M) in Kombination mit Silibinin (8 μ M) bei einer Maus-Makrophagen-Zelllinie (RAW 264.7) eine verringerte Lipopolysaccharid-induzierte Entzündungsreaktion, die über eine Hemmung des NF- κ B- und MAPK-Signalweges erklärt wurde (Zheng et al., 2022).

Nach 48-stündiger TNF- α Behandlung, die auf die Vorbehandlung mit Capsaicin folgte, wurde kein Unterschied der x-fachen Änderung der IL-8 Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Dabei wiesen die Werte eines biologischen Replikates eine erhöhte x-fache Änderung der IL-8 Freisetzung auf, während die Werte der restlichen Replikate eine

niedrigere x-fache Änderung der IL-8 Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle aufwiesen. Hingegen zeigte die Vorbehandlung mit Capsazepin sowie die kombinierte Behandlung von Capsaicin und Capsazepin eine verringerte x-fache Änderung der IL-8 Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 22 IIb). Warum ein Effekt von Capsaicin an dieser Stelle ausbleibt, konnte mit diesen Daten nicht weiter erklärt werden. Allerdings kann ein Trend bezüglich einer reduzierten IL-8 Freisetzung um das $0,68 \pm 0,37$ -Fache im Vergleich zur Kontrolle (mit $p = 0,07$) durch Vorbehandlung mit Capsaicin beobachtet werden sowie auf einen Effekt von Capsaicin aus der kombinierten Behandlung zurückgeschlossen werden. Möglicherweise reichte die 24-stündige Behandlung des Agonisten nicht aus oder der Effekt der TNF- α Behandlung war zu stark, sodass die Capsaicin Behandlung keine Wirkungen mehr induzierte. Wie bereits bei den vorherigen Versuchen gezeigt, steigt die IL-8 Freisetzung von 6 h auf 48 h in einer zeitabhängigen Weise unter TNF- α Behandlung an (Abbildung 18b). Im Gegensatz zur Behandlung mit Capsazepin zeigte sowohl die Capsaicin Behandlung als auch die kombinierte Behandlung einen Anstieg der x-fachen Änderung der *TRPV1*-Genexpression nach 48-stündiger TNF- α Behandlung (Abbildung 21 IIb), wodurch die erhöhte Genexpression von *TRPV1* möglicherweise im Zusammenhang mit der reduzierten x-fachen Änderung der IL-8 Freisetzung bei kombinierter Behandlung aus Agonisten und Antagonisten steht (Abbildung 22 IIb).

7.4.1.1 Desensibilisierung von TRPV1

Antiinflammatorische Effekte von Capsaicin sind aus der Anwendung als Analgetikum bekannt, wobei Capsaicin zur Behandlung von Schmerzen eingesetzt werden kann. In den Leitlinien der deutschen Gesellschaft für Neurologie (2019) wird ein Capsaicin-8%-Pflaster als Mittel der zweiten Wahl bei neuropathischen Schmerzen jeglicher Ursache empfohlen, während es als Mittel erster Wahl bei lokalisierten neuropathischen Schmerzen erwogen werden kann (Schlereth et al., 2019). Als schmerzlinderndes Mittel findet Capsaicin zudem Anwendung bei Juckreiz in Folge von Psoriasis, bei akuten Rücken- und Nackenschmerzen, Osteoarthritis oder rheumatoider Arthritis (Malewicz et al., 2022; zusammengefasst von Bagood & Isseroff, 2021). Das 8 %-ige Capsaicin-Hautpflaster (NGX-4010, Handelsname Qutenza®) kann unter ärztlicher Aufsicht für 30 bis 60 min angewendet werden. Insgesamt können maximal vier Pflaster, was einer Menge von 640 mg Capsaicin entspricht, auf den schmerzenden Hautabschnitt aufgetragen werden (European Medicines Agency [EMA],

2021). Daneben ist Capsaicin in Form von Cremes in Konzentrationen von 0,025 %, 0,075 % und 0,1 % verfügbar (EMA, 2021). Die Wirkung von niedrig dosiertem Capsaicin ist in Bezug auf eine Schmerzlinderung umstritten und erfordert eine häufige und lange Anwendung (zusammengefasst von Rollyson et al., 2014).

Die Absorptionsrate und biologische Aktivität von Capsaicin sowie die ausgelöste Desensibilisierung werden durch mehrere Faktoren beeinflusst. Dazu zählen die verabreichte Dosis, die Darreichungsform, Ort und Dauer der Applikation sowie die Konzentration im Zielgewebe (Pershing et al., 2004; Y. Y. Wang et al. 2001; zusammengefasst von Rollyson et al., 2014). Da Capsaicinoide schlecht wasserlöslich sind, werden Alkohole oder organische Lösungsmittel als Vehikel genutzt. Limitierend für die Penetration von Capsaicin in die Haut ist das Eindringen durch das *Stratum corneum*, wobei lipophile und hochkonzentrierte Stoffe eine stärkere Verteilung aufweisen (Pershing et al., 2004). Chanda et al. (2008) zeigten, dass Capsaicin (1 und 10 µM) schnell (< 1 h) in humanen hepatischen Mikrosomen und S9-Fractionen durch hepatische Enzyme (Cytochrom 450) in die Metaboliten 16-hydroxycapsaicin, 17-hydroxycapsaicin sowie 16,17-dehydrocapsaicin umgewandelt wird, während die in vitro Metabolisierung in der Haut deutlich langsamer und über einen Zeitraum von 20 h verlief. Dabei wurde eine geringe Metabolisierung von Capsaicin in Vanillylamin (durch Hydrolyse der Amidbindung) und Vanillinsäure (durch Oxidation von Vanillylamin) beobachtet, wobei der Großteil als Capsaicin (74-79 %) bestehen blieb. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Capsaicin bei topischer Applikation auf der Haut den peripheren Zielort so gut wie unversehrt erreicht und seine Wirkung entfalten kann (Chanda et al., 2008; Y. Y. Wang et al. 2001). Die maximale Plasmakonzentration, die nach 60-minütiger Applikation eines 8 %-igen Capsaicin-Pflasters in einer Humanstudie festgestellt werden konnte, betrug etwa 17,8 ng/mL bzw. 58 nM, wobei der Mittelwert der Plasmakonzentration bei 1,96 ng/mL lag und die Halbwertszeit etwa 1,6 h betrug (Babbar et al., 2009). Allgemein wurde eine geringe Bioverfügbarkeit und Halbwertszeit von Capsaicin im Plasma nachgewiesen (zusammengefasst von Rollyson et al., 2014). Demnach kann davon ausgegangen werden, dass die systemische Wirkung von Capsaicin bei hochdosierten Hautpflastern sehr begrenzt ist (zusammengefasst von Arora et al., 2021). Zum Vergleich: der Verzehr von 26,6 mg Capsaicin (entspricht etwa 2-3 Jalapeños, bei 2,08 mg/g Capsaicin pro Jalapeño (López-Carrillo et al., 2003)), führte in einer Humanstudie zu maximalen Plasmakonzentrationen von 2,47 ng/mL (Chaiyasit et al., 2009). Diese ist in etwa mit der gemessenen mittleren Plasmakonzentration nach Anwendung des 8 %-igen Capsaicin-Pflasters vergleichbar, wobei die dort applizierte Menge an Capsaicin etwa 18 Jalapeños entsprechen würde.

In vitro Studien kamen zu dem Ergebnis, dass nach 60-minütiger Applikation des 8 %-igen Capsaicin-Pflasters lediglich 1 % des Capsaicins dermal und epidermal absorbiert werden kann. Bei der maximalen Anwendung von vier Pflastern entspricht dies einer Menge von etwa 7 mg Capsaicin bzw. 0,12 mg pro Kg Körpergewicht (EMA, 2021). Würde man diese maximal absorbierbare Menge ebenfalls auf eine epidermale Fläche von 1000 cm² beziehen, entspricht dies 0,007 mg Capsaicin pro cm² basalen Keratinozyten. Die in diesem Versuch eingesetzte Dosis von Capsaicin entspricht etwa 0,0042 - 0,0076 mg pro cm² HaCaT-Zellen (basale Keratinozyten) über den Behandlungszeitraum von 24 h. Diese Werte beruhen lediglich auf Annäherungen und Schätzungen aus der ausgestreuten Zellzahl und der Verdopplungszeit der HaCaT-Zellen, zudem ist nicht eindeutig, wie und auf welche Fläche sich das applizierte Capsaicin in der Haut nach epidermaler Absorption verteilt. Letztlich beruht die hier eingesetzte Dosis von Capsaicin auf Daten aus dem Zellmodell, welches die Haut und den dreidimensionalen Aufbau nicht darstellen kann. Dennoch liegen die in dieser Arbeit eingesetzten Konzentrationen von Capsaicin in einem physiologischen Bereich.

Die analgetischen Wirkungen von Capsaicin werden durch eine Desensibilisierung von TRPV1 und Degeneration von sensorischen Nerven erklärt (zusammengefasst von O'Neill et al., 2012). Die genauen Mechanismen dahinter sind nicht vollständig verstanden. So wurde zunächst vorgeschlagen, dass eine Erschöpfung von Neuropeptiden (z.B. CGRP, SP) aus sensorischen Nervenfasern die Reizempfindlichkeit reduzieren kann. Dieser Mechanismus allein reichte aber nicht aus, um eine Desensibilisierung zu erklären. Calciumabhängige Dephosphorylierungen von TRPV1 (z.B. über Calcineurin) wurden weiter für eine vorübergehende Desensibilisierung vorgeschlagen, die mit einem erhöhten Einstrom von Calciumionen einhergeht (zusammengefasst von Arora et al., 2021; Bagood & Isseroff, 2021; Iftinca et al., 2021). Eine wiederholte Gabe von niedrig dosiertem Capsaicin kann neuronale Reaktionen abschwächen, die innerhalb weniger Stunden reversibel sind und den Prozess der Desensibilisierung darstellen (zusammengefasst von Arora et al., 2021). Eine unspezifische Desensibilisierung bzw. Defunktionalisierung tritt auf, wenn in der Regel höhere Dosen von Capsaicin appliziert werden, sodass nachfolgend neuronale Reaktionen nicht nur auf Capsaicin, sondern auch auf andere Reize reduziert werden. Zudem kann die Ablation von TRPV1 exprimierenden epidermalen Nervenfasern zu einer langfristigen Defunktionalisierung führen (zusammengefasst von Arora et al., 2021). Weiter wurde von Arora et al. (2021) zusammengefasst, dass die Reduktion der epidermalen Nervenfaserdichte nicht bei allen Schmerzzuständen die analgetische Wirkung von Capsaicin erklären kann. So ist diabetische

Neuropathie bereits mit einem Verlust der Nervenfaserdichte assoziiert, welche in diesem Fall nicht mit einem Schmerzverlust einhergeht, sondern vielmehr den Schmerz verstärkt. Dies wird auf eine Sensibilisierung noch verbliebender, vor allem peptiderger, Afferenzen zurückgeführt. Diese Sensibilisierung kann durch pro-nozizeptive Faktoren (NGF, TNF- α), die aufgrund der Nervenschädigung und Degeneration freigesetzt werden, ausgelöst werden und zu einer Hyperalgesie beitragen. Da peptiderge Afferenzen wiederum TRPV1 exprimieren, kann der therapeutische Nutzen von Capsaicin durch eine selektive Wirkung und Ablation dieser Afferenzen erklärt werden. Die Beteiligung von TRPV1 an der mechanischen Hyperalgesie bei Neuropathie ist dennoch umstritten. Zum Teil wurde diesbezüglich keine analgetische Wirkung über TRPV1 vermittelt. Möglicherweise gehen fortgeschrittene und schwerwiegende neuropathische Zustände mit einem Verlust von TRPV1 Afferenzen einher, was eine analgetische Wirkung von Capsaicin nicht mehr erlauben lässt (zusammengefasst von Arora et al., 2021).

Insgesamt deuten diese Daten daraufhin, dass sowohl der Zustand des Gewebes als auch verschiedene schmerzhaft Zustände, unterschiedliche Wirkungen von Capsaicin oder der Modulation von TRPV1 induzieren können. Da auf diese Weise Schmerzen in gewisser Weise mit Schmerzen behandelt werden können, wirft das die Frage auf, ob dies auch auf Entzündungsreaktionen zutrifft. So könnten unterschiedliche und paradoxe Wirkungen von Capsaicin, durch die unterschiedlichen Zustände des Gewebes erklärt werden. Insgesamt sind sowohl TRPV1 als auch TRPA1 durch zahlreiche Aktivierungsmechanismen gekennzeichnet, die zu komplexen und mitunter paradoxen Wirkungen führen können (zusammengefasst von Alawi & Keeble, 2010; Arora et al., 2021).

Auch für TRPA1 wurde durch wiederholte Aktivierung eine Desensibilisierung beschrieben, wobei genaue Mechanismen auch hier nicht eindeutig verstanden sind. In einer Übersichtsarbeit haben Gouin et al. (2017) angemerkt, dass für TRPA1 unter anderem eine Aktivierung durch die Hydrolyse von PIP₂ bestehen kann, die beispielsweise während Entzündungsreaktionen auftritt. Auf diese Weise könnten Entzündungsmediatoren eine Desensibilisierung beeinträchtigen, TRPA1 sowie entzündliche Signalwege weiter potenzieren und die Produktion von Entzündungsmediatoren in dem verletzten Gewebe erhöhen (zusammengefasst von Gouin et al., 2017). TRPV1 und TRPA1 werden in peptidergen sensorischen Neuronen koexprimiert (Spahn et al., 2014; Story et al., 2003). Somit kann die Desensibilisierung von TRPV1 auch eine Defunktionalisierung von TRPA1 auf diesen Neuronen erzeugen und zu

den anti-nozizeptiven und entzündungshemmenden Wirkungen von TRPA1 beitragen (Trevisan et al., 2014).

Allerdings existieren für TRPA1 anscheinend auch Mechanismen, die den Kanal vor einer Desensibilisierung schützen. So wurde für die Fähigkeit einer TRPA1-Translokation an die Zelloberfläche in Reaktion auf die Kanalaktivierung beobachtet - was schließlich zur Sensibilisierung beitragen könnte (Schmidt et al., 2009). Ein Großteil der TRPA1 Agonisten, die Schmerzen vermitteln, sind scharfe Inhaltsstoffe aus Pflanzenbestandteilen, die womöglich ein Verteidigungsmechanismus gegenüber Pflanzenfressern darstellen (Baraldi et al., 2010). Derartige Interaktionsmechanismen, die zwischen verschiedenen TRP-Kanälen auftreten oder weitere Strukturen und Zellen umfassen und schließlich die Kanalaktivierung, das Entzündungsgeschehen und das TRP-Expressionsmuster beeinflussen, werden in dem hier verwendeten Zellmodell nicht nachgebildet und können nicht differenziert berücksichtigt werden.

7.4.2 Einfluss der TRPA1 Modulation auf Entzündungsreaktionen

Andere Studien haben bereits gezeigt, dass die *TRPA1*-Genexpression in HaCaT-Zellen in Abwesenheit von Entzündungsfaktoren sehr gering ist (Luostarinen et al., 2021). Demnach löste auch in dieser Arbeit die Vorbehandlung mit dem TRPA1 Agonisten bzw. Antagonisten (ohne weitere TNF- α Behandlung) nur sehr geringe Veränderungen der Genexpression von *TRPA1* aus, die zum Teil keine Unterscheidungen zulassen (Abbildung 23 b). *TRPV1* weist hingegen ein höheres Expressionsniveau in den HaCaT-Zellen auf als *TRPA1* (Daten nicht gezeigt). Nach 6 h wurde dennoch eine signifikante Abnahme der x-fachen Änderung der Genexpression von *TRPA1* durch die Vorbehandlung mit AP-18 beobachtet, die auf eine Wirkung des Antagonisten zurückzuführen sein kann oder aus der Behandlung selbst resultiert, die möglicherweise mit Stress in Verbindung steht und weitere Regulationsmechanismen aktivieren kann. So wurde nach 48 h ebenfalls kein Unterschied der x-fachen Änderung der Genexpression von *TRPA1* im Vergleich zur Kontrolle beobachtet, wobei für alle Vorbehandlungen hohe Varianzen diesbezüglich beobachtet wurden.

Studien haben gezeigt, dass durch die PKA/PLC-Signalisierung und Aktivierung infolge eines Agonisten (Allylisoithiocyanat), eine erhöhte Membranexpression von TRPA1 in HEK-293-Zellen induziert werden konnte, die durch Rezeptortranslokation und Vesikelfusion erklärt wurde (Schmidt et al., 2009). Diese Mechanismen werden nach Meng et al. (2016) ebenfalls für die Hochregulation von *TRPA1* während Entzündungsreaktionen

verantwortlich gemacht. Dabei induziert TNF- α eine SNARE-vermittelte Vesikelfusion wodurch die Expression von TRPA1 und TRPV1 an der Plasmamembran von sensorischen Neuronen erhöht wird. Diese erfolgt durch TNF- α vermittelte Aktivierung von MAPK- und p38-Signalwegen, weiteren translationalen Faktoren, einer GPCR-Synthese sowie einem Ca²⁺-Zustrom (Meng et al., 2016). Die Effekte der TRPA1-Aktivierung bezüglich einer erhöhten Membranexpression können zwischen verschiedenen Agonisten variieren und beispielsweise von den elektrophilen Eigenschaften abhängen, wobei insbesondere die Ankyrin Wiederholungen von TRPA1 als entscheidender Regulator für die Translokation vorgeschlagen wurden (zusammengefasst von Mahajan et al., 2021).

Die vorangegangenen Versuche zur Optimierung der TNF- α Behandlung zeigten bereits, dass TNF- α die Genexpression von *TRPA1* in HaCaT-Zellen induziert und diese zwischen der 6-stündigen und 48-stündigen Behandlung mit TNF- α leicht ansteigt (Abbildung 17 b & 19 b). Bei Vorbehandlung mit dem Agonisten bzw. Antagonisten und anschließender TNF- α Behandlung wurden keine Unterschiede bezüglich der x-fachen Änderung der Genexpression von *TRPA1* im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Insbesondere nach 6-stündiger Behandlung mit TNF- α wiesen die Veränderungen auf die *TRPA1*- und *CXCL8*-Genexpression zwischen der Vorbehandlung mit Zimtaldehyd bzw. AP-18 nahezu keine Unterschiede auf (Abbildung 24). Dies könnte auf einen mangelnden Effekt des Agonisten bzw. Antagonisten schließen lassen, allerdings wurden auch große Standardabweichung der x-fachen Änderung der Genexpression beobachtet und die kombinierte Behandlung der Verbindungen induzierte eine erhöhte x-fache Änderung der Genexpression, die wiederum eine Beteiligung bzw. Modulation von TRPA1 nahelegen lässt (Abbildung 24 I). Ebenso zeigte die kombinierte Vorbehandlung eine signifikant reduzierte x-fache Änderung der *CXCL8*-Genexpression im Vergleich zur Kontrolle nach 48-stündiger Behandlung mit TNF- α (Abbildung 24 IIa). Neben der Vorbehandlung könnte auch der zeitliche Effekt zu der beobachteten veränderten Genexpression geführt haben. Bei alleiniger Vorbehandlung aus Agonisten bzw. Antagonisten wurde ein ähnlicher Trend beobachtet, der sich in einer reduzierten x-fachen Änderung der Genexpression äußerte. Die vorangegangenen Versuche zeigten ebenfalls, dass die TNF- α induzierte Genexpression von *CXCL8* mit der Zeit abnimmt (Abbildung 18 a).

Die Interpretation dieser Daten bleibt erschwert, da die Behandlung mit Zimtaldehyd generell zu einer hohen Variation der Ergebnisse führte. Diese traten zwar nicht unbedingt innerhalb einer Passage auf, aber zwischen den verschiedenen biologischen Replikaten, die

teilweise gegenteilige Effekte bezüglich einer Erhöhung oder Verringerung der x-fachen Änderung der Genexpression erzeugten und zum Ausschluss einiger Daten führte. Zudem war die Isolation der RNA in dieser Behandlungsgruppe mit Agonisten und Antagonisten von TRPA1 erschwert und führte zum Teil dazu, dass kein Zellmaterial isoliert werden konnte. Mitunter wurde in den Zellkulturplatten dieser Behandlungsgruppe eine vergleichsweise niedrige Konfluenz der Zellen unter mikroskopischer Kontrolle und nach entsprechender Kultivierung beobachtet. So könnte eine Zellvitalität von unter 80 % zu Verunreinigungen durch apoptotische Zellen während der Isolierung des Zellmaterials geführt haben, wobei zytotoxische Effekte der einzelnen Behandlungen (Agonisten bzw. Antagonisten oder TNF- α) ausgeschlossen wurden (Gstraunthaler und Lindl 2021). Ebenso ist die Auswertung der Daten zur IL-8 Freisetzung erschwert, die womöglich einem geringeren Einfluss der TRPA1 Modulation unterliegt, da beispielsweise auch die Genexpression von *TRPA1* durch die Vorbehandlung mit Zimtaldehyd bzw. AP-18 kaum beeinflusst wurde.

Bezüglich der IL-8 Freisetzung konnte unter Kontrollbehandlung (ohne weitere TNF- α Behandlung) und Vorbehandlung mit Zimtaldehyd kein Unterschied der x-fachen Änderung der IL-8 Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Allerdings wiesen einzelne Replikate eine stark erhöhte x-fache Änderung der IL-8 Freisetzung auf, was zu einer hohen Standardabweichung der Daten führt und lediglich auf einen proinflammatorischen Trend, aufgrund einer erhöhten x-fachen Änderung der IL-8 Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle ($2,36 \pm 1,35$ mit $p = 0,07$), hinweisen lässt, der sich aus der Vorbehandlung mit 50 μ M Zimtaldehyd ergeben haben könnte (Abbildung 25 Ia). Die Vorbehandlung mit AP-18 zeigte keinen Unterschied der x-fachen Änderung der IL-8 Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle, was möglicherweise auf eine Beteiligung von TRPA1 schließen lässt.

Da TRPA1 sowohl durch zahlreiche Entzündungsmediatoren aktiviert wird als auch selbst an der Regulation dieser Mediatoren beteiligt ist, wurde die Aktivierung von TRPA1 bereits mit einigen Entzündungsreaktionen in Verbindung gebracht: darunter intestinale Erkrankungen, Atemwegserkrankungen, Juckreiz und allergische Kontaktdermatitis (zusammengefasst von Bautista et al., 2013; Luostarinen et al., 2021; Talavera et al., 2020). Es liegt bereits ein besonderes Augenmerk auf TRPA1 als therapeutisches Ziel bei der Behandlung von entzündlichen und neuropathischen Schmerzen, die durch Blockade bzw. Antagonismus von TRPA1 reduziert werden können (zusammengefasst von Yao et al., 2023).

Nach 48 h konnten kaum Unterschiede zwischen den Vorbehandlungen festgestellt werden, wobei die IL-8 Freisetzung für alle Behandlungen auf etwa dem gleichen Niveau lag.

Demnach sind von Zimtaldehyd womöglich nur kurzfristig proinflammatorische Wirkungen (im Vergleich zu den anderen Behandlungen) zu erwarten, was mit weiteren Untersuchungen überprüft werden müsste. Zu beachten bleibt, dass nach 48-stündiger Behandlung ein Anstieg der IL-8 Freisetzung der Lösungsmittelkontrolle vorliegt (Daten nicht gezeigt). Verschiedene Regulationsmechanismen können hierfür verantwortlich sein und aus der Behandlung an sich und damit einhergehendem Stress resultieren, was eine erhöhte IL-8 Freisetzung induzieren kann. Diese Regulationsmechanismen waren möglicherweise stärker als die durch Zimtaldehyd induzierten Reaktionen, die langfristig - vielleicht aufgrund einer zu kurzen Behandlungsdauer von 24 h - nicht zu Veränderungen der IL-8 Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle führten.

Interessanterweise wurde nach 48-stündiger zusätzlicher TNF- α Behandlung eine signifikant verringerte x-fache Änderung der IL-8 Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle - für sowohl die Vorbehandlung mit Zimtaldehyd ($0,82 \pm 0,09$; $p < 0,01$) als auch für die kombinierte Vorbehandlung ($0,63 \pm 0,21$; $p < 0,01$) - festgestellt (Abbildung 25 IIB). Diese Ergebnisse legen zunächst die Schlussfolgerung nahe, dass Zimtaldehyd unter TNF- α induzierten entzündlichen Zuständen einen antiinflammatorischen Effekt - ebenso wie Capsaicin - in HaCaT-Zellen auslösen kann bzw. zu einer verringerten IL-8 Freisetzung führt. Damit kann die hier aufgestellte Hypothese, dass die Aktivierung von TRPA1 durch einen spezifischen Agonisten proinflammatorische Reaktionen vermittelt, vorerst nicht belegt werden.

Es existieren einige in vitro und in vivo Studien, die antimikrobielle, entzündungshemmende, immunmodulatorische, blutdrucksenkende, antidiabetische und antiadipogene Wirkungen von Zimtaldehyd und Zimtaldehydderivaten beschreiben (Hochkogler et al., 2018; Hoi et al., 2020; zusammengefasst von Gruenwald et al., 2010). Eine verringerte Lipidakkumulation wurde beispielsweise bei murinen Präadipozyten (3T3-L1 Zelllinie) durch Behandlung mit Zimtaldehyd (30 μ M) während der Differenzierungs- und Reifungsphase dieser Zellen über TRPA1-abhängige Signalwege festgestellt (Hoi et al., 2020). Zimt findet traditionell in der Phytomedizin Anwendung und wird beispielsweise als Nahrungsergänzungsmittel zur Senkung des Blutzuckerspiegels bei Diabetes mellitus Typ II oder bei Magen-Darm-Beschwerden verwendet (BfR, 2006; zusammengefasst von Gruenwald et al., 2010). Bei Nahrungsergänzungsmitteln wie Zimtkapseln, die eine tägliche Dosierung von bis zu 2 g oder 6 g Zimt umfassen können, wird insbesondere die Einnahme und Verwendung von Cassia-Zimt aufgrund des hohen Gehalts an Cumarin, welches leberschädigend wirkt, als kritisch angesehen (BfR, 2006). Ein NOEL-Wert für Zimtaldehyd wurde basierend auf

tierexperimentellen Studien mit 620 mg pro kg Körpergewicht festgesetzt, dabei wurden allerdings keine Langzeiteffekte untersucht. Ein ADI-Wert wurde aus diesen Daten nicht abgeleitet und ein temporärer ADI-Wert von 0,7 mg pro kg Körpergewicht pro Tag wurde nicht verlängert (BfR, 2006; Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives [JECFA], 2001). Neben der oralen Supplementation existieren topische Anwendungsformen von Zimtaldehyd. In einer Studie von Yuan et al. (2018) unterstützte Zimtaldehyd die Wundheilung und den Wundverschluss in primären Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (HUVEC) in einer dosisabhängigen Weise (maximaler Effekt bei 10 μ M Zimtaldehyd). Als zugrundeliegender Mechanismus wurde, neben einer Proliferation und Migration von Endothelzellen, die Aktivierung des PI3K/AKT- und MAPK-Signalweges beschrieben, wodurch die Angiogenese beeinflusst wird. Als ein wichtiges Signalmolekül der Angiogenese und des Wundheilungsprozesses wurde der dosis- und zeitabhängige Anstieg des vasculären Wachstumsfaktors (VEGF) beschrieben. Ebenso wurden bei diabetischen Mäusen (*db/db*), bei denen durch einen chirurgischen Eingriff eine Wunde induziert wurde, erhöhte VEGF-Werte und eine dosisabhängig verbesserte Wundheilung infolge einer täglichen intraperitonealen Verabreichung von Zimtaldehyd (50 und 100 mg/kg) über zehn Tage festgestellt (Yuan et al., 2018). Bei einer weiteren Studie von Ferro et al. (2019) wurden Hautwunden von Mäusen, die mit *Pseudomonas aeruginosa* infiziert waren, täglich über sieben Tage topisch mit Zimtaldehyd (0,5 mg/mL; 30 μ L) behandelt. Über eine TRPA1 vermittelte Wirkung zeigte Zimtaldehyd auch dort antimikrobielle und wundheilungsfördernde Wirkungen. Dabei waren verringerte Konzentrationen der Bakterienbesiedlung und Entzündungsmediatoren feststellbar, aber ebenso waren Werte von VEGF verringert. Möglicherweise sind die modulatorischen Wirkungen, die Zimtaldehyd auf Entzündungsmediatoren ausübt, vom Weg der Verabreichung - systemisch oder topisch - und dem Auslöser der Hautirritation - Diabetes oder Infektion - abhängig (Ferro et al., 2019). Demnach könnten auch die vermittelten Entzündungsreaktionen (pro- oder antiinflammatorisch) von diesen und weiteren Faktoren abhängig sein, die den Gewebetyp, den Zustand vor der Entzündung, die verabreichte Dosis und den Verabreichungsweg der Verbindungen umfassen. Zudem handelt es sich hierbei um Versuche an Nagetieren, die zwar auch für den Menschen zutreffen können, aber weitere Einflussfaktoren sind denkbar.

In einer Studie von Mendes et al. (2016) wurde gezeigt, dass eine einmalige orale Verabreichung von Zimtaldehyd (250 mg/kg) bei Mäusen mit einem verbesserten Krankheitsbild der LPS-induzierten systemischen Entzündung (SIRS) einherging sowie mit reduzierten Plasmagehalten von TNF- α . Diese immunmodulatorischen Wirkungen von Zimtaldehyd wurden

sowohl auf TRPA1-abhängige als auch TRPA1-unabhängige Mechanismen zurückgeführt. Wobei vorgeschlagen wurde, dass TRPA1 nur während einer Entzündungsreaktion derartige Effekte vermittelt (Mendes et al., 2016). Die Ergebnisse einer anderen Studie von B.-C. Liao et al. (2008) an Endothelzellen legen entzündungshemmende Eigenschaften von Zimtaldehyd nahe. Dabei wurde durch die Behandlung mit Zimtaldehyd (100 μ M; für 1 h) und einer anschließenden TNF- α Behandlung (100 U/mL; für 2, 4 und 6 h) der Zellen, eine verringerte Expression von Adhäsionsmolekülen sowie eine Hemmung des TNF- α induzierten NF- κ B-Signalweges festgestellt. Die Hemmung des NF- κ B-Signalweges wurde über die p65 Translokation und den Abbau von I κ B- α gemessen, wobei die Behandlung der Zellen mit Zimtaldehyd in Dosen von 50 - 200 μ M (für 30 min bis 12 h) und anschließender einstündiger TNF- α Behandlung die p65 Translokation hemmte sowie den Abbau von I κ B- α (bei Vorbehandlung mit 100 μ M Zimtaldehyd für 30 min bis 3 h und anschließender 30-minütiger TNF- α Behandlung). Diese hemmende Wirkung wurde durch Interaktion des α,β -ungesättigten Carbonylrestes von Zimtaldehyd mit den Sulfhydrylgruppen von Cysteinresten erklärt. So wurde angeführt, dass Proteine, die eine Aktivierung von NF- κ B behindern (z.B. Blockade des I κ B- α Abbaus) sowie NF- κ B selbst, als Ziele für eine Interaktion dienen können. Ebenso ist der Carbonyl-Anteil von Zimtaldehyd in der Lage, Nrf-2 („Nuclear factor erythroid 2-related factor“ 2) und Nrf-2 verwandte Gene zu aktivieren, wodurch wiederum sowohl die NF- κ B Aktivierung weiter moduliert wird als auch die Expression von wichtigen antioxidativen und entzündungshemmenden Zielen - wie die Expression von Hämoxxygenase-1 und Phase-II-Enzymen, die während der Detoxifizierung aktiv sind und die Zellen vor Elektrophilen und reaktiven Sauerstoffspezies schützen (B.-C. Liao et al., 2008).

Mechanismen, die auf die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und Nrf-2 abzielen, können die Regulation wichtiger zellulärer Reaktionen auf oxidativen Stress oder Entzündungen beeinflussen (zusammengefasst von Wardyn et al., 2015). Trotz der beschriebenen antiinflammatorischen Reaktionen gilt Zimtaldehyd als Kontaktallergen. Vallion et al. (2022) zeigten, dass primäre Keratinozyten (CCD 1106 KERTr), die mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen von Zimtaldehyd behandelt wurden (100 μ M oder 250 μ M; für 24 h), erst unter Behandlung mit der höheren Konzentration von Zimtaldehyd erhöhte mRNA-Spiegel sowie eine erhöhte Freisetzung von Zytokinen, darunter TNF- α und IL-8, aufwiesen. Bei Behandlung mit der niedrigeren Konzentration wurde hingegen keine Veränderung der Gentranskription oder Freisetzung von Zytokinen beobachtet. Demnach wurde vorgeschlagen, dass Zimtaldehyd vermutlich in geringeren Konzentrationen eine entzündungshemmende Rolle

in Keratinozyten ausübt. Während die Nrf-2 Aktivierung anscheinend wesentlich an der Zimtaldehyd-induzierten Herunterregulation von proinflammatorischen Zytokinen beteiligt ist, wurde die proinflammatorische Wirkung der höheren Zimtaldehyd-Konzentration mit einer erhöhten Vermittlung der Apoptose assoziiert. Wobei angemerkt wurde, dass überlebende Zellen die Entzündungsreaktionen, in Reaktion auf den vermehrten Zelltod, weiter verstärken könnten. Ebenso war der p38-MAPK-Signalweg, der die Nrf-2 Aktivität reguliert, unter Behandlung mit 250 μ M Zimtaldehyd stark aktiviert (Vallion et al., 2022). Insgesamt deuten viele Daten darauf hin, dass die Aktivität von Nrf-2 an den Reaktionen von Keratinozyten auf bestimmte Kontaktsensibilisatoren wie Zimtaldehyd beteiligt ist und damit zelluläre inflammatorische Reaktionen reguliert (El Ali et al., 2013; Vallion et al., 2022).

Ob Zimtaldehyd in dem hier vorliegenden Zellmodell antiinflammatorische Wirkungen induziert, muss dennoch mit Vorsicht interpretiert werden. Wie bereits erwähnt traten teilweise große Unterschiede in den induzierten Effekten zwischen den Passagen bei Behandlung mit dem TRPA1 Agonisten bzw. Antagonisten auf. Zusammen mit der mangelnden Ausbeute an Zellmaterial, führte dies zum Ausstreuen mehrerer Passagen an HaCaT-Zellen und Versuchswiederholungen. Die Ergebnisse zur Messung der Genexpression von *TRPA1* zeigten nach 48-stündiger TNF- α Behandlung eine reduzierte x-fache Änderung im Vergleich zur Kontrolle für alle Vorbehandlungen (Abbildung 24 Iib). Möglicherweise ist die beobachtete reduzierte x-fache Änderung der IL-8 Freisetzung unter Vorbehandlung mit Zimtaldehyd nicht auf eine Modulation von TRPA1 zurückzuführen. Während es zwischen 6 h und 48 h zwar nicht zu einer Abnahme der IL-8 Freisetzung sowie der *TRPV1*-Genexpression der Lösungsmittelkontrolle unter TNF- α Behandlung kommt (vgl. Abbildung 18 b & 19 b), könnten die Unterschiede zwischen den Behandlungen abgenommen haben. Ebenso können thermische und mechanische Einflüsse zu Veränderungen der Aktivität und Genexpression während der Behandlung geführt haben. Des Weiteren können, trotz größter Sorgfalt, unterschiedliche Laborbedingungen (z.B. Temperaturveränderungen), die Handhabung der Zellen bei der Behandlung und andere äußere Einflussfaktoren zu Veränderungen der Differenzierung, des Wachstums sowie zu Entzündungsreaktionen beitragen. Diese können letztlich auch die HaCaT-Zellen selbst und zelluläre Prozesse der Genexpression beeinflusst haben; es ist nicht auszuschließen, dass bestimmte Stressoren Chromosomenaberrationen in HaCaT-Zellen fördern können (Boukamp et al., 1997).

Nicht sichtbare Unterschiede zwischen der Vorbehandlung mit dem Agonisten bzw. Antagonisten könnten weiter dadurch erklärt werden, dass die eingesetzte Dosis von AP-18 zu gering war, um Effekte zu erzeugen. Die Wahl der Dosis von AP-18 beruhte unter anderem auf der kombinierten Behandlung von Zimtaldehyd mit AP-18 (Abbildung 15 b). Da AP-18 allerdings ebenfalls mit Zimtaldehyd um die Bindungsstelle von TRPA1 konkurriert, müsste eine erhöhte Dosis von AP-18 mit einer erhöhten Dosis von Zimtaldehyd einhergehen, die für die Zellen wiederum toxisch werden würde (vgl. Abbildung 14 Ib). Um diesbezüglich eine Aussage zur Modulation von TRPA1 und dem Einfluss auf Entzündungsreaktionen in HaCaT-Zellen treffen zu können, wären weitere Untersuchungen mit beispielsweise einem anderen Antagonisten notwendig gewesen.

Die Agonisten von TRPA1 weisen eine außerordentlich hohe strukturelle Vielfalt auf. Elektrophile Agonisten können reversible und irreversible Modifikationen mit den Cysteinresten von TRPA1 eingehen: beispielsweise kann Zimtaldehyd über Thiol- α,β -ungesättigte Aldehydreaktionen irreversible Modifikationen an TRPA1 auslösen (Suo et al., 2020). Eine Inaktivierung kann dennoch durch andere Modifikationen des Kanals geschehen, wie beispielsweise eine intrazelluläre Calciumerhöhung. Generell stellen die ausgelösten Modifikationen von Cysteinen relativ stabile Reaktionen dar, die auch dazu führen können, dass die Kanalaktivierung verlängert wird (Macpherson et al., 2007). Dies könnte wiederum Effekte von Antagonisten wie AP-18 erschweren. Unter anderem wurde sogar von bimodalen Wirkungen von Zimtaldehyd auf TRPA1 berichtet, die in Abhängigkeit von der Konzentration zu einer Kanalaktivierung oder -hemmung führen können (Alpizar et al., 2013). Dies könnte wiederum pro- oder antiinflammatorische Effekte in unterschiedlicher Weise beeinflussen, die von der Aktivierung von TRPA1 abhängen.

8 Schlussfolgerung und Ausblick

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit geht hervor, dass TRPV1, welches in humanen basalen Keratinozyten exprimiert wird, durch Aktivierung von 10 μM Capsaicin antiinflammatorische Wirkungen in Reaktion auf 20 ng/mL TNF- α vermittelt, was zumindest kurzfristig (nach 6-stündiger TNF- α Behandlung) durch eine um 40 % reduzierte IL-8 Freisetzung festgestellt werden konnte. Eine chronische bzw. langfristige Wirkung von Capsaicin konnte an dieser Stelle nicht geklärt werden. Hingegen verstärkte die Anwendung von sowohl Capsaicin als auch Zimtaldehyd (50 μM) in Abwesenheit von TNF- α proinflammatorische Reaktionen. Die Hypothese, dass die Modulation von TRPA1 mit Zimtaldehyd die TNF- α induzierten Entzündungsreaktionen in humanen basalen Keratinozyten verstärkt, konnte mit diesen Daten vorerst nicht belegt werden. Unstimmigkeiten, bezüglich einer pro- oder antiinflammatorischen Rolle von TRPA1 bei bestimmten Hauterkrankungen wie Psoriasis, bestehen ebenfalls in der Literatur (zusammengefasst von Maglie et al., 2021). Letztlich liegt es nahe, dass der Zustand des Gewebes (vorliegende oder keine Entzündung), Interaktionen mit anderen Zellen, der Ort der TRP-Expression, die spezifischen Mechanismen der Modulation der TRP-Kanäle sowie die Dosis der jeweiligen Behandlungen, einen Einfluss auf die vermittelten entzündlichen Reaktionen nehmen können und so teilweise gegenteilige Effekte zwischen verschiedenen Studien auftreten lassen (zusammengefasst von Koivisto et al., 2022).

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind dabei lediglich auf ein Zellmodell zurückzuführen. Chronische Entzündungsreaktionen sind durch eine konstante, zunächst niedrig-gradige Entzündungsreaktion gekennzeichnet (Fleit, 2014), die in diesem Zellmodell durch eine einmalige Gabe von TNF- α womöglich nicht rekonstruiert werden konnte. Zukünftige Studien, die eine wiederholte Gabe von TNF- α beinhalten, könnten hier aufgekommene Fragen weiterführend beantworten. Dabei müssten auch die eingesetzten Konzentrationen neu evaluiert werden, wobei ebenfalls die Konzentrationen der Agonisten und Antagonisten berücksichtigt werden sollten, sodass die Wirkung von TNF- α nicht die Reaktionen der TRP-Modulation überdeckt.

Eine Messung der Genexpression von *TRPV1* und *TRPA1* zu früheren oder weiteren Zeitpunkten könnte weiter in Betracht gezogen werden, um möglicherweise auch kurzfristigere oder generell Effekte der Vorbehandlungen wahrzunehmen. Letztlich bleibt zu beachten, dass eine erhöhte Genexpression nicht mit erhöhten Proteinleveln einhergehen muss oder in

vivo über Rezeptortranslokationen andere Effekte vermittelt werden können (Ji et al., 2002; W. H. Li et al., 2007). Die Genexpression sollte nach Möglichkeit in Verbindung zum Proteingehalt bewertet werden, was insbesondere bei der Regulation von IL-8 ersichtlich wird. Ebenso sind die zugrundeliegenden Signalisierungen mitunter abhängig von Ca^{2+} , wobei sowohl ein Einstrom von Ca^{2+} durch Aktivierung der TRP-Kanäle induziert wird als auch der Calciumgehalt die Aktivierung an sich reguliert, sodass Untersuchungen dieser, weitere Aufschlüsse über die Kanalmodulation bieten können (W. H. Li et al., 2007).

Weitere Versuche bezüglich der *TRPA1*-Genexpression mit einem anderen Antagonisten oder auch Agonisten von TRPA1 sind gerechtfertigt. Diese könnten zur Lösung hier aufgekommener Probleme beitragen, die sich unter anderem aus einem kompetitiven Antagonismus ergeben haben könnten, und weitere Aufschlüsse darüber geben, ob die Aktivierung von TRPA1 durch einen spezifischen Agonisten in diesem Entzündungsmodell proinflammatorische Effekte ausübt.

Während ebenso Inkonsistenzen bezüglich einer pro- oder antiinflammatorischen Wirkung von TRPV1 in der Literatur bestehen, ist dessen Rolle bei neurogener Entzündung gesicherter (Sulk & Steinhoff, 2015). Die analgetische Wirkung von Capsaicin wurde dabei auf die desensibilisierende Wirkung in neuronalen Zellen zurückgeführt, wobei eine wiederholte Gabe, der Zustand des Gewebes sowie akute Reaktionen unterschiedliche pro- oder antiinflammatorische Ereignisse beeinflussen können (Sulk & Steinhoff, 2015; zusammengefasst von Arora et al., 2021). Somit wäre es weiter von Interesse, eine wiederholte Behandlung der HaCaT-Zellen mit Capsaicin zu untersuchen - wenn ähnliche Effekte auch auf nicht-neuronale Zellen zu übertragen sind.

Die Schlüsselrolle von $\text{TNF-}\alpha$ bei Entzündungsreaktionen hat zur Forschung über den Einsatz von $\text{TNF-}\alpha$ Inhibitoren geführt, die etwa bei entzündlichen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis, Morbus Crohn oder Psoriasis eingesetzt werden können. Allerdings birgt die Hemmung von $\text{TNF-}\alpha$ auch das Risiko von Nebenwirkungen, die die Wundheilung verzögern können, Sekundärinfektionen auslösen oder die Entstehung von Krebs fördern (Banno et al., 2004). Aufgrund der allgegenwärtigen Expression von TRP-Kanälen auf der Zellmembran sowie der Tatsache, dass sie mit verschiedenen Umweltreizen in Kontakt stehen und an zahlreichen physiologischen Prozessen beteiligt sind, bieten TRP-Kanäle interessante therapeutische Ziele, um über die Modulation der Kanalaktivität, verschiedene

entzündliche Erkrankungen zu beeinflussen (zusammengefasst von Koivisto et al., 2022). Während beispielsweise Zielgewebe von Nahrungsergänzungsmitteln relativ schwer zu erfassen sind, kann der Fokus auf TRP-Kanälen auf der Haut, derartige ungewisse Auswirkungen besser umgehen, indem diese vielmehr auf einem Zielort beschränkt bleiben (zusammengefasst von Zsombok & Derbenev, 2016). Erkenntnisse über die Modulation von epidermalen TRP-Kanälen und ihre Rolle bei Entzündungsreaktionen können dabei möglicherweise auch für andere epitheliale Gewebe von Nutzen sein, wie dem Darm, der Lunge und der Leber. Diese sind wiederum ebenso ernährungsrelevanten Modulatoren ausgesetzt (zusammengefasst von Eming et al., 2014; Zsombok & Derbenev, 2016). Die orale Gabe von Capsaicin oder Zimtaldehyd ist hinsichtlich schmerzender und brennender Empfindungen sowie schleimhautreizender Wirkungen beschränkt (BfR, 2006; BfR, 2011). Zudem ist ein übermäßiger Verzehr von Lebensmitteln, die Capsaicin enthalten, mit gastrointestinalen Beschwerden assoziiert. Das Bundesinstitut für Risikobewertung hat in der Bewertung von 2011 angenommen, dass eine Dosis von 5 mg Gesamtcapsaicin pro kg Körpergewicht möglichst nicht überschritten werden sollte, was zudem der Dosis entspricht, die bei einer traditionellen scharfen Mahlzeit von Erwachsenen als maximal tolerierbar angenommen wurde (BfR, 2011). Die maximal tägliche Aufnahmemenge in Europa von Capsaicinoiden aus milden Chilis und Paprika wurde auf 1,5 mg/Tag geschätzt (Scientific Committee on Food [SCF], 2002). Derartige Reaktionen und Risiken sowie maximal akzeptable Aufnahmemengen, müssen bei verschiedenen Applikationswegen berücksichtigt und evaluiert werden.

Inwieweit Effekte von topisch appliziertem Capsaicin weitere Zellen (z.B. Synovozyten) beeinflusst bleibt unklar, da fraglich ist, ob die Akkumulation von Capsaicin in diesen Zellen ausreicht. Wird Capsaicin in vivo auf die menschliche Haut appliziert, werden neben den Nervenfasern und den beschriebenen Desensibilisierungsmechanismen auch nicht-neuronale Keratinozyten stimuliert (zusammengefasst von Arora et al., 2021). Demnach könnten sowohl neuronale als auch nicht-neuronale Zellen zu den spezifischen Wirkungen und - je nach Wechselwirkungen zwischen den Zellen - zu teilweise inkonsistenten Ergebnissen beitragen. Im Gegensatz zu sensorischen Ganglien weisen primäre humane Keratinozyten und HaCaT-Zellen geringere mRNA-Konzentration von *TRPV1* auf (Pecze et al., 2008). Somit können die eingesetzten Konzentrationen von Capsaicin in vivo zu unterschiedlichen Aktivitäten beitragen und mit unterschiedlicher Relevanz für die analgetische oder inflammatorische Wirkung von TRPV1 verantwortlich sein - auf einerseits neuronalen und andererseits nicht-neuronalen Zellen (zusammengefasst von Arora et al., 2021). Zudem besteht die

Möglichkeit, dass eine negative Spleißvariante von *TRPV1* in humanen Keratinozyten Resistenzen gegenüber Capsaicin vermitteln kann. Dies muss bei Übertragung auf andere in vivo Modelle und bei weiteren Studien berücksichtigt werden, damit Effekte von Capsaicin auf TRPV1 in Keratinozyten nicht womöglich verhindert werden. So wäre auch die Untersuchung weiterer Agonisten von TRPV1 gerechtfertigt, die durch das Auftreten von Spleißvarianten in ihrer Funktion nicht beeinträchtigt werden.

Ein Nachteil des hier verwendeten Zellmodells ist zudem, dass es kein dreidimensionales Modell der Haut und somit nicht die Komplexität und zellulären Prozesse der menschlichen Haut nachbildet (zusammengefasst von Birgersdotter et al., 2005). Dies kann ebenso zu Diskrepanzen bezüglich der Wirkstoffverteilung führen. Ebenso wie die zellulären Prozesse in der Haut, sind Entzündungsreaktionen durch ein komplexes System und Zusammenspiel verschiedener Akteure gekennzeichnet, die sich systemisch ausbreiten können (zusammengefasst von Bennett et al., 2018). In vivo führt die Regulation von Entzündungsreaktionen zu unterschiedlichen zeitlichen Auswirkungen, die sich lediglich als akute oder als chronische Entzündungen äußern. In dieser Arbeit konnte nur ein Teil dieser Prozesse abgebildet werden. Um aber Entzündungsreaktionen zielgerecht und langfristig behandeln oder beeinflussen zu können, kann das Verständnis dieser auf allen Ebenen der Zellregulation zielführend sein und sollte immer im Kontext einer systemischen Beeinflussung betrachtet werden (zusammengefasst von Bennett et al., 2018). Ebenso beinhaltet die Aktivierung der TRP-Kanäle eine Interaktion und Kommunikation mit verschiedenen Immunzellen, neuronalen Zellen und anderen Hautzellen, die Einfluss auf die Freisetzung von Entzündungsmediatoren und den Entzündungsprozess nehmen (zusammengefasst von Gouin et al., 2017).

Derartige Interaktionen und Kommunikationen können durch ein einziges Zellmodell nicht abgebildet werden und müssen bei der Übertragung auf andere Systeme sowie der Interpretation berücksichtigt werden. Komplexere Modelle, die sowohl die dreidimensionale Struktur der Haut abbilden als auch die Kommunikation mit anderen Zellen integrieren, können von Interesse sein, um tiefere Einblicke in die Regulationsmechanismen von TRPV1 und TRPA1 zu erhalten; aber werden zeitgleich auch zu einer erschwerten Versuchskontrolle und Verzerrungen der Ergebnisse führen können.

TRP-Kanäle leisten einen wesentlichen Beitrag sowohl zur sensorischen Physiologie als auch zur Wahrnehmung schädlicher Umweltreize, die aversive Reaktionen oder sogar Verhaltensveränderungen auslösen können. So können TRPV1 und TRPA1 auch indirekt

Geschmacksqualitäten beeinflussen und einige Mutationen sind mit veränderten Präferenzen für beispielsweise den Salzgeschmack verbunden, wodurch sich Auswirkungen auf den Blutdruck ergeben können (zusammengefasst von Rhyu et al., 2021).

Zahlreiche Regulierungsmechanismen und Interaktionen beeinflussen die Aktivität und Funktion dieser Kanäle. So können zwischen verschiedenen Gewebetypen und Zellen Wechselwirkungen auftreten, die in einem Synergismus oder gegenteiligen Effekten enden (zusammengefasst von Koivisto et al., 2022; Szallasi et al. 2006). Dies berechtigt zur Aufklärung der verschiedenen Mechanismen auf Zellebene, die für das weitere Verständnis der Regulierungsmechanismen interessant sein können. Auf diese Weise können aber auch unbekannte oder unerwartete Effekte auftreten, die zu Diskrepanzen führen können, wenn eine Übertragung auf komplexere Systeme stattfindet und die Interpretation der Daten und Studienvergleiche erschweren. Dadurch stellen TRPV1 und TRPA1 ein komplexes und integratives Forschungsobjekt dar, welches zahlreiche physiologische Prozesse umfasst und diese über nachgeschaltete Signalwege beeinflussen kann.

9 Zusammenfassung

TRPV1 und TRPA1 sind als polymodale Sensoren an der Wahrnehmung von verschiedenen, mitunter schädlichen, Reizen beteiligt. Die Expression und Aktivität der Kanäle steht mit entzündlichen und schmerzhaften Zuständen in Verbindung. Viele Studien haben sich auf die neuronale Expression und schmerzassoziierten Signalwege konzentriert. Der nicht-neuronalen Expression wurde weniger Aufmerksamkeit gewidmet. Ebenso ist die Rolle von TRPV1 und TRPA1 bei pro- und antiinflammatorischen Signalwegen unklar. Ihre Beteiligung an physiologischen Prozessen sowie ihre gute Zugänglichkeit - insbesondere auf der Haut - machen sie zu interessanten Forschungsobjekten. Ziel dieser Arbeit war, die nicht-neuronale Expression von TRPV1 und TRPA1 in humanen basalen Keratinozyten bezüglich ihrer Rolle bei entzündlichen Signalwegen zu untersuchen. Dafür wurden HaCaT-Zellen mit spezifischen ernährungsrelevanten Agonisten sowie den entsprechenden Antagonisten vorbehandelt. Anschließend wurde untersucht, ob die Modulation der Kanäle die Expression sowie Sekretion von *CXCL8/IL-8* beeinflusst, welche stromabwärts von TNF- α (20 ng/mL) induziert wurde. Die 24-stündige Vorbehandlung der Zellen mit dem TRPV1-Agonisten Capsaicin (10 μ M) induzierte nach darauffolgender 6-stündiger TNF- α Behandlung (20 ng/mL) eine kurzfristige, signifikante Reduktion der IL-8 Freisetzung um das $0,63 \pm 0,04$ -Fache ($p < 0,0001$) im Vergleich zur Kontrolle. Dies unterstützt die Hypothese, dass Capsaicin antiinflammatorische Wirkungen in basalen Keratinozyten über die Aktivierung von TRPV1 vermittelt. Die Rolle der Aktivierung von TRPA1 durch Zimtaldehyd bleibt uneindeutig. Insgesamt kann die Modulation von TRPV1 und TRPA1 von verschiedenen entzündlichen und zeitlichen Bedingungen abhängen. Werden die von TRPV1 und TRPA1 vermittelten entzündlichen und komplexen Mechanismen auf verschiedenen zellulären Ebenen geklärt, könnte die Modulation dieser Kanäle genutzt werden, um therapeutisch auf entzündliche Zustände abzielen.

10 Summary

TRPV1 and TRPA1 act as polymodal sensors and are involved in perception of various stimuli - including noxious. Expression and activity of TRPV1 and TRPA1 are associated with inflammatory and painful conditions. Studies have focused on neuronal expression and pain-related pathways. The non-neuronal expression has received less attention. The role of TRPV1 and TRPA1 in pro- and anti-inflammatory signaling pathways remains unclear. Their involvement in various physiological processes and their broad accessibility turn them into interesting research objects. The aim of this thesis was to investigate the non-neuronal expression of TRPV1 and TRPA1 in human basal keratinocytes, focusing on their role in inflammatory signaling pathways. HaCaT cells were pretreated using specific diet-related agonists and antagonists. It was investigated whether modulation of these channels affected the expression and secretion of *CXCL8/IL-8*, which was induced downstream by TNF- α (20 ng/mL). Pretreatment of cells with the TRPV1 agonist capsaicin (10 μ M) for 24 h and following TNF- α treatment (20 ng/mL) for 6 h, induced a short-term significant reduction in IL-8 release with a fold change of 0.63 ± 0.04 ($p < 0.0001$) compared to control. This supports the hypothesis that capsaicin mediates anti-inflammatory effects in basal keratinocytes by activating TRPV1. The role of TRPA1 activation by cinnamaldehyde remains unclear. Overall, modulation of TRPV1 and TRPA1 may depend on various inflammatory and temporal conditions. If inflammatory and complex mechanisms mediated by TRPV1 and TRPA1 are clarified at different cellular levels, modulation of these channels could be used to target inflammatory conditions.

11 Literaturverzeichnis

- Alawi, K. & Keeble, J. (2010). The paradoxical role of the transient receptor potential vanilloid 1 receptor in inflammation. *Pharmacology & Therapeutics*, 125(2), 181–195. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.10.005>
- Alpizar, Y. A., Gees, M., Sanchez, A., Apetrei, A., Voets, T., Nilius, B. & Talavera, K. (2013). Bimodal effects of cinnamaldehyde and camphor on mouse TRPA1. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 465(6), 853–864. <https://doi.org/10.1007/s00424-012-1204-x>
- Amarbayasgalan, T., Takahashi, H., Dekio, I. & Morita, E. (2013). Interleukin-8 content in the stratum corneum as an indicator of the severity of inflammation in the lesions of atopic dermatitis. *International Archives of Allergy and Immunology*, 160(1), 63–74. <https://doi.org/10.1159/000339666>
- Ansorge, S. & Täger, M. (2014). Immunologie. In P. C. Heinrich, M. Müller & L. Graeve (Hrsg.), *Springer-Lehrbuch. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie* (9. Aufl., S. 893–930). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3_70
- Arnemann, J. (2019). DNA-/RNA-Konzentrationsbestimmung. In *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik* (S. 719). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4_3464
- Arora, V., Campbell, J. N. & Chung, M.-K. (2021). Fight fire with fire: Neurobiology of capsaicin-induced analgesia for chronic pain. *Pharmacology & Therapeutics*, 220, 107743. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107743>
- Atoyan, R., Shander, D. & Botchkareva, N. V. (2009). Non-neuronal expression of transient receptor potential type A1 (TRPA1) in human skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 129(9), 2312–2315. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.58>
- Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>
- Babbar, S., Marier, J.-F., Mouksassi, M.-S., Beliveau, M., Vanhove, G. F., Chanda, S. & Bley, K. (2009). Pharmacokinetic analysis of capsaicin after topical administration of a high-concentration capsaicin patch to patients with peripheral neuropathic pain. *Therapeutic Drug Monitoring*, 31(4), 502–510. <https://doi.org/10.1097/FTD.0b013e3181a8b200>

- Bagood, M. D. & Isseroff, R. R. (2021). TRPV1: Role in Skin and Skin Diseases and Potential Target for Improving Wound Healing. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11). <https://doi.org/10.3390/ijms22116135>
- Banno, T., Gazel, A. & Blumenberg, M. (2004). Effects of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling. *Journal of Biological Chemistry*, 279(31), 32633–32642. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400642200>
- Bánvölgyi, A., Pálincás, L., Berki, T., Clark, N., Grant, A. D., Helyes, Z., Pozsgai, G., Szolcsányi, J., Brain, S. D. & Pintér, E. (2005). Evidence for a novel protective role of the vanilloid TRPV1 receptor in a cutaneous contact allergic dermatitis model. *Journal of neuroimmunology*, 169(1-2), 86–96. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.08.012>
- Baraldi, P. G., Preti, D., Materazzi, S. & Geppetti, P. (2010). Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) channel as emerging target for novel analgesics and anti-inflammatory agents. *Journal of medicinal chemistry*, 53(14), 5085–5107. <https://doi.org/10.1021/jm100062h>
- Baroni, A., Buommino, E., Gregorio, V. de, Ruocco, E., Ruocco, V. & Wolf, R. (2012). Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clinics in Dermatology*, 30(3), 257–262. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2011.08.007>
- Baud, V. & Karin, M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends in Cell Biology*, 11(9), 372–377. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(01\)02064-5](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(01)02064-5)
- Bautista, D. M., Pellegrino, M. & Tsunozaki, M. (2013). TRPA1: A gatekeeper for inflammation. *Annual review of physiology*, 75, 181–200. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183811>
- Benítez-Angeles, M., Morales-Lázaro, S. L., Juárez-González, E. & Rosenbaum, T. (2020). TRPV1: Structure, Endogenous Agonists, and Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10). <https://doi.org/10.3390/ijms21103421>
- Bennett, J. M., Reeves, G., Billman, G. E. & Sturmborg, J. P. (2018). Inflammation-Nature's Way to Efficiently Respond to All Types of Challenges: Implications for Understanding and Managing “the Epidemic” of Chronic Diseases. *Frontiers in Medicine*, 5, 316. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00316>
- Bevan, S., Hothi, S., Hughes, G., James, I. F., Rang, H. P., Shah, K., Walpole, C. S. & Yeats, J. C. (1992). Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone

- excitant capsaicin. *British Journal of Pharmacology*, 107(2), 544–552.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1992.tb12781.x>
- BfR (2006). Bundesinstitut für Risikobewertung, Gesundheitliche Bewertung Nr. 044/2006.
 Online verfügbar unter: https://www.bfr.bund.de/cm/343/hohe_taeegliche_aufnahmemengen_von_zimt_gesundheitsrisiko_kann_nicht_ausgeschlossen_werden.pdf,
 zuletzt geprüft am 17.05.2023
- BfR (2011). Bundesinstitut für Risikobewertung, Stellungnahme Nr. 053/2011. Online verfügbar unter: <https://www.bfr.bund.de/cm/343/zu-scharf-ist-nicht-gesund-lebensmittel-mit-sehr-hohen-capsaicingehalten-koennen-der-gesundheit-schaden.pdf>,
 zuletzt geprüft am 25.03.2023
- Birgersdotter, A., Sandberg, R. & Ernberg, I. (2005). Gene expression perturbation in vitro—a growing case for three-dimensional (3D) culture systems. *Seminars in Cancer Biology*, 15(5), 405–412. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2005.06.009>
- Blaydon, D. C. & Kelsell, D. P. (2014). Defective channels lead to an impaired skin barrier. *Journal of Cell Science*, 127(Pt 20), 4343–4350. <https://doi.org/10.1242/jcs.154633>
- Blumberg, P. M., Pearce, L. V. & Lee, J. (2011). TRPV1 activation is not an all-or-none event: TRPV1 partial agonism/antagonism and its regulatory modulation. *Current topics in medicinal chemistry*, 11(17), 2151–2158.
<https://doi.org/10.2174/156802611796904825>
- Boelsma, E., Hendriks, H. F. & Roza, L. (2001). Nutritional skin care: health effects of micronutrients and fatty acids. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(5), 853–864. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.5.853>
- Boone, M., Koker, A. de & Callewaert, N. (2018). Capturing the ‘ome’: the expanding molecular toolbox for RNA and DNA library construction. *Nucleic Acids Research*, 46(6), 2701–2721. <https://doi.org/10.1093/nar/gky167>
- Bootman, M. D. (2012). Calcium signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(7), a011171. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011171>
- Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A. & Fusenig, N. E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of cell biology*, 106(3), 761–771.
<https://doi.org/10.1083/jcb.106.3.761>
- Boukamp, P., Popp, S., Altmeyer, S., Hülsen, A., Fasching, C., Cremer, T. & Fusenig, N. E. (1997). Sustained nontumorigenic phenotype correlates with a largely stable chromosome content during long-term culture of the human keratinocyte line HaCaT.

- Genes, Chromosomes and Cancer*, 19(4), 201–214.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2264\(199708\)19:4%3C201::aid-gcc1%3E3.0.co;2-0](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2264(199708)19:4%3C201::aid-gcc1%3E3.0.co;2-0)
- Brito, R., Sheth, S., Mukherjea, D., Rybak, L. P. & Ramkumar, V. (2014). TRPV1: A Potential Drug Target for Treating Various Diseases. *Cells*, 3(2), 517–545.
<https://doi.org/10.3390/cells3020517>
- Calixto, J. B., Kassuya, C. A. L., André, E. & Ferreira, J. (2005). Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. *Pharmacology & Therapeutics*, 106(2), 179–208.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2004.11.008>
- Camprubí-Robles, M., Planells-Cases, R. & Ferrer-Montiel, A. (2009). Differential contribution of SNARE-dependent exocytosis to inflammatory potentiation of TRPV1 in nociceptors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(11), 3722–3733. <https://doi.org/10.1096/fj.09-134346>
- Cao, C., Xiao, Z., Wu, Y. & Ge, C. (2020). Diet and Skin Aging-From the Perspective of Food Nutrition. *Nutrients*, 12(3), 870. <https://doi.org/10.3390/nu12030870>
- Cao, E., Liao, M., Cheng, Y. & Julius, D. (2013). TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature*, 504(7478), 113–118.
<https://doi.org/10.1038/nature12823>
- Carnevale, V. & Rohacs, T. (2016). TRPV1: A Target for Rational Drug Design. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 9(3), 52. <https://doi.org/10.3390/ph9030052>
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D. & Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature Publishing Group*. <https://www.nature.com/articles/39807>
- Caterina, M. J. & Pang, Z. (2016). TRP Channels in Skin Biology and Pathophysiology. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/ph9040077>
- Cen, J., Zhu, K., Jin, N., Lin, A. & Cheng, H. (2007). Effects of drugs known to trigger psoriasis on HaCaT keratinocytes. *Acta pharmaceutica Sinica*, 42(10), 1041–1044. PMID: 18229608
- Chaiyasit, K., Khovidhunkit, W. & Wittayalertpanya, S. (2009). Pharmacokinetic and the effect of capsaicin in *Capsicum frutescens* on decreasing plasma glucose level. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet*, 92(1), 108–113. PMID: 19260251

- Chakrabarti, S., Pattison, L. A., Singhal, K., Hockley, J. R. F., Callejo, G. & Smith, E. S. J. (2018). Acute inflammation sensitizes knee-innervating sensory neurons and decreases mouse digging behavior in a TRPV1-dependent manner. *Neuropharmacology*, 143, 49–62. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.09.014>
- Chambers, E. S. & Vukmanovic-Stejić, M. (2020). Skin barrier immunity and ageing. *Immunology*, 160(2), 116–125. <https://doi.org/10.1111/imm.13152>
- Chanda, S., Bashir, M., Babbar, S., Koganti, A. & Bley, K. (2008). In vitro hepatic and skin metabolism of capsaicin. *Drug Metabolism and Disposition: the Biological Fate of Chemicals*, 36(4), 670–675. <https://doi.org/10.1124/dmd.107.019240>
- Chen, J. & Hackos, D. H. (2015). TRPA1 as a drug target—promise and challenges. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 388(4), 451–463. <https://doi.org/10.1007/s00210-015-1088-3>
- Chiricozzi, A., Guttman-Yassky, E., Suárez-Fariñas, M., Nogales, K. E., Tian, S., Cardinale, I., Chimenti, S. & Krueger, J. G. (2011). Integrative responses to IL-17 and TNF- α in human keratinocytes account for key inflammatory pathogenic circuits in psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(3), 677–687. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.340>
- Chuang, H. H., Prescott, E. D., Kong, H., Shields, S., Jordt, S. E., Basbaum, A. I., Chao, M. V. & Julius, D. (2001). Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. *Nature*, 411(6840), 957–962. <https://doi.org/10.1038/35082088>
- Cibrian, D., La Fuente, H. de & Sánchez-Madrid, F. (2020). Metabolic Pathways That Control Skin Homeostasis and Inflammation. *Trends in Molecular Medicine*, 26(11), 975–986. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.04.004>
- Clapham, D. E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature*, 426(6966), 517–524. <https://doi.org/10.1038/nature02196>
- Colombo, I., Sangiovanni, E., Maggio, R., Mattozzi, C., Zava, S., Corbett, Y., Fumagalli, M., Carlino, C., Corsetto, P. A., Scaccabarozzi, D., Calvieri, S., Gismondi, A., Taramelli, D. & Dell'Agli, M. (2017). HaCaT Cells as a Reliable In Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. *Mediators of Inflammation*, 2017, 7435621. <https://doi.org/10.1155/2017/7435621>
- Da Nóbrega Alves, D., Monteiro, A. F. M., Andrade, P. N., Lazarini, J. G., Abílio, G. M. F., Guerra, F. Q. S., Scotti, M. T., Scotti, L., Rosalen, P. L. & Castro, R. D. de (2020).

- Docking Prediction, Antifungal Activity, Anti-Biofilm Effects on *Candida* spp., and Toxicity against Human Cells of Cinnamaldehyde. *Molecules*, 25(24). <https://doi.org/10.3390/molecules25245969>
- Dai, Y., Wang, S., Tominaga, M., Yamamoto, S., Fukuoka, T., Higashi, T., Kobayashi, K., Obata, K., Yamanaka, H. & Noguchi, K. (2007). Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. *The Journal of clinical investigation*, 117(7), 1979–1987. <https://doi.org/10.1172/JCI30951>
- DeFalco, J., Steiger, D., Gustafson, A., Emerling, D. E., Kelly, M. G. & Duncton, M. A. J. (2010). Oxime derivatives related to AP18: Agonists and antagonists of the TRPA1 receptor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20(1), 276–279. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.10.113>
- Denda, M. & Tsutsumi, M. (2011). Roles of Transient Receptor Potential Proteins (TRPs) in Epidermal Keratinocytes. In *Transient Receptor Potential Channels* (S. 847–860). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0265-3_44
- Derbenev, A. V. & Zsombok, A. (2016). Potential therapeutic value of TRPV1 and TRPA1 in diabetes mellitus and obesity. *Seminars in immunopathology*, 38(3), 397–406. <https://doi.org/10.1007/s00281-015-0529-x>
- Demartini, C., Tassorelli, C., Zanaboni, A. M., Tonsi, G., Francesconi, O., Nativi, C. & Greco, R. (2017). The role of the transient receptor potential ankyrin type-1 (TRPA1) channel in migraine pain: evaluation in an animal model. *The journal of headache and pain*, 18(1), 94. <https://doi.org/10.1186/s10194-017-0804-4>
- Deutschmann, G. (2005). *Die Haut und ihre Anhangsgebilde: Lehrbuch für Krankenpflegepersonal und andere Gesundheitsberufe* (S.12-23). Springer.
- Deyrieux, A. F. & Wilson, V. G. (2007). In vitro culture conditions to study keratinocyte differentiation using the HaCaT cell line. *Cytotechnology*, 54(2), 77–83. <https://doi.org/10.1007/s10616-007-9076-1>
- Diaz-Franulic, I., Poblete, H., Miño-Galaz, G., González, C. & Latorre, R. (2016). Allosterism and Structure in Thermally Activated Transient Receptor Potential Channels. *Annual review of biophysics*, 45, 371–398. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-011034>
- Doyle A. A., Stephens, J. C. (2019). A review of cinnamaldehyde and its derivatives as antibacterial agents. *Fitoterapia*, 139. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104405>
- Du, Q., Liao, Q., Chen, C., Yang, X., Xie, R. & Xu, J. (2019). The Role of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 in Common Diseases of the Digestive Tract and the

- Cardiovascular and Respiratory System. *Frontiers in Physiology*, 10, 1064. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01064>
- El Ali, Z., Gerbeix, C., Hemon, P., Esser, P. R., Martin, S. F., Pallardy, M. & Kerdine-Römer, S. (2013). Allergic skin inflammation induced by chemical sensitizers is controlled by the transcription factor Nrf2. *Toxicological Sciences*, 134(1), 39–48. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft084>
- Eming, S. A., Martin, P. & Tomic-Canic, M. (2014). Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Science translational medicine*, 6(265), 265sr6. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009337>
- Engel, M. A., Leffler, A., Niedermirtl, F., Babes, A., Zimmermann, K., Filipović, M. R., Izydorczyk, I., Eberhardt, M., Kichko, T. I., Mueller-Tribbensee, S. M., Khalil, M., Siklosi, N., Nau, C., Ivanović-Burmazović, I., Neuhuber, W. L., Becker, C., Neurath, M. F. & Reeh, P. W. (2011). TRPA1 and substance P mediate colitis in mice. *Gastroenterology*, 141(4), 1346–1358. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.07.002>
- Engler, A., Aeschlimann, A., Simmen, B. R., Michel, B. A., Gay, R. E., Gay, S. & Sprott, H. (2007). Expression of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) in synovial fibroblasts from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Biochemical and biophysical research communications*, 359(4), 884–888. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.05.178>
- European Medicines Agency. (Juni 2021). *Qutenza 179mg cutaneous patch - Summary of Product Characteristics (SmPC) - (emc)*. Online verfügbar unter: <https://www.medicines.org.uk/emc/product/573/smpc>, zuletzt geprüft am 09.01.2023
- Ferro, T. A. F., Souza, E. B., Suarez, M. A. M., Rodrigues, J. F. S., Pereira, D. M. S., Mendes, S. J. F., Gonzaga, L. F., Machado, M. C. A. M., Bomfim, M. R. Q., Calixto, J. B., Arbiser, J. L., Monteiro-Neto, V., André, E. & Fernandes, E. S. (2019). Topical Application of Cinnamaldehyde Promotes Faster Healing of Skin Wounds Infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecules*, 24(8), 1627. <https://doi.org/10.3390/molecules24081627>
- Fleit, H. B. (2014). Chronic Inflammation. In L. M. McManus (Hrsg.), *Pathobiology of human disease* (S. 300–314). Elsevier Acad. Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.01808-6>
- Gao, N., Yang, F., Chen, S., Wan, H., Zhao, X. & Dong, H. (2020). The role of TRPV1 ion channels in the suppression of gastric cancer development. *Journal of experimental*

- & clinical cancer research : *CR*, 39(1), 206. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01707-7>
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S. & Kempson, I. (2021). The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23). <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>
- Gisondi, P., Bellinato, F., Girolomoni, G. & Albanesi, C. (2020). Pathogenesis of Chronic Plaque Psoriasis and Its Intersection With Cardio-Metabolic Comorbidities. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 117. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00117>
- Gonzalez-Nilo, F. D., Caceres-Molina, J., Bravo-Moraga, F., Sepulveda, R. & Diaz-Franulic, I. (2016). Structural Characterization of Ligand-Specific Interactions in TRPV1 Channel: Gating Mechanism by Capsaicin and Capsazepine. *Biophysical Journal*, 110(3), 284a. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.11.1537>
- Gouin, O., L'Herondelle, K., Lebonvallet, N., Le Gall-Ianotto, C., Sakka, M., Buhé, V., Plée-Gautier, E., Carré, J.-L., Lefeuvre, L., Misery, L. & Le Garrec, R. (2017). TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation: pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization. *Protein & Cell*, 8(9), 644–661. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0395-5>
- Gruenewald, J., Freder, J. & Armbruester, N. (2010). Cinnamon and health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(9), 822–834. <https://doi.org/10.1080/10408390902773052>
- Gstraunthaler, G. & Lindl, T. (2021). Steriltechnik – Kontaminationen. In *Zell- und Gewebekultur* (S. 15–51). Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-62606-1_2
- Guan, M., Ying, S. & Wang, Y. (2021). Increased expression of transient receptor potential channels and neurogenic factors associates with cough severity in a guinea pig model. *BMC pulmonary medicine*, 21(1), 187. <https://doi.org/10.1186/s12890-021-01556-w>
- Guo, R., Qiu, H., Li, H., Ma, D., Guan, Y. & Wang, Y. (2023). The Preemptive Analgesic Effect of Capsaicin Involves Attenuations of Epidermal Keratinocytes Proliferation and Expression of Pro-Inflammatory Mediators After Plantar Incision in Rats. *Journal of Pain Research*, 16, 141–149. <https://doi.org/10.2147/JPR.S395065>

- Ha, H., Debnath, B. & Neamati, N. (2017). Role of the CXCL8-CXCR1/2 Axis in Cancer and Inflammatory Diseases. *Theranostics*, 7(6), 1543–1588. <https://doi.org/10.7150/thno.15625>
- Hatano, N., Itoh, Y., Suzuki, H., Muraki, Y., Hayashi, H., Onozaki, K., Wood, I. C., Beech, D. J. & Muraki, K. (2012). Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF1 α) switches on transient receptor potential ankyrin repeat 1 (TRPA1) gene expression via a hypoxia response element-like motif to modulate cytokine release. *Journal of Biological Chemistry*, 287(38), 31962–31972. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.361139>
- Haustrate, A., Prevarskaya, N. & Lehen'kyi, V. (2020). Role of the TRPV Channels in the Endoplasmic Reticulum Calcium Homeostasis. *Cells*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/cells9020317>
- Heinrich, P. C., Haan, S., Hermanns, H. M., Müller-Newen, G. & Schaper, F. (2014). Rezeptoren und ihre Signaltransduktion. In P. C. Heinrich, M. Müller & L. Graeve (Hrsg.), *Springer-Lehrbuch. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie* (9. Aufl., S. 411–441). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3_35
- Heinrich, P. C., Koch, H.-G. & Brix, J. (2014). Apoptose – Der programmierte Zelltod. In P. C. Heinrich, M. Müller & L. Graeve (Hrsg.), *Springer-Lehrbuch. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie* (9. Aufl., S. 633–637). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3_51
- Heratizadeh, A., Wichmann, K. & Werfel, T. (2011). Food allergy and atopic dermatitis: how are they connected? *Current Allergy and Asthma Reports*, 11(4), 284–291. <https://doi.org/10.1007/s11882-011-0202-y>
- Herlaar, E. & Brown, Z. (1999). p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. *Molecular Medicine Today*, 5(10), 439–447. [https://doi.org/10.1016/S1357-4310\(99\)01544-0](https://doi.org/10.1016/S1357-4310(99)01544-0)
- Hinman, A., Chuang, H., Bautista, D. M. & Julius, D. (2006). TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(51), 19564–19568. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609598103>
- Hochkogler, C. M., Hoi, J. K., Lieder, B., Müller, N., Hans, J., Widder, S., Ley, J. P., Sommoza, V. (2018). Cinnamyl Isobutyrate Decreases Plasma Glucose Levels and Total Energy Intake from a Standardized Breakfast: A Randomized, Crossover

- Intervention. *Molecular nutrition & food research*, 62(17).
<https://doi.org/10.1002/mnfr.201701038>
- Hoeller, O., Kay, R. (2007). Chemotaxis in the absence of PIP3 gradients. *Current biology*, 17(9), 813-817. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.04.004>
- Hoffmann, E., Dittrich-Breiholz, O., Holtmann, H. & Kracht, M. (2002). Multiple control of interleukin-8 gene expression. *Journal of leukocyte biology*, 72(5), 847–855. PMID: 12429706
- Hofmann, F. (2017). Wirkungen von Pharmaka auf den Organismus: allgemeine Pharmakodynamik. In: Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F. & Starke, K. (Hrsg.). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Begründet von W. Forth, D. Henschler, W. Rummel* (12. Aufl., S. 4-14). Urban & Fischer Verlag GmbH & Co. KG.
- Hoi, J. K., Lieder, B., Liebisch, B., Czech, C., Hans, J., Ley, J. P. & Somoza, V. (2020). TRPA1 Agonist Cinnamaldehyde Decreases Adipogenesis in 3T3-L1 Cells More Potently than the Non-agonist Structural Analog Cinnamyl Isobutyrate. *ACS Omega*, 5(51), 33305–33313. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c05083>
- Hong, S. & Wiley, J. W. (2005). Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in the expression and function of vanilloid receptor 1. *The Journal of biological chemistry*, 280(1), 618–627. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408500200>
- Hu, H., Tian, J., Zhu, Y., Wang, C., Xiao, R., Herz, J. M., Wood, J. D. & Zhu, M. X. (2010). Activation of TRPA1 channels by fenamate nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 459(4), 579–592. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0749-9>
- Hu, Y., Zhu, Y., Lian, N., Chen, M., Bartke, A. & Yuan, R. (2019). Metabolic Syndrome and Skin Diseases. *Frontiers in Endocrinology*, 10, 788. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00788>
- Iftinca, M., Defaye, M. & Altier, C. (2021). TRPV1-Targeted Drugs in Development for Human Pain Conditions. *Drugs*, 81(1), 7–27. <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01429-2>
- ISO 10993-5. (2009). “Biological evaluation of medical devices –: Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity“. *International Organization for Standardization. Genf, Schweiz*.
- JECFA (2001). Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Safety evaluation of certain food additives and contaminants. *WHO Food Additives Series No. 46*, Genf.

- Ji, R.-R., Samad, T. A., Jin, S.-X., Schmoll, R. & Woolf, C. J. (2002). p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron*, 36(1), 57–68. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00908-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00908-X)
- Jiang, L., Wang, Y., Xu, Y., Ma, D. & Wang, M. (2018). The Transient Receptor Potential Ankyrin Type 1 Plays a Critical Role in Cortical Spreading Depression. *Neuroscience*, 382, 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.04.025>
- Josino Soares, D., Walker, J., Pignitter, M., Walker, J. M., Imboeck, J. M., Ehrnhoefer-Ressler, M. M., Montenegro Brasil, I. & Somoza, V. (2014). Pitanga (*Eugenia uniflora* L.) fruit juice and two major constituents thereof exhibit anti-inflammatory properties in human gingival and oral gum epithelial cells. *Food & function*, 5(11), 2981–2988. <https://doi.org/10.1039/c4fo00509k>
- Jung, J., Shin, J. S., Lee, S.-Y., Hwang, S. W., Koo, J., Cho, H. & Oh, U. (2004). Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(8), 7048–7054. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311448200>
- Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., Capanoglu, E. (2020). Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*, 1(3), 332-349. <https://doi.org/10.1002/fft2.44>
- Kang, J., Ding, Y., Li, B., Liu, H., Yang, X. & Chen, M. (2017). TRPA1 mediated aggravation of allergic contact dermatitis induced by DINP and regulated by NF-κB activation. *Scientific reports*, 7, 43586. <https://doi.org/10.1038/srep43586>
- Karim, M., Boikess, R. S., Schwartz, R. A. & Cohen, P. J. (2022). Dimethyl sulfoxide (DMSO): a solvent that may solve selected cutaneous clinical challenges. *Archives of Dermatological Research*, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00403-022-02494-1>
- Khalil, M., Alliger, K., Weidinger, C., Yerinde, C., Wirtz, S., Becker, C. & Engel, M. A. (2018). Functional Role of Transient Receptor Potential Channels in Immune Cells and Epithelia. *Frontiers in Immunology*, 9, 174. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00174>
- Kochukov, M. Y., McNearney, T. A., Fu, Y. & Westlund, K. N. (2006). Thermosensitive TRP ion channels mediate cytosolic calcium response in human synoviocytes. *American journal of physiology. Cell physiology*, 291(3), C424-32. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00553.2005>

- Koivisto, A. & Pertovaara, A. (2013). Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) ion channel in the pathophysiology of peripheral diabetic neuropathy. *Scandinavian journal of pain*, 4(3), 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.sjpain.2012.11.001>
- Koivisto, A., Chapman, H., Jalava, N., Korjamo, T., Saarnilehto, M., Lindstedt, K. & Pertovaara, A. (2014). TRPA1: a transducer and amplifier of pain and inflammation. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 114(1), 50–55. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12138>
- Koivisto, A., Belvisi, M. G., Gaudet, R. & Szallasi, A. (2022). Advances in TRP channel drug discovery: from target validation to clinical studies. *Nature Reviews Drug Discovery*, 21(1), 41–59. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00268-4>
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A. & Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2-3), 95–125. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>
- Kumari, S., Redouane, Y., Lopez-Mosqueda, J., Shiraishi, R., Romanowska, M., Lutzmayer, S., Kuiper, J., Martinez, C., Dikic, I., Pasparakis, M., Ikeda, F. (2014). Sharpin prevents skin inflammation by inhibiting TNFR1-induced keratinocyte apoptosis. *eLife* 3. <https://doi.org/10.7554/eLife.03422>
- Lapointe, T. K., Basso, L., Iftinca, M. C., Flynn, R., Chapman, K., Dietrich, G., Vergnolle, N. & Altier, C. (2015). TRPV1 sensitization mediates postinflammatory visceral pain following acute colitis. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 309(2), G87-99. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00421.2014>
- Lee, H. & Caterina, M. J. (2005). TRPV channels as thermosensory receptors in epithelial cells. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 451(1), 160–167. <https://doi.org/10.1007/s00424-005-1438-y>
- Lee, Y. M., Kim, Y. K., Kim, K. H., Park, S. J., Kim, S. J. & Chung, J. H. (2009). A novel role for the TRPV1 channel in UV-induced matrix metalloproteinase (MMP)-1 expression in HaCaT cells. *Journal of Cellular Physiology*, 219(3), 766–775. <https://doi.org/10.1002/jcp.21729>
- Legrand, C., Merlini, J. M., Senarclens-Bezençon, C. de & Michlig, S. (2020). New natural agonists of the transient receptor potential Ankyrin 1 (TRPA1) channel. *Scientific Reports*, 10(1), 11238. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68013-2>
- Li, W. H., Lee, Y. M., Kim, J. Y., Kang, S., Kim, S., Kim, K. H., Park, C.-H. & Chung, J. H. (2007). Transient receptor potential vanilloid-1 mediates heat-shock-

- induced matrix metalloproteinase-1 expression in human epidermal keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(10), 2328–2335. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700880>
- Li, J., Chen, Y., Chen, Q. Y., Liu, D., Xu, L., Cheng, G., Yang, X., Guo, Z. & Zeng, Y. (2019). Role of transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1) on ozone-exacerbated allergic asthma in mice. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 247, 586–594. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.091>
- Li, L., Ma, L., Luo, Z., Wei, X., Zhao, Y., Zhou, C., Mou, A., Lu, Z., You, M., He, C., Ma, H., Zhou, Q., Wang, L., Cao, T., Gu, Y., Gao, P. & Zhu, Z. (2022). Lack of TRPV1 aggravates obesity-associated hypertension through the disturbance of mitochondrial Ca²⁺ homeostasis in brown adipose tissue. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*, 45(5), 789–801. <https://doi.org/10.1038/s41440-021-00842-8>
- Liao, B.-C., Hsieh, C.-W., Liu, Y.-C., Tzeng, T.-T., Sun, Y.-W. & Wung, B.-S. (2008). Cinnamaldehyde inhibits the tumor necrosis factor-alpha-induced expression of cell adhesion molecules in endothelial cells by suppressing NF-kappaB activation: effects upon IkappaB and Nrf2. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 229(2), 161–171. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.01.021>
- Liao, M., Cao, E., Julius, D. & Cheng, Y. (2013). Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature*, 504(7478), 107–112. <https://doi.org/10.1038/nature12822>
- Lieder, B., Hoi, J., Burian, N., Hans, J., Holik, A.-K., Beltran Marquez, L. R., Ley, J. P., Hatt, H. & Somoza, V. (2020). Structure-Dependent Effects of Cinnamaldehyde Derivatives on TRPA1-Induced Serotonin Release in Human Intestinal Cell Models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(13), 3924–3932. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b08163>
- Lin, C.-H., Wang, Y.-H., Chen, Y.-W., Lin, Y.-L., Chen, B.-C. & Chen, M.-C. (2015). *Transcriptional and posttranscriptional regulation of CXCL8/IL-8 gene expression induced by connective tissue growth factor*. Springer. <https://doi.org/10.1007/s12026-015-8670-0>
- Lisby, S., Faurschou, A. & Gniadecki, R. (2007). The autocrine TNFalpha signalling loop in keratinocytes requires atypical PKC species and NF-kappaB activation but is independent of cholesterol-enriched membrane microdomains. *Biochemical Pharmacology*, 73(4), 526–533. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.11.006>

- Liu, B., Escalera, J., Balakrishna, S., Fan, L., Caceres, A. I., Robinson, E., Sui, A., McKay, M. C., McAlexander, M. A., Herrick, C. A. & Jordt, S. E. (2013). TRPA1 controls inflammation and pruritogen responses in allergic contact dermatitis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 27(9), 3549–3563. <https://doi.org/10.1096/fj.13-229948>
- Liu, C., Reese, R., Vu, S., Rougé, L., Shields, S. D., Kakiuchi-Kiyota, S., Chen, H., Johnson, K., Shi, Y. P., Chernov-Rogan, T., Greiner, D. M. Z., Kohli, P. B., Hackos, D., Brillantes, B., Tam, C., Li, T., Wang, J., Safina, B., Magnuson, S., . . . Chen, J. (2021). A Non-covalent Ligand Reveals Biased Agonism of the TRPA1 Ion Channel. *Neuron*, 109(2), 273-284.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.10.014>
- Loï, L. (2021). Ab214030 - Human IL-8 SimpleStep ELISA Kit. Online verfügbar unter: [https://www.abcam.com/ps/products/214/ab214030/documents/Human-IL-8-ELISA-kit-protocol-book-v2-ab214030%20\(website\).pdf](https://www.abcam.com/ps/products/214/ab214030/documents/Human-IL-8-ELISA-kit-protocol-book-v2-ab214030%20(website).pdf), zuletzt geprüft am 13.02.2023
- López-Carrillo, L., López-Cervantes, M., Robles-Díaz, G., Ramírez-Espitia, A., Mohar-Betancourt, A., Meneses-García, A., López-Vidal, Y. & Blair, A. (2003). Capsaicin consumption, Helicobacter pylori positivity and gastric cancer in Mexico. *International Journal of Cancer*, 106(2), 277–282. <https://doi.org/10.1002/ijc.11195>
- Lowes, M. A., Bowcock, A. M. & Krueger, J. G. (2007). Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature*, 445(7130), 866–873. <https://doi.org/10.1038/nature05663>
- Luostarinen, S., Hämäläinen, M. & Moilanen, E. (2021). Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1)-An Inflammation-Induced Factor in Human HaCaT Keratinocytes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7). <https://doi.org/10.3390/ijms22073322>
- Lv, Z., Xu, X., Sun, Z., Yang, Y. X., Guo, H., Li, J., Sun, K., Wu, R., Xu, J., Jiang, Q., Ikegawa, S. & Shi, D. (2021). TRPV1 alleviates osteoarthritis by inhibiting M1 macrophage polarization via Ca²⁺/CaMKII/Nrf2 signaling pathway. *Cell death & disease*, 12(6), 504. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03792-8>
- Macpherson, L. J., Dubin, A. E., Evans, M. J., Marr, F., Schultz, P. G., Cravatt, B. F. & Patapoutian, A. (2007). Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature*, 445(7127), 541–545. <https://doi.org/10.1038/nature05544>

- Maglie, R., Souza Monteiro de Araujo, D., Antiga, E., Geppetti, P., Nassini, R. & Logu, F. de (2021). The Role of TRPA1 in Skin Physiology and Pathology. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6). <https://doi.org/10.3390/ijms22063065>
- Mahajan, N., Khare, P., Kondepudi, K. K. & Bishnoi, M. (2021). TRPA1: Pharmacology, natural activators and role in obesity prevention. *European Journal of Pharmacology*, 912, 174553. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174553>
- Mahmoud, O., Soares, G. B. & Yosipovitch, G. (2023). Transient Receptor Potential Channels and Itch. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 420. <https://doi.org/10.3390/ijms24010420>
- Malewicz, N. M., Rattray, Z., Oeck, S., Jung, S., Escamilla-Rivera, V., Chen, Z., Tang, X., Zhou, J. & LaMotte, R. H. (2022). Topical Capsaicin in Poly(lactic-co-glycolic)acid (PLGA) Nanoparticles Decreases Acute Itch and Heat Pain. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9). <https://doi.org/10.3390/ijms23095275>
- Malin, S., Molliver, D., Christianson, J. A., Schwartz, E. S., Cornuet, P., Albers, K. M. & Davis, B. M. (2011). TRPV1 and TRPA1 function and modulation are target tissue dependent. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(29), 10516–10528. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2992-10.2011>
- Marek-Jozefowicz, L., Nedoszytko, B., Grochocka, M., Żmijewski, M. A., Czajkowski, R., Cubala, W. J. & Slominski, A. T. (2023). Molecular Mechanisms of Neurogenic Inflammation of the Skin. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 5001. <https://doi.org/10.3390/ijms24055001>
- Massa, F., Sibae, A., Marsicano, G., Blaudzun, H., Storr, M. & Lutz, B. (2006). Vanilloid receptor (TRPV1)-deficient mice show increased susceptibility to dinitrobenzene sulfonic acid induced colitis. *Journal of molecular medicine*, 84(2), 142–146. <https://doi.org/10.1007/s00109-005-0016-2>
- Matthews, P. J., Aziz, Q., Facer, P., Davis, J. B., Thompson, D. G. & Anand, P. (2004). Increased capsaicin receptor TRPV1 nerve fibres in the inflamed human oesophagus. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 16(9), 897–902. <https://doi.org/10.1097/00042737-200409000-00014>
- McGarvey, L. P., Butler, C. A., Stokesberry, S., Polley, L., McQuaid, S., Abdullah, H., Ashraf, S., McGahon, M. K., Curtis, T. M., Arron, J., Choy, D., Warke, T. J., Bradding, P., Ennis, M., Zholos, A., Costello, R. W. & Heaney, L. G. (2014). Increased expression of bronchial epithelial transient receptor potential vanilloid 1 channels in

- patients with severe asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 133(3), 704-12.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.09.016>
- McIntyre, P., McLatchie, L. M., Chambers, A., Phillips, E., Clarke, M., Savidge, J., Toms, C., Peacock, M., Shah, K., Winter, J., Weerasakera, N., Webb, M., Rang, H. P., Bevan, S. & James, I. F. (2001). Pharmacological differences between the human and rat vanilloid receptor 1 (VR1). *British Journal of Pharmacology*, 132(5), 1084–1094. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703918>
- Meents, J. E., Fischer, M. J. M. & McNaughton, P. A. (2017). Sensitization of TRPA1 by Protein Kinase A. *PLOS ONE*, 12(1), e0170097. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170097>
- Mehra, M. (1996). RNA Isolation from cells and tissues. In: Krieg, P. A. (Hrsg.). *A laboratory guide to RNA: Isolation, analysis, and synthesis (S. 1-20)*. Wiley-Liss.
- Mendes, S. J. F., Sousa, F. I. A. B., Pereira, D. M. S., Ferro, T. A. F., Pereira, I. C. P., Silva, B. L. R., Pinheiro, A. J. M. C. R., Mouchrek, A. Q. S., Monteiro-Neto, V., Costa, S. K. P., Nascimento, J. L. M., Grisotto, M. A. G., Da Costa, R. & Fernandes, E. S. (2016). Cinnamaldehyde modulates LPS-induced systemic inflammatory response syndrome through TRPA1-dependent and independent mechanisms. *International Immunopharmacology*, 34, 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.02.012>
- Meng, J., Wang, J., Steinhoff, M. & Dolly, J. O. (2016). TNF α induces co-trafficking of TRPV1/TRPA1 in VAMP1-containing vesicles to the plasmalemma via Munc18-1/syntaxin1/SNAP-25 mediated fusion. *Scientific Reports*, 6, 21226. <https://doi.org/10.1038/srep21226>
- Metzemaekers, M., Gouwy, M., Proost, P. (2020). Neutrophil chemoattractant receptors in health and disease: double-edged swords. *Cellular & molecular immunology*, 17(5), 433-450. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0412-0>
- Miyazaki, A., Ohkubo, T., Hatta, M., Ishikawa, H. & Yamazaki, J. (2015). Integrin $\alpha 6 \beta 4$ and TRPV1 channel coordinately regulate directional keratinocyte migration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 458(1), 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.086>
- Mizogami M. & H. Tsuchiya H. (2022). Membrane Interactivity of Capsaicin Antagonized by Capsazepine. *International Journal of Molecular Science*, 23(7). <https://doi.org/10.3390/ijms23073971>

- Moilanen, L. J., Hämäläinen, M., Nummenmaa, E., Ilmarinen, P., Vuolteenaho, K., Nieminen, R. M., Lehtimäki, L. & Moilanen, E. (2015). Monosodium iodoacetate-induced inflammation and joint pain are reduced in TRPA1 deficient mice--potential role of TRPA1 in osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage*, 23(11), 2017–2026. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.09.008>
- Moparthy, L., Kichko, T. I., Eberhardt, M., Högestätt, E. D., Kjellbom, P., Johanson, U., Reeh, P. W., Leffler, A., Filipovic, M. R. & Zygmunt, P. M. (2016). Human TRPA1 is a heat sensor displaying intrinsic U-shaped thermosensitivity. *Scientific Reports*, 6, 28763. <https://doi.org/10.1038/srep28763>
- Morgan, M., Nencini, S., Thai, J. & Ivanusic, J. J. (2019). TRPV1 activation alters the function of A δ and C fiber sensory neurons that innervate bone. *Bone*, 123, 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2019.03.040>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Mukhopadhyay, I., Gomes, P., Aranake, S., Shetty, M., Karnik, P., Damle, M., Kuruganti, S., Thorat, S. & Khairatkar-Joshi, N. (2011). Expression of functional TRPA1 receptor on human lung fibroblast and epithelial cells. *Journal of receptor and signal transduction research*, 31(5), 350–358. <https://doi.org/10.3109/10799893.2011.602413>
- Murata, T., Honda, T., Mostafa, A., Kabashima, K. (2022). Stratum corneum as polymer sheet: concept and cornification processes. *Trends in Molecular Medicine* 28(5), 350–359. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2022.02.008>
- Müller, H.-J. & Prange, D. R. (2016). Real-Time-PCR. In: *PCR - Polymerase-Kettenreaktion* (2. Aufl., S. 65-76) Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-48236-0>
- Nassini, R., Pedretti, P., Moretto, N., Fusi, C., Carnini, C., Facchinetti, F., Viscomi, A. R., Pisano, A. R., Stokesberry, S., Brunmark, C., Svitacheva, N., McGarvey, L., Patacchini, R., Damholt, A. B., Geppetti, P. & Materazzi, S. (2012). Transient receptor potential ankyrin 1 channel localized to non-neuronal airway cells promotes non-neurogenic inflammation. *PLOS ONE*, 7(8), e42454. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042454>
- Nattkemper, L. A., Tey, H. L., Valdes-Rodriguez, R., Lee, H., Mollanazar, N. K., Albornoz, C., Sanders, K. M. & Yosipovitch, G. (2018). The Genetics of Chronic Itch:

- Gene Expression in the Skin of Patients with Atopic Dermatitis and Psoriasis with Severe Itch. *Journal of Investigative Dermatology*, 138(6), 1311–1317. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.12.029>
- Netea, M. G., Balkwill, F., Chonchol, M., Cominelli, F., Donath, M. Y., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Golenbock, D., Gresnigt, M. S., Heneka, M. T., Hoffman, H. M., Hotchkiss, R., Joosten, L. A. B., Kastner, D. L., Korte, M., Latz, E., Libby, P., Mandrup-Poulsen, T., Mantovani, A., Mills, K. H. G., . . . Dinarello, C. A. (2017). A guiding map for inflammation. *Nature immunology*, 18(8), 826–831. <https://doi.org/10.1038/ni.3790>
- Neuberger, A., Oda, M., Nikolaev, Y. A., Nadezhdin, K. D., Gracheva, E. O., Bagriantsev, S. N. & Sobolevsky, A. I. (2023). Human TRPV1 structure and inhibition by the analgesic SB-366791. *Nature communications*, 14(1), 2451. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38162-9>
- Nilius, B. & Appendino, G. (2011). Tasty and healthy TR(i)Ps. The human quest for culinary pungency. *EMBO Reports*, 12(11), 1094–1101. <https://doi.org/10.1038/embo.2011.200>
- Nilius, B., Prenen, J. & Owsianik, G. (2011). Irritating channels: the case of TRPA1. *The Journal of Physiology*, 589(Pt 7), 1543–1549. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.200717>
- Nolan, T.; Hugget, J.; Sanchez, E. (2013): *Good practice guide for the application of quantitative PCR (qPCR)*, LGC. Online verfügbar unter: <https://www.gene-quantification.de/national-measurement-system-qpcr-guide.pdf>, zuletzt geprüft am 10.01.2023
- Oh, M.-H., Oh, S. Y., Lu, J., Lou, H., Myers, A. C., Zhu, Z. & Zheng, T. (2013). TRPA1-dependent pruritus in IL-13-induced chronic atopic dermatitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 191(11), 5371–5382. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300300>
- O'Neill, J., Brock, C., Olesen, A. E., Andresen, T., Nilsson, M. & Dickenson, A. H. (2012). Unravelling the mystery of capsaicin: a tool to understand and treat pain. *Pharmacological Reviews*, 64(4), 939–971. <https://doi.org/10.1124/pr.112.006163>
- Pabbidi, M. R. & Premkumar, L. S. (2017). Role of Transient Receptor Potential Channels Trpv1 and Trpm8 in Diabetic Peripheral Neuropathy. *Journal of diabetes and treatment*, 2017(4). PMID: 30613832

- Park, K., Lee, J.-H., Cho, H.-C., Cho, S.-Y. & Cho, J.-W. (2010). Down-regulation of IL-6, IL-8, TNF- α and IL-1 β by glucosamine in HaCaT cells, but not in the presence of TNF- α . *Oncology letters*, 1(2), 289–292. <https://doi.org/10.3892/ol.00000051>
- Pasparakis, M., Haase, I. & Nestle, F. O. (2014). Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 14(5), 289–301. <https://doi.org/10.1038/nri3646>
- Patil, M. J., Belugin, S. & Akopian, A. N. (2011). Chronic alteration in phosphatidylinositol 4,5-biphosphate levels regulates capsaicin and mustard oil responses. *Journal of neuroscience research*, 89(6), 945–954. <https://doi.org/10.1002/jnr.22597>
- Paulsen, C. E., Armache, J.-P., Gao, Y., Cheng, Y. & Julius, D. (2015). Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. *Nature*, 520(7548), 511–517. <https://doi.org/10.1038/nature14367>
- Pecze, L., Szabó, K., Széll, M., Jósvey, K., Kaszás, K., Kúsz, E., Letoha, T., Prorok, J., Koncz, I., Tóth, A., Kemény, L., Vizler, C. & Oláh, Z. (2008). Human keratinocytes are vanilloid resistant. *PLOS ONE*, 3(10), e3419. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003419>
- Pershing, L. K., Reilly, C. A., Corlett, J. L. & Crouch, D. J. (2004). Effects of vehicle on the uptake and elimination kinetics of capsaicinoids in human skin in vivo. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 200(1), 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.03.019>
- Petrus, M., Peier, A. M., Bandell, M., Hwang, S. W., Huynh, T., Olney, N., Jegla, T. & Patapoutian, A. (2007). A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. *Molecular Pain*, 3, 40. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-3-40>
- Pietrzak, A., Michalak-Stoma, A., Chodorowska, G. & Szepietowski, J. C. (2010). Lipid disturbances in psoriasis: an update. *Mediators of Inflammation*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/535612>
- Popa, C., Netea, M. G., van Riel, P. L. C. M., van der Meer, J. W. M. & Stalenhoef, A. F. H. (2007). The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *Journal of Lipid Research*, 48(4), 751–762. <https://doi.org/10.1194/jlr.R600021-JLR200>
- Poulson, R. (1973). Isolation, Purification and Fractionation of RNA. In P. R. Stewart & D. S. Letham (Hrsg.), *The Ribonucleic Acids* (S. 243–261). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-00499-9_11

- Proksch, E., Brandner, J. M. & Jensen, J.-M. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Experimental Dermatology*, 17(12), 1063–1072. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x>
- Purhonen, A. K., Louhivuori, L. M., Kiehne, K., Kerman, K. E. O. & Herzig, K. H. (2008). TRPA1 channel activation induces cholecystokinin release via extracellular calcium. *FEBS letters*, 582(2), 229–232. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.12.005>
- Rahman, M. M. & McFadden, G. (2006). Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens. *PLOS Pathogens*, 2(2), e4. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020004>
- Raziyeva, K., Kim, Y., Zharkinbekov, Z., Kassymbek, K., Jimi, S. & Saparov, A. (2021). Immunology of Acute and Chronic Wound Healing. *Biomolecules*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/biom11050700>
- Reinartz, J., Bechtel, M. J. & Kramer, M. D. (1996). Tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in a human keratinocyte cell line (HaCaT) is counteracted by transforming growth factor-alpha. *Experimental Cell Research*, 228(2), 334–340. <https://doi.org/10.1006/excr.1996.0333>
- Rhyu, M.-R., Kim, Y. & Lyall, V. (2021). Interactions between Chemesthesis and Taste: Role of TRPA1 and TRPV1. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7). <https://doi.org/10.3390/ijms22073360>
- Ridiandries, A., Tan, J. T. M. & Bursill, C. A. (2018). The Role of Chemokines in Wound Healing. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10). <https://doi.org/10.3390/ijms19103217>
- Riedel, A., Lang, R., Rohm, B., Rubach, M., Hofmann, T. & Somoza, V. (2014). Structure-dependent effects of pyridine derivatives on mechanisms of intestinal fatty acid uptake: regulation of nicotinic acid receptor and fatty acid transporter expression. *The Journal of nutritional biochemistry*, 25(7), 750–757. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.03.002>
- Rohacs, T. (2015). Phosphoinositide regulation of TRPV1 revisited. *Pflügers Archiv*, 467(9), 1851–1869. <https://doi.org/10.1007/s00424-015-1695-3>
- Rohm, B., Holik, A.-K., Somoza, M. M., Pignitter, M., Zaunschirm, M., Ley, J. P., Krammer, G. E. & Somoza, V. (2013). Nonivamide, a capsaicin analog, increases dopamine and serotonin release in SH-SY5Y cells via a TRPV1-independent pathway. *Molecular nutrition & food research*, 57(11), 2008–2018. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200846>

- Rohm, B., Zaunschirm, M., Widder, S., Ley, J., Krammer, G., Somoza, V. (2014). Neurotransmitter-Releasing Potency of Structural Capsaicin-analogs in SH-SY5Y Cells. In T. Hofmann, W. M. P. Schieberle (Hrsg.), *Proceedings of the 10th Wartburg Symposium. Advances and Challenges in Flavor Chemistry & Biology* (S. 43–50). Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Eisenach
- Rohm, B., Riedel, A., Ley, J. P., Widder, S., Krammer, G. E. & Somoza, V. (2015). Capsaicin, nonivamide and trans-pellitorine decrease free fatty acid uptake without TRPV1 activation and increase acetyl-coenzyme A synthetase activity in Caco-2 cells. *Food & function*, 6(1), 173–185. <https://doi.org/10.1039/C4FO00435C>
- Rollyson, W. D., Stover, C. A., Brown, K. C., Perry, H. E., Stevenson, C. D., McNees, C. A., Ball, J. G., Valentovic, M. A. & Dasgupta, P. (2014). Bioavailability of capsaicin and its implications for drug delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 196, 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.09.027>
- Roux, P. P. & Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 68(2), 320–344. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.2.320-344.2004>
- Sampaio, A. L., Bressan, A. L., Vasconcelos, B. N. & Gripp, A. C. (2021). Skin manifestations associated with systemic diseases - Part I. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 96(6), 655–671. <https://doi.org/10.1016/j.abd.2021.02.008>
- Sarah R Wilson & Diana M Bautista. (2014). Role of Transient Receptor Potential Channels in Acute and Chronic Itch. In S. R. Wilson & D. M. Bautista (Hrsg.), *Itch: Mechanisms and Treatment* (Kap. 16). CRC Press/Taylor & Francis. PMID: 24830011
- Schlereth, T. et al. (2019). Diagnose und nicht interventionelle Therapie neuropathischer Schmerzen, S2k-Leitlinie: *Deutsche Gesellschaft für Neurologie* (Hrsg.), Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Online verfügbar unter: www.dgn.org/leitlinien, zuletzt geprüft am 03.03.2023
- Schmidt, M., Dubin, A. E., Petrus, M. J., Earley, T. J. & Patapoutian, A. (2009). Nociceptive signals induce trafficking of TRPA1 to the plasma membrane. *Neuron*, 64(4), 498–509. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.09.030>
- Schutte, S. C., Kadakia, F. & Davidson, S. (2021). Skin-Nerve Co-Culture Systems for Disease Modeling and Drug Discovery. *Tissue Engineering. Part C, Methods*, 27(2), 89–99. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2020.0296>

- SCF (2002). Scientific Committee on Food, Opinion of the Scientific Committee on Food on Capsaicin. Online verfügbar unter: https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/fs_food-improvement-agents_flavourings-out120.pdf, zuletzt geprüft am 25.03.2023
- Shuba, Y. M. (2020). Beyond Neuronal Heat Sensing: Diversity of TRPV1 Heat-Capsaicin Receptor-Channel Functions. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, 612480. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.612480>
- Silverman, H. A., Chen, A., Kravatz, N. L., Chavan, S. S. & Chang, E. H. (2020). Involvement of Neural Transient Receptor Potential Channels in Peripheral Inflammation. *Frontiers in Immunology*, 11, 590261. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.590261>
- Sim, S. L., Kumari, S., Kaur, S., Kohsrotehrani K. (2022). Macrophages in Skin Wounds: Functions and Therapeutic Potential. *Biomolecules*, 12(11), 1659. <https://doi.org/10.3390/biom12111659>
- Slavich, G. M. (2015). Understanding inflammation, its regulation, and relevance for health: a top scientific and public priority. *Brain, Behavior, and Immunity*, 45, 13–14. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.10.012>
- Southall, M. D., Li, T., Gharibova, L. S., Pei, Y., Nicol, G. D. & Travers, J. B. (2003). Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 304(1), 217–222. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.040675>
- Spahn, V., Stein, C. & Zöllner, C. (2014). Modulation of transient receptor vanilloid 1 activity by transient receptor potential ankyrin 1. *Molecular pharmacology*, 85(2), 335–344. <https://doi.org/10.1124/mol.113.088997>
- Ständer, S., Moormann, C., Schumacher, M., Buddenkotte, J., Artuc, M., Shpacovitch, V., Brzoska, T., Lippert, U., Henz, B. M., Luger, T. A., Metze, D. & Steinhoff, M. (2004). Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures. *Experimental Dermatology*, 13(3), 129–139. <https://doi.org/10.1111/j.0906-6705.2004.0178.x>
- Stepanenko, A. A. & Dmitrenko, V. V. (2015). Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene*, 574(2), 193–203. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.08.009>
- Story, G. M., Peier, A. M., Reeve, A. J., Eid, S. R., Mosbacher, J., Hricik, T. R., Earley, T. J., Hergarden, A. C., Andersson, D. A., Hwang, S. W., McIntyre, P., Jegla, T., Bevan, S. & Patapoutian, A. (2003). ANKTM1, a TRP-like channel

- expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell*, 112(6), 819–829. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00158-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00158-2)
- Sulk, M. & Steinhoff, M. (2015). Chapter 17 - Role of TRP Channels in Skin Diseases. In A. Szallasi (Hrsg.), *TRP Channels as Therapeutic Targets: From Basic Science to Clinical Use* (S. 293–323). Elsevier Science. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420024-1.00017-5>
- Suo, Y., Wang, Z., Zubcevic, L., Hsu, A. L., He, Q., Borgnia, M. J., Ji, R.-R. & Lee, S.-Y. (2020). Structural Insights into Electrophile Irritant Sensing by the Human TRPA1 Channel. *Neuron*, 105(5), 882-894.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.11.023>
- Szallasi, A., Cruz, F. & Geppetti, P. (2006). TRPV1: a therapeutic target for novel analgesic drugs? *Trends in molecular medicine*, 12(11), 545–554. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.09.001>
- Talavera, K., Startek, J. B., Alvarez-Collazo, J., Boonen, B., Alpizar, Y. A., Sanchez, A., Naert, R. & Nilius, B. (2020). Mammalian Transient Receptor Potential TRPA1 Channels: From Structure to Disease. *Physiological reviews*, 100(2), 725–803. <https://doi.org/10.1152/physrev.00005.2019>
- Tang, W. & Fan, Y. (2019). SIRT6 as a potential target for treating insulin resistance. *Life sciences*, 231, 116558. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116558>
- Thiel, G., Lesch, A., Rubil, S., Backes, T. M. & Rössler, O. G. (2018). Chapter Five - Regulation of Gene Transcription Following Stimulation of Transient Receptor Potential (TRP) Channels. In F. Loos (Hrsg.), *International Review of Cell and Molecular Biology : Transcriptional Gene Regulation in Health and Disease* (Bd. 335, S. 167–189). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2017.07.010>
- Toews, M. L. & Bylund, D. B. (2005). Pharmacologic principles for combination therapy. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2(4), 282-9; discussion 290-1. <https://doi.org/10.1513/pats.200504-037SR>
- Trevisan, G., Hoffmeister, C., Rossato, M. F., Oliveira, S. M., Silva, M. A., Silva, C. R., Fusi, C., Tonello, R., Minocci, D., Guerra, G. P., Materazzi, S., Nassini, R., Geppetti, P. & Ferreira, J. (2014). TRPA1 receptor stimulation by hydrogen peroxide is critical to trigger hyperalgesia and inflammation in a model of acute gout. *Free radical biology & medicine*, 72, 200–209. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.021>

- Tsai, Y.-C., Tsai, T.-F. (2017). Anti-interleukin and interleukin therapies for psoriasis: current evidence and clinical usefulness. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*, 9(11), 277–294. <https://doi.org/10.1177/1759720X17735756>
- Uçeyler, N., Schäfers, M. & Sommer, C. (2009). Mode of action of cytokines on nociceptive neurons. *Experimental Brain Research*, 196(1), 67–78. <https://doi.org/10.1007/s00221-009-1755-z>
- Ustaoglu, A., Sawada, A., Lee, C., Lei, W.-Y., Chen, C.-L., Hackett, R., Sifrim, D., Peiris, M. & Woodland, P. (2021). Heartburn sensation in nonerosive reflux disease: pattern of superficial sensory nerves expressing TRPV1 and epithelial cells expressing ASIC3 receptors. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 320(5), G804-G815. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00013.2021>
- Vacchini, A., Mortier, A., Proost, P., Locati, M., Metzemaekers, M. & Borroni, E. M. (2018). Differential Effects of Posttranslational Modifications of CXCL8/Interleukin-8 on CXCR1 and CXCR2 Internalization and Signaling Properties. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12). <https://doi.org/10.3390/ijms19123768>
- Vallion, R., Hardonnière, K., Bouredji, A., Damiens, M.-H., Deloménie, C., Pallardy, M., Ferret, P.-J. & Kerdine-Römer, S. (2022). The Inflammatory Response in Human Keratinocytes Exposed to Cinnamaldehyde Is Regulated by Nrf2. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/antiox11030575>
- van Herreweghe, F., Festjens, N., Declercq, W. & Vandenabeele, P. (2010). Tumor necrosis factor-mediated cell death: to break or to burst, that's the question. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(10), 1567–1579. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0283-0>
- van Wilson, G. (2013). Growth and Differentiation of HaCaT Keratinocytes. In *Epidermal Cells* (S. 33–41). Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/7651_2013_42
- Venkatachalam, K. & Montell, C. (2007). TRP channels. *Annual review of biochemistry*, 76, 387–417. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819>
- Verheijen, M., Lienhard, M., Schrooders, Y., Clayton, O., Nudischer, R., Boerno, S., Timmermann, B., Selevsek, N., Schlapbach, R., Gmuender, H., Gotta, S., Geraedts, J., Herwig, R., Kleinjans, J. & Caiment, F. (2019). DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro. *Scientific Reports*, 9(1), 4641. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40660-0>
- Vinuesa, A. G., Sancho, R., García-Limones, C., Behrens, A., Dijke, P. ten, Calzado, M. A. & Muñoz, E. (2012). Vanilloid receptor-1 regulates neurogenic inflammation in

- colon and protects mice from colon cancer. *Cancer research*, 72(7), 1705–1716. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3693>
- Vos, M. H., Neelands, T. R., McDonald, H. A., Choi, W., Kroeger, P. E., Puttfarcken, P. S., Faltynek, C. R., Moreland, R. B. & Han, P. (2006). TRPV1b overexpression negatively regulates TRPV1 responsiveness to capsaicin, heat and low pH in HEK293 cells. *Journal of Neurochemistry*, 99(4), 1088–1102. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04145.x>
- Walker, J., Ley, J. P., Schwerzler, J., Lieder, B., Beltran, L., Ziemba, P. M., Hatt, H., Hans, J., Widder, S., Krammer, G. E. & Somoza, V. (2017). Nonivamide, a capsaicin analogue, exhibits anti-inflammatory properties in peripheral blood mononuclear cells and U-937 macrophages. *Molecular nutrition & food research*, 61(2), 1600474. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600474>
- Wang, Y. Y., Hong, C. T., Chiu, W. T. & Fang, J. Y. (2001). In vitro and in vivo evaluations of topically applied capsaicin and nonivamide from hydrogels. *International Journal of Pharmaceutics*, 224(1-2), 89–104. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00755-4](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00755-4)
- Wang, Y., Cui, L., Xu, H., Liu, S., Zhu, F., Yan, F., Shen, S. & Zhu, M. (2017). TRPV1 agonism inhibits endothelial cell inflammation via activation of eNOS/NO pathway. *Atherosclerosis*, 260, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.03.016>
- Wardyn, J. D., Ponsford, A. H. & Sanderson, C. M. (2015). Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF-κB response pathways. *Biochemical Society Transactions*, 43(4), 621–626. <https://doi.org/10.1042/BST20150014>
- Waugh, D. J. J. & Wilson, C. (2008). The interleukin-8 pathway in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 14(21), 6735–6741. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4843>
- Wickett, R. R. & Visscher, M. O. (2006). Structure and function of the epidermal barrier. *American Journal of Infection Control*, 34(10), S98-S110. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2006.05.295>
- Wilkinson, M., Gonçalo, M., Aerts, O., Badulici, S., Bennike, N. H., Bruynzeel, D., Dickel, H., Garcia-Abujeta, J. L., Giménez-Arnau, A. M., Hamman, C., Isaksson, M., Johansen, J. D., Mahler, V., Niklasson, B., Orton, D., Pigatto, P., Pónyai, G., Rustemeyer, T., Schuttelaar, M. L. A., . . . Uter, W. (2019). The European baseline series and recommended additions: 2019. *Contact Dermatitis*, 80(1), 1–4. <https://doi.org/10.1111/cod.13155>

- Wollenberg, B. e. a. (2008). *Consensus-based European guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) in adults and children: part I*. <https://doi.org/10.1111/jdv.14891>
- Wu, D. (2005). Signaling mechanisms for regulation of chemotaxis. *Cell Research*, 15(1), 52–56. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290265>
- Wu, X., Deng, X., Wang, J. & Li, Q. (2020). Baicalin Inhibits Cell Proliferation and Inflammatory Cytokines Induced by Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) in Human Immortalized Keratinocytes (HaCaT) Human Keratinocytes by Inhibiting the STAT3/Nuclear Factor kappa B (NF- κ B) Signaling Pathway. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 26, e919392. <https://doi.org/10.12659/MSM.919392>
- Xiao, B., Dubin, A. E., Bursulaya, B., Viswanath, V., Jegla, T. J. & Patapoutian, A. (2008). Identification of transmembrane domain 5 as a critical molecular determinant of menthol sensitivity in mammalian TRPA1 channels. *Journal of Neuroscience*, 28(39), 9640–9651. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2772-08.2008>
- Xiao, T., Sun, M., Zhao, C. & Kang, J. (2023). TRPV1: A promising therapeutic target for skin aging and inflammatory skin diseases. *Frontiers in pharmacology*, 14, 1037925. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1037925>
- Yang, F., Xiao, X., Cheng, W., Yang, W., Yu, P., Song, Z., Yarov-Yarovoy, V. & Zheng, J. (2015). Structural mechanism underlying capsaicin binding and activation of the TRPV1 ion channel. *Nature chemical biology*, 11(7), 518–524. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1835>
- Yang, F. & Zheng, J. (2017). Understand spiciness: mechanism of TRPV1 channel activation by capsaicin. *Protein & Cell*, 8(3), 169–177. <https://doi.org/10.1007/s13238-016-0353-7>
- Yao, K., Dou, B., Zhang, Y., Chen, Z., Li, Y., Fan, Z., Ma, Y., Du, S., Wang, J., Xu, Z., Liu, Y., Lin, X., Wang, S. & Guo, Y. (2023). Inflammation-the role of TRPA1 channel. *Frontiers in Physiology*, 14, 1093925. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1093925>
- Yuan, X., Han, L., Fu, P., Zeng, H., Lv, C., Chang, W., Runyon, R. S., Ishii, M., Han, L., Liu, K., Fan, T., Zhang, W. & Liu, R. (2018). Cinnamaldehyde accelerates wound healing by promoting angiogenesis via up-regulation of PI3K and MAPK signaling pathways. *Laboratory Investigation*, 98(6), 783–798. <https://doi.org/10.1038/s41374-018-0025-8>

- Yun, J.-W., Seo, J. A., Jeong, Y. S., Bae, I.-H., Jang, W.-H., Lee, J., Kim, S.-Y., Shin, S.-S., Woo, B.-Y., Lee, K.-W., Lim, K.-M. & Park, Y.-H. (2011). TRPV1 antagonist can suppress the atopic dermatitis-like symptoms by accelerating skin barrier recovery. *Journal of dermatological science*, 62(1), 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.jderm-sci.2010.10.014>
- Zelová, H. & Hošek, J. (2013). TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflammation Research*, 62(7), 641–651. <https://doi.org/10.1007/s00011-013-0633-0>
- Zhang, L. L., Yan Liu, D., Ma, L. Q., Luo, Z. D., Cao, T. B., Zhong, J., Yan, Z. C., Wang, L. J., Zhao, Z. G., Zhu, S. J., Schrader, M., Thilo, F., Zhu, Z. M. & Tepel, M. (2007). Activation of transient receptor potential vanilloid type-1 channel prevents adipogenesis and obesity. *Circulation research*, 100(7), 1063–1070. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000262653.84850.8b>
- Zhang, X., Huang, J. & McNaughton, P. A. (2005). NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *The EMBO Journal*, 24(24), 4211–4223. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600893>
- Zhang, X., Yin, M. & Zhang, L. (2019). Keratin 6, 16 and 17-Critical Barrier Alarmin Molecules in Skin Wounds and Psoriasis. *Cells*, 8(8), 807. <https://doi.org/10.3390/cells8080807>
- Zhang, W., Lyu, M., Bessman, N. J., Xie, Z., Arifuzzaman, M., Yano, H., Parkhurst, C. N., Chu, C., Zhou, L., Putzel, G. G., Li, T.-T., Jin, W.-B., Zhou, J., Hu, H., Tsou, A. M., Guo, C.-J. & Artis, D. (2022). Gut-innervating nociceptors regulate the intestinal microbiota to promote tissue protection. *Cell*, 185(22), 4170–4189.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.09.008>
- Zheng, Y., Chen, J., Wu, X., Zhang, X., Hu, C., Kang, Y., Lin, J., Li, J., Huang, Y., Zhang, X. & Li, C. (2022). Enhanced Anti-Inflammatory Effects of Silibinin and Capsaicin Combination in Lipopolysaccharide-Induced RAW264.7 Cells by Inhibiting NF- κ B and MAPK Activation. *Frontiers in Chemistry*, 10, 934541. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.934541>
- Zhong, B., Ma, S. & Wang, D. H. (2020). Protective Effects of TRPV1 Activation Against Cardiac Ischemia/ Reperfusion Injury is Blunted by Diet-Induced Obesity. *Cardiovascular & hematological disorders drug targets*, 20(2), 122–130. <https://doi.org/10.2174/1871529X19666190912152041>

Zsombok, A. & Derbenev, A. V. (2016). TRP Channels as Therapeutic Targets in Diabetes and Obesity. *Pharmaceuticals* (Basel, Switzerland), 9(3).
<https://doi.org/10.3390/ph9030050>

12 Anhang

Tabelle 18: Rohdaten des MTT-Tests unter TNF- α Behandlung

	K_{H2O}	TNF-α [ng/mL]			
		10	20	40	
Prozentuale Änderung zur Kontrolle (K_{H2O})	106,60	87,36	77,81	104,81	Pt. 1
	104,44	110,21	84,02	119,56	
	94,86	143,93	84,96	116,57	
	121,17	124,72	87,03	131,06	
		128,18	87,21	131,49	
	91,29	135,78	131,13	151,05	Pt. 2
	98,49	114,74	125,69	111,97	
	95,81	110,34	131,74	128,05	
	102,81	138,93	112,34	121,48	
	98,06		117,79	143,75	
	74,57	85,65	104,92	114,14	Pt. 3
	105,84	151,23	158,24		
	89,24	133,01	165,82	131,24	
	122,88	134,62	150,10	157,38	
	93,94	155,43	146,47	119,81	
MW	100,00	125,29	117,68	127,31	
SD	28,45	21,40	29,44	15,10	

Rohdaten zur Bestimmung der Zellvitalität in HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 10 ng/mL, 20 ng/mL bzw. 40 ng/mL TNF- α verglichen zur Lösungsmittelkontrolle K_{H2O} (2 % ddH₂O). Die Daten sind als prozentuale Veränderung bezogen auf K_{H2O} angegeben und wurden mittels Nalimov-Tests von Ausreißern bereinigt.

Tabelle 19: Rohdaten des MTT-Tests unter Capsaicin bzw. Capsazepin Behandlung

	K_{DMSO}	Capsaicin [µM]				Capsazepin [µM]			
		10	50	100	300	0,1	1	10	
Prozentuale Änderung zur Kontrolle (K_{DMSO})	138,43	85,71	88,73	96,09	62,46	106,66	68,58	124,14	Pt. 1
	61,57	92,37	67,16	61,39	60,95	112,34	68,93	130,09	
		105,95	82,25	110,30	70,53	83,67	83,49	107,63	
		98,22	78,61	83,58		103,91	57,31	60,77	
	86,68	48,99	135,41	75,76	28,85		47,95	61,21	Pt. 2
	108,12	74,07	78,36	58,48	69,40	90,45	66,15	61,21	
	91,88	167,90			30,80	107,73	95,91	84,21	
	113,32								
	104,91	93,47	105,97	65,67	45,24	77,88	94,17	91,93	Pt. 3
	98,46	94,38	103,02	77,74	32,60	95,37	100,42	81,82	
	96,63		107,79	226,52	75,85	83,36		96,49	
	86,75					83,52	87,43	91,23	
	104,23					112,96	142,48	134,84	Pt. 4
	121,36					92,92	90,50	122,57	
	94,26					78,63	84,04	103,30	
	93,41					78,91	97,69		
MW	100,00	95,67	94,14	95,06	52,96	93,45	84,65	96,53	
SD	17,98	31,80	20,91	52,03	18,72	13,03	23,15	25,41	

Rohdaten zur Bestimmung der Zellvitalität in HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 10 µM, 50 µM, 100 µM bzw. 300 µM Capsaicin und 0,1 µM, 1 µM bzw. 10 µM Capsazepin verglichen zur Lösungsmittelkontrolle K_{DMSO} (0,1 % DMSO). Die Daten sind als prozentuale Veränderung bezogen auf K_{DMSO} angegeben und wurden mittels Nalimov-Tests von Ausreißern bereinigt.

Tabelle 20: Rohdaten des MTT-Tests unter Zimtaldehyd bzw. AP-18 Behandlung

	K_{DMSO}	Zimtaldehyd [μM]				AP-18 [μM]			
		10	50	100	300	1	5	10	
Prozentuale Änderung zur Kontrolle (K_{DMSO})	138,43		75,77	48,52	19,85	74,44		64,76	Pt. 1
	61,57	69,29	81,72	65,30	20,38	75,77		96,27	
		73,99	88,46	63,52	23,76	76,83	89,44	86,86	
		71,07	77,01	56,07	28,02	75,33	90,24	90,50	
	86,68	87,72	116,31	75,24	20,66	102,66	100,84	83,69	Pt. 2
	108,12	88,76	80,05	73,16	19,88	96,95	87,07	82,91	
	91,88	79,14	105,13	72,51	16,24	103,31	86,94	69,53	
	113,32								
	104,91	75,29	90,24	76,83	31,62	100,98	88,13	93,89	Pt. 3
	98,46	88,42	110,81		29,79	90,03	96,42	100,21	
	96,63	91,22	95,72	98,88	23,40	99,72	89,68	104,14	
MW	100	80,54	92,12	70,00	23,36	89,60	91,10	87,28	
SD	20,85	8,54	14,47	14,34	4,97	12,62	4,94	12,65	

Rohdaten zur Bestimmung der Zellvitalität in HaCaT-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M bzw. 300 μ M Zimtaldehyd und 1 μ M, 5 μ M bzw. 10 μ M AP-18 verglichen zur Lösungsmittelkontrolle K_{DMSO} (0,1 % DMSO). Die Daten sind als prozentuale Veränderung bezogen auf K_{DMSO} angegeben und wurden mittels Nalimov-Tests von Ausreißern bereinigt.

Tabelle 21: Rohdaten des MTT-Tests unter kombinierter Behandlung aus Agonist und Antagonist

	K_{DMSO}	[μM] Capsazepin + 10 μM Capsaicin			[μM] AP-18 + 50 μM Zimtaldehyd			
		0,1	1	10	1	5	10	
Prozentuale Änderung zur Kontrolle (K_{DMSO})	183,87	40,08	35,72	30,22	30,22	22,15	0,77	Pt. 1
	121,13	61,97	25,86	22,41	22,41	10,63	7,94	
	93,60	60,69	39,05	23,56	23,56	11,27	-1,15	
	47,25			18,44	18,44	25,99	7,55	
	54,16	35,08	35,85	19,46	19,46	3,97	0,90	
	116,44	101,05	87,10	64,45	81,70	72,21	82,32	Pt. 2
	61,23	116,56	91,75	71,03	90,14	76,43	75,31	
	114,27	120,97	67,68	60,67	103,23	84,06	75,81	
	106,45	92,56	93,98	81,89	98,08	83,00	81,64	
	101,61	125,19	116,25	93,49	98,08	80,02	96,53	
	137,80	115,08	118,81	108,37	87,14	107,74	114,83	Pt. 3
	102,81	101,48	108,66	85,90	87,97	100,20	98,00	
	99,08	122,00	114,42	106,50	77,36	93,86	88,63	
	82,29	103,56	103,14	103,43	101,94	94,89	98,42	
	78,02	112,22	102,64	97,92	89,50	89,67	91,82	
	103,44	115,93	110,72	78,92	82,67	90,96	58,93	Pt. 4
	86,64	106,69	100,48	46,61	101,15	105,18	96,95	
	99,24	104,06	104,56	87,82	100,31	97,12	109,66	
	110,67	104,68	105,85	84,80	112,40	93,76	113,69	
MW	100	96,66	86,81	67,68	75,04	70,69	68,34	
SD	30,70	27,88	31,37	31,66	33,23	35,71	42,25	

Rohdaten zur Bestimmung der Zellvitalität in HaCaT-Zellen nach 24-stündiger kombinierter Behandlung von 10 μM Capsaicin mit unterschiedlichen Konzentrationen von Capsazepin (0,1 μM ; 1 μM ; 10 μM) bzw. 50 μM Zimtaldehyd mit unterschiedlichen Konzentrationen von AP-18 (1 μM ; 5 μM ; 10 μM). Die Daten sind verglichen zur Lösungsmittelkontrolle K_{DMSO} (0,1 % DMSO) und als prozentuale Veränderung bezogen auf K_{DMSO} angegeben. Die Daten wurden mittels Nalimov-Tests von Ausreißern bereinigt.

Tabelle 22: Rohdaten der *CXCL8* RT-qPCR unter TNF- α Behandlung für 48 h

		CXCL8						
		K _{H2O}	TNF-α [ng/mL]					
			2,5	5	10	20	40	
x-fache Änderung zur Kontrolle (K _{H2O})		0,97	6,86	3,56	7,10	19,34	14,61	Pt. 1
		1,59	12,77	14,88	20,86	35,86	34,02	
			14,11	25,72	40,08	56,46	58,33	
		0,25	3,34	5,67	11,09	13,72	15,69	
		0,51	3,76	5,39	10,54	12,43	15,52	
		0,48	3,54	5,53	11,35	13,93	15,17	
		0,53	6,24	9,79	16,15	19,57	25,43	Pt. 2
		0,76	6,65	9,52	16,95	18,11	23,35	
		0,66	6,11	10,16	15,09	20,05	22,71	
		0,97	7,86	11,56	16,93	27,77	32,09	
		0,91	7,80	11,74	17,60	28,74	32,61	
			7,65	14,62	19,37	22,96	32,02	
		1,54	23,61	39,23	57,95		128,56	Pt. 3
		1,10					127,38	
		0,80					113,80	
		0,91	22,96	41,55	52,36	93,37	120,03	
		1,08	14,58		55,75	101,43	124,97	
		1,37	22,31	40,23			125,90	
		1,16	16,42	19,47	23,08	29,73	40,24	Pt. 4
		0,96	15,89	19,82	22,44	28,20	44,69	
		1,27	16,11	21,64	21,38	25,14	37,11	
		1,19	17,10	12,26	19,15	38,64	43,71	Pt. 5
		1,14	19,42	11,91	20,40	39,74	49,14	
		1,07	17,71	12,19	18,79	43,05	43,05	
		0,76	8,10	9,46	9,22	25,98	29,58	Pt. 6
		0,84	8,06	10,89	9,84	25,08	31,18	
		1,00	7,94	12,33	8,96	26,70	32,37	
		1,07	12,20	16,15	12,27	31,17	44,88	
		1,39	11,21	16,90	13,02	33,48	47,72	
		1,73	11,74	18,76	13,96	36,71	45,27	
MW		1,00	11,86	15,96	20,80	33,36	51,71	
SD		0,35	6,01	10,21	14,05	21,34	38,10	

Rohdaten zur Bestimmung der x-fachen Änderung der relativen Genexpression von *CXCL8* in HaCaT-Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit 2,5 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL bzw. 40 ng/mL TNF- α . Die Werte sind normalisiert auf die Referenzgene und bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle K_{H2O} (2 % ddH₂O) angegeben. Die Daten wurden mittels Nalimov-Tests von Ausreißern bereinigt.

Tabelle 23: Rohdaten des ELISA-Tests unter TNF- α Behandlung für 48 h

		IL-8					
		K _{H2O}	TNF- α [ng/mL]				
			2,5	5	10	20	40
x-fache Änderung zur Kontrolle (K _{H2O})	0,90	1,54	1,96	2,63	3,23	4,79	Pt. 1
	0,86	1,43	1,92	2,38	3,57	5,22	
	0,99	5,48	6,46	8,29	11,01	9,45	Pt. 2
	1,13	5,51	6,20	8,62	11,43	9,99	
	0,87	2,51	3,53	4,12	5,74	6,76	Pt. 3
	0,87	2,85	3,80	4,12	6,10	7,29	
	0,94	2,93	3,32	3,89	4,53	5,79	Pt. 4
	1,27	3,19	3,61	4,24	4,79	6,92	
	1,14	3,02	3,30	4,28	4,71	5,10	Pt. 5
	1,04	3,05	3,79	4,35	4,85	5,21	
MW	1,00	3,15	3,79	4,69	5,99	6,65	
SD	0,14	1,38	1,50	2,10	2,88	1,83	

Rohdaten der x-fachen Änderung der relativen freigesetzten Menge an IL-8 in HaCaT-Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit 2,5 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL bzw. 40 ng/mL TNF- α . Die Werte sind normalisiert auf die Referenzgene und als x-fache Änderung bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle K_{H2O} (2 % ddH₂O) angegeben. Die Daten wurden mittels Nalimov-Tests von Ausreißern bereinigt.

Tabelle 24: Rohdaten der *TRPV1* RT-qPCR unter TNF- α Behandlung für 48 h

		TRPV1						
		K _{H2O}	TNF-α [ng/mL]					
			2,5	5	10	20	40	
x-fache Änderung zur Kontrolle (K _{H2O})			0,003	0,14	0,16	0,05	0,06	Pt. 1
	0,05		0,01	0,33	0,42	0,08	0,14	
	0,19		0,02	0,44	0,78	0,11	0,17	
	1,82		0,92	0,53	0,85	0,65	0,55	
	1,87		1,10	0,61	0,90	0,64	0,76	
			0,84	0,69	0,90	0,59	0,64	
		0,89	0,79	0,65	0,95	0,93	0,98	Pt. 2
		0,91	0,98	0,85	0,98	0,88	0,89	
		0,92	1,13	0,84	0,97	0,80	0,95	
		1,12	1,46	0,98	1,09	1,03	1,13	
		1,10	1,25	0,89	1,12	1,08	1,03	
		1,06	1,06	0,95	1,22	0,98	1,04	
		0,65	0,20	0,21	0,33	0,11	0,11	Pt. 3
		1,04	0,20	0,24	0,49	0,26	0,23	
		1,31	0,35	0,32	0,37	0,46	0,33	
		0,59	1,62	0,50	1,06	0,47	0,59	Pt. 4
		0,88	1,60	1,03	1,00	0,55	1,16	
		1,53	1,32		1,12	0,88	1,04	
		0,60	0,59	0,81	0,57	0,86	0,67	Pt. 5
		0,94	1,35	0,97	0,97	0,86	0,63	
		1,47	1,59	1,23	0,98	0,95	0,93	
		0,72	0,86	0,57	0,46	1,01		Pt. 6
		0,89	1,25	0,99	0,70			
		1,39	1,79	1,30	1,04			
MW		1,00	0,93	0,70	0,81	0,65	0,67	
SD		0,46	0,55	0,33	0,30	0,34	0,37	

Rohdaten der x-fachen Änderung der relativen Genexpression von *TRPV1* in HaCaT-Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit 2,5 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL bzw. 40 ng/mL TNF- α . Die Werte sind normalisiert auf die Referenzgene und bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle K_{H_2O} (2 % ddH₂O) angegeben. Die Daten wurden mittels Nalimov-Tests von Ausreißern bereinigt.

Tabelle 25: Rohdaten der *TRPA1* RT-qPCR unter TNF- α Behandlung für 48 h

		TRPA1					
		TNF-α [ng/mL]					
K _{H2O}		2,5	5	10	20	40	
x-fache Änderung zur Kontrolle (K _{H2O})		0,51		0,11	0,67	1,13	Pt. 1
	0,94	1,82	0,04	0,69	2,52	1,90	
	0,87	1,00	0,02	0,47	1,29	3,10	
	0,91	0,05	0,07	0,79	0,06	0,76	
	1,52	0,07	0,22	0,42	0,43	1,87	
	1,20	0,14	0,21	0,36	0,88	1,71	
	0,99	1,73	1,96		4,25	3,75	Pt. 2
	0,22		2,10		2,02		
	0,53	1,79	2,01	5,12	5,52		
	0,38	2,59	1,89	2,05	3,47	3,03	
		1,10	3,33	5,12	4,86	3,78	
	1,13	2,11	3,04	4,60	3,02	3,83	
	1,30	0,07	1,24	4,57	1,06	1,36	Pt. 3
	0,65	0,21	0,72	2,87	2,72		
	1,10	0,31	0,27	1,51	1,73	1,86	
	1,11	0,28	0,21	2,41	2,42	0,53	
	1,24	1,27	0,20	4,37	1,15	1,60	
	1,14	0,12	0,90	4,15	1,27	0,70	
	0,11	2,59	2,55	0,95		1,40	Pt. 4
	1,85			0,92		0,19	
	1,30		2,39			1,81	
		0,87	0,21	2,29		1,96	Pt. 5
	1,20	2,93	0,79	0,76	1,41	0,62	
	0,98	2,05	0,97	0,82	3,30	2,98	
	0,45	2,48	0,23	1,06	1,61	0,51	
		0,56		1,68	1,46	0,50	Pt. 6
	2,04	0,93	0,74	1,67	1,20	3,85	
	1,34	2,58	0,49	0,24		2,45	
	0,52	1,14	3,34	1,08	0,59	0,35	
		1,48	2,09	0,85	2,43	1,72	
MW	1,00	1,21	1,19	1,92	2,05	1,82	
SD	0,47	0,94	1,09	1,64	1,40	1,17	

Rohdaten der x-fachen Änderung der relativen Genexpression von *TRPA1* in HaCaT-Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit 2,5 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL bzw. 40 ng/mL TNF- α . Die Werte sind normalisiert auf die Referenzgene und bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle K_{H_2O} (2 % ddH₂O) angegeben. Die Daten wurden mittels Nalimov-Tests von Ausreißern bereinigt.

Tabelle 26: Rohdaten der *CXCL8* RT-qPCR unter 20 ng/mL TNF- α Behandlung

		CXCL8						
		K	Zeit [h]					
			3	6	12	24	48	
x-fache Änderung zur Kontrolle (K)		0,78	585,02	189,53	213,67	41,19	90,81	Pt. 1
		1,13	800,01	289,75	244,05	53,28	117,47	
		1,19			350,44	70,89	156,28	
		0,62	833,21	210,74	181,65	69,64	173,74	Pt. 2
		1,12	1019,59	271,61	289,40	85,23	212,65	
		1,37						
		0,70	284,92	135,08	145,43	31,47	37,55	Pt. 3
		0,90	438,72	201,10	159,21	41,97	50,06	
			637,93	241,79	182,14	50,26	59,95	
		0,96	295,62	138,23	138,44	53,33	57,38	Pt. 4
		0,98	337,38	134,48	134,48	52,29	56,27	
		1,15	340,45	156,76	142,52	47,43	51,04	
		1,07	478,46	215,20	158,27	38,35	30,35	Pt. 5
		1,18	437,99	216,87	151,98	40,76	32,26	
		0,85	494,21	233,77	148,80	43,10	34,11	
MW		1,00	537,19	202,69	188,61	51,37	82,85	
SD		0,21	228,64	50,75	64,62	14,74	59,14	

Rohdaten der x-fachen Änderung der relativen Genexpression von *CXCL8* in HaCaT-Zellen nach Behandlung mit 20 ng/mL TNF- α für 3 h, 6 h, 12 h, 24 h bzw. 48 h. Die Werte sind normalisiert auf die Referenzgene und bezogen auf die Kontrolle (keine TNF- α Behandlung) angegeben. Die Daten wurden mittels Nalimov-Tests von Ausreißern bereinigt.

Tabelle 27: Rohdaten des ELISA-Tests unter 20 ng/mL TNF- α Behandlung

		IL-8					
		K	Zeit [h]				
			3	6	12	24	48
x-fache Änderung zur Kontrolle (K)	1,06	2,13	3,40	4,13	5,82	8,53	Pt. 1
	1,01	2,16	3,41	4,17	5,50	8,32	
	0,98	1,56	2,43	2,41	3,01	3,17	Pt. 2
	1,02	1,54	2,28	2,30	3,16	3,40	
	1,03	2,09	3,28	3,47	4,35	5,24	Pt. 3
	1,02	2,12	3,28	3,31	4,29	5,05	
	0,94	2,30	2,92	3,84	4,20	6,13	Pt. 4
	1,04	2,26	2,95	3,77	4,38	6,64	
	0,95	2,25	2,37	2,60	3,21	5,73	Pt. 5
	0,95	2,23	2,35	2,96	11,86	6,03	
MW	1,00	2,07	2,87	3,30	4,98	5,82	
SD	0,04	0,28	0,47	0,70	2,59	1,77	

Rohdaten der x-fachen Änderung der relativen freigesetzten Menge an IL-8 in HaCaT-Zellen nach Behandlung mit 20 ng/mL TNF- α für 3 h, 6 h, 12 h, 24 h bzw. 48 h. Die Werte sind normalisiert auf die Referenzgene und als x-fache Änderung bezogen auf die Kontrolle K (keine TNF- α Behandlung) angegeben. Die Daten wurden mittels Nalimov-Tests von Ausreißern bereinigt.

Tabelle 28: Rohdaten der *TRPV1* RT-qPCR unter 20 ng/mL TNF- α Behandlung

		TRPV1						
		K	Zeit [h]					
			3	6	12	24	48	
x-fache Änderung zur Kontrolle (K)		0,94	0,82	0,34	0,52	0,59	1,30	Pt. 1
		0,95	0,68	0,38	0,47	0,65	1,43	
		1,11	0,62	0,33	0,52	0,46	1,02	
		0,94	0,80	0,22	0,95	0,55	1,37	Pt. 2
		0,94	0,76	0,32	1,05	0,55	1,38	
		1,12	0,81	0,25		0,56	1,41	
		1,07	0,35	0,24	0,59	0,41	0,49	Pt. 3
		0,96	0,40	0,21	0,60	0,43	0,51	
		0,97	0,94	0,24	0,64	0,38	0,46	
		1,00	0,32	0,15	0,44	0,71	0,76	Pt. 4
		1,00	0,34	0,21	0,47	0,77	0,83	
		1,00	0,50	0,19	0,45	0,66	0,71	
		0,88	0,69	0,19	0,26	0,10	0,08	Pt. 5
		1,01	0,63	0,21	0,25	0,17	0,13	
		1,11	0,71	0,39	0,28	0,09	0,07	
MW		1,00	0,62	0,26	0,54	0,47	0,80	
SD		0,07	0,20	0,07	0,23	0,21	0,50	

Rohdaten der x-fachen Änderung der relativen Genexpression von *TRPV1* in HaCaT-Zellen nach Behandlung mit 20 ng/mL TNF- α für 3 h, 6 h, 12 h, 24 h bzw. 48 h. Die Werte sind normalisiert auf die Referenzgene und bezogen auf die Kontrolle K (keine TNF- α Behandlung) angegeben. Die Daten wurden mittels Nalimov-Tests von Ausreißern bereinigt.

Tabelle 29: Rohdaten der *TRPA1* RT-qPCR unter 20 ng/mL TNF- α Behandlung

		TRPA1						
		K	Zeit [h]					
			3	6	12	24	48	
x-fache Änderung zur Kontrolle (K)		0,41	0,06	0,65	0,09	0,37	0,82	Pt. 1
		1,34	0,14	0,46	0,14	0,07	0,16	
		1,10	0,23	0,99	0,25	0,42	0,93	
		1,02	0,36	0,44	1,30	1,06	2,63	Pt. 2
		0,94	0,75	0,18	2,19	4,14		
		0,89	0,90	0,40	1,88	1,43	3,58	
		0,90	0,23	0,06	0,45	0,36	0,43	Pt. 3
		0,76	0,23	0,53	0,15	0,88	1,05	
		1,19	0,03	0,11	0,31	0,36	0,43	
			1,57	0,41	1,81	3,20	3,45	Pt. 4
		1,48	1,27		1,49	0,55	0,59	
		1,13		2,98	1,89	1,43	1,54	
		1,24	0,45	0,76	2,59	1,95	1,55	Pt. 5
		0,44	0,31	1,08			4,26	
		1,17	0,91	1,82		2,23	1,77	
MW		1,00	0,53	0,78	1,12	1,32	1,65	
SD		0,31	0,48	0,78	0,91	1,20	1,32	

Rohdaten der x-fachen Änderung der relativen Genexpression von *TRPA1* in HaCaT-Zellen nach Behandlung mit 20 ng/mL TNF- α für 3 h, 6 h, 12 h, 24 h bzw. 48 h. Die Werte sind normalisiert auf die Referenzgene und als x-fache Änderung bezogen auf die Kontrolle K (keine TNF- α Behandlung) angegeben. Die Daten wurden mittels Nalimov-Tests von Ausreißern bereinigt.

Tabelle 30: Rohdaten RT-qPCR bei Kontrollbehandlung unter Vorbehandlung mit TRPV1 Agonist/ Antagonist

6 h	<i>CXCL8</i>				<i>TRPV1</i>				
	K	Cap	CapZ	Cap + CapZ	K	Cap	CapZ	Cap + CapZ	
x-fache Änderung zur Kontrolle (K)	1,04	1,80	1,67	1,44	1,03	2,98	4,59	1,26	Pt. 1
	1,08	1,86	1,84	1,58	1,18	2,88	4,56	1,08	
	0,96	1,87	1,75	1,61	0,79	3,44	3,50	1,46	
	1,00	1,13	2,49	1,28	0,92	0,79	1,06	0,53	Pt. 2
	0,85	1,24	2,65	1,31	0,87	0,69	1,29	0,43	
		1,23	2,98	1,17	1,20	1,06	0,81	0,52	
	0,97	0,87	0,86	0,95	0,91	0,85	0,83	0,88	Pt. 3
	1,06	1,10	0,91	0,96	0,98	0,88	0,89	0,89	
	1,05	1,05	0,96	1,02	1,11	0,66	1,04	0,94	
MW	1,00	1,35	1,79	1,26	1,00	1,58	2,06	0,89	
SD	0,08	0,39	0,79	0,25	0,14	1,15	1,65	0,35	
48 h	<i>CXCL8</i>				<i>TRPV1</i>				
	K	Cap	CapZ	Cap + CapZ	K	Cap	CapZ	Cap + CapZ	
x-fache Änderung zur Kontrolle (K)	0,88	2,52	1,30	0,77	1,08	0,38	0,87	0,73	Pt. 1
	1,03	3,08	1,23	0,68	1,04	0,39	0,98	0,65	
	1,09	3,24	1,35	0,89	0,88	0,45	0,75	0,67	
	0,85	1,26	1,34	0,48	0,88	1,29	0,96	0,26	Pt. 2
	1,02	1,41	1,03	0,40	1,08	1,35	0,52	0,45	
	1,13	1,44	1,11	0,52	1,04	1,26	0,79	0,41	
	0,81	0,32	0,39	0,36	0,86	0,29	0,42	0,51	Pt. 3
	1,07	0,32	0,22	0,33	1,02	0,24	0,47	0,54	
	1,12	0,27	0,37	0,43	1,12	0,28	0,54	0,52	
MW	1,00	1,54	0,93	0,54	1,00	0,66	0,70	0,53	
SD	0,12	1,17	0,46	0,20	0,10	0,49	0,22	0,15	

Rohdaten der x-fachen Änderung der relativen Genexpression von *TRPV1* bzw. *CXCL8* in HaCaT-Zellen nach Vorbehandlung mit TRPV1 Agonist und/oder Antagonist und anschließender Behandlung ohne TNF- α für 6 h bzw. 48 h. Die Werte sind normalisiert auf die Referenzgene und bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle K (0,2 % DMSO; 1 % ddH₂O) angegeben. Die Daten wurden mittels Nalimov-Tests von Ausreißern bereinigt. Cap: Capsaicin; CapZ: Capsazepin.

Tabelle 31: Rohdaten RT-qPCR bei TNF- α Behandlung unter Vorbehandlung mit TRPV1 Agonist/ Antagonist

6 h	<i>CXCL8</i>				<i>TRPV1</i>				
	K_{TNF}	Cap	CapZ	Cap + CapZ	K_{TNF}	Cap	CapZ	Cap + CapZ	
x-fache Änderung zur Kontrolle (K _{TNF})	1,01	0,99	1,07	0,51	1,03	2,32	2,16	0,81	Pt. 1
	1,01	0,93	1,05	0,44	0,83	2,17	1,93	0,77	
	0,98	0,91	1,04	0,47	1,13	2,32	1,87	0,68	
	0,96	1,33	1,42	1,01		2,24	1,12	0,78	Pt. 2
	0,95	1,26	1,38	1,01	1,14	1,10	1,49	0,97	
	1,09		1,62	1,16	1,35	0,78	1,82	1,14	
	0,99	0,68	0,74	0,73	0,97	1,16	0,85	1,47	Pt. 3
	0,94	0,69	0,71	0,73	0,98	1,02	1,11	1,53	
	1,07	0,70	0,78	0,75	1,05	0,70	1,01	1,22	
MW	1,00	0,94	1,09	0,76	1,06	1,53	1,48	1,04	
SD	0,05	0,25	0,33	0,26	0,15	0,70	0,48	0,31	
48 h	<i>CXCL8</i>				<i>TRPV1</i>				
	K_{TNF}	Cap	CapZ	Cap + CapZ	K_{TNF}	Cap	CapZ	Cap + CapZ	
x-fache Änderung zur Kontrolle (K _{TNF})	1,01	1,34	1,18	0,70	1,22	3,65		4,24	Pt. 1
	0,99	1,31	1,17	0,64	0,78	4,13	4,66	3,73	
	1,00	1,13	1,17	0,65		4,10		3,86	
	1,02	0,99	0,21	0,41	1,08	1,67	0,39	1,55	Pt. 2
	1,01	0,91	0,20	0,44	0,87	1,57	0,31	1,41	
	0,97	1,07	0,21	0,48	1,05	1,45	0,46	1,11	
	0,98	0,85	1,23	0,95	0,98	1,21	0,87	1,03	Pt. 3
	0,97	0,89	1,17	0,92	1,08	1,18	0,91	1,05	
	1,05	1,07	1,25		0,94	0,75	0,93	0,80	
MW	1,00	1,06	0,87	0,65	1,00	2,19	1,22	2,09	
SD	0,03	0,18	0,50	0,21	0,14	1,36	1,54	1,41	

Rohdaten der x-fachen Änderung der relativen Genexpression von *TRPV1* bzw. *CXCL8* in HaCaT-Zellen nach Vorbehandlung mit TRPV1 Agonist und/oder Antagonist und anschließender Behandlung mit 20 ng/mL TNF- α für 6 h bzw. 48 h. Die Werte sind normalisiert auf die Referenzgene und bezogen auf die Kontrolle K_{TNF} (0,2 % DMSO; 20 ng/mL TNF- α) angegeben. Die Daten wurden mittels Nalimov-Tests von Ausreißern bereinigt. Cap: Capsaicin; CapZ: Capsazepin.

Tabelle 32: Rohdaten des ELISA-Tests unter Vorbehandlung mit TRPV1 Agonist/Antagonist

ohne TNF- α		IL-8								
		6 h				48 h				
		K	Cap	CapZ	Cap+ CapZ	K	Cap	CapZ		Cap+ CapZ
x-fache Änderung zur Kontrolle (K)	1,00	1,17	0,72	0,90		1,79		0,75	Pt. 1	
		1,26	1,05	0,84	1,00	1,82	0,92	0,67		
			1,52	0,65	1,01	0,99	1,41	1,06	Pt. 2	
	1,00	0,64	1,61	0,98	0,99	0,70	1,56	0,87		
	0,66		0,51	0,30	1,02	1,65	2,73	1,04	Pt. 3	
	1,34	0,15	0,39	0,38	0,98		2,99	1,07		
MW	1,00	0,81	0,97	0,67	1,00	1,39	1,92	0,91		
SD	0,28	0,52	0,52	0,28	0,02	0,51	0,89	0,17		
mit TNF- α		6 h				48 h				
		K _{TNF}	Cap	CapZ	Cap+ CapZ	K _{TNF}	Cap	CapZ	Cap+ CapZ	
x-fache Änderung zur Kontrolle (K _{TNF})	0,98	0,61	0,53	0,65	0,94	0,83	0,81	0,62	Pt. 1	
	1,02	0,63	0,55	0,66	1,06	0,92	0,86	0,66		
	0,98	0,58	0,94	1,08	0,93	0,95	0,55	0,53	Pt. 2	
	1,02	0,62	1,02	1,12	1,07	0,97	0,55	0,62		
	0,99	0,67	0,76	0,91	0,97	0,16	0,24	0,36	Pt. 3	
	1,01	0,70	0,84	0,77	1,03	0,24	0,25	0,38		
MW	1,00	0,63	0,77	0,87	1,00	0,68	0,54	0,53		
SD	0,02	0,04	0,20	0,21	0,06	0,37	0,26	0,13		

Rohdaten der x-fachen Änderung der relativen freigesetzten Menge an IL-8 in HaCaT-Zellen nach Vorbehandlung mit TRPV1 Agonist und/oder Antagonist und anschließender Behandlung mit 20 ng/mL TNF- α für 6 h bzw. 48 h. Die Werte sind normalisiert auf die Referenzgene und als x-fache Änderung bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle K (0,2 % DMSO; 1 % ddH₂O) bzw. TNF- α Kontrolle K_{TNF} (0,2 % DMSO; 20 ng/mL TNF- α) angegeben. Die Daten wurden mittels Nalimov-Tests von Ausreißern bereinigt. *Cap*: Capsaicin; *CapZ*: Capsazepin.

Tabelle 33: Rohdaten RT-qPCR bei Kontrollbehandlung unter Vorbehandlung mit TRPA1 Agonist/ Antagonist

6 h	<i>CXCL8</i>				<i>TRPA1</i>				
	K	Zim	AP	Zim + AP	K	Zim	AP	Zim + AP	
x-fache Änderung zur Kontrolle (K)	1,01	0,90	0,86	1,07	1,08	0,41	0,20	0,28	Pt. 1
	1,05	0,70	0,93	1,09	0,68	0,39	0,25	0,18	
	0,93	1,11	0,82	1,22	1,24	0,25		0,39	
	0,98		0,96	1,10	0,95		0,68	0,44	Pt. 2
			0,96	1,03	0,84		1,07	0,87	
			1,16	1,18	1,21		0,51	1,17	
	0,96	0,50	0,78	0,49	1,30	0,98	0,46	1,39	Pt. 3
	1,04	0,52	0,88	0,49	0,70		0,80		
	1,01	0,57	0,83	0,50		1,31	0,81		
	0,97	0,65	0,70	0,27	1,05	1,19	0,72	0,46	Pt. 4
	1,04	0,65	0,68	0,32		0,59	0,27	0,31	
	1,00	0,62	0,69	0,30	0,95	0,67	0,30	0,50	
	0,96	1,49	1,21	0,77	1,18	1,86	0,58	1,04	Pt. 5
	1,06	1,51	1,16	0,79	0,82	1,91	1,44		
	0,98	1,43	1,13	0,92				1,31	
MW	1,00	0,89	0,92	0,77	1,00	0,96	0,62	0,70	
SD	0,04	0,39	0,18	0,35	0,21	0,60	0,36	0,43	
48 h	<i>CXCL8</i>				<i>TRPA1</i>				
	K	Zim	AP	Zim + AP	K	Zim	AP	Zim + AP	
x-fache Änderung zur Kontrolle (K)	0,88	0,84	1,50		0,93	0,88	1,90		Pt. 1
	1,03	0,93	1,94		0,86	1,07	2,61		
	1,09	1,03	2,17		1,43	1,30	1,03		
		0,80	0,40	1,55		0,22	0,26	0,27	Pt. 2
	1,02	0,91	0,58	1,25	1,35	0,27	0,74		
	1,13	0,75	0,42	1,20	0,79		1,61		
	1,04	0,59	1,16	1,06	0,42	0,89	0,09		Pt. 3
	0,96	1,11	1,04	1,09	0,77			3,63	
	1,00	0,84	0,91	1,12			1,11		
	1,03		2,79	1,67	0,90	1,60	2,61	0,76	Pt. 4
	1,04	3,66	2,41	2,11	1,30	3,00	2,00	1,33	
	0,93	3,54	2,49	2,16	1,01	4,54	3,12		
	1,01	0,53	0,60	0,76	0,51	0,17		0,69	Pt. 5
	0,96	0,52	0,59	0,77	1,23	0,05	0,41	0,18	
	1,02	0,54	0,57	0,64	1,48	0,46	0,42	0,63	
MW	1,00	1,18	1,30	1,28	1,00	1,20	1,38	1,07	
SD	0,06	1,04	0,84	0,50	0,34	1,33	1,01	1,19	

Rohdaten der x-fachen Änderung der relativen Genexpression von *TRPA1* bzw. *CXCL8* in HaCaT-Zellen nach Vorbehandlung mit TRPA1 Agonist und/oder Antagonist und anschließender Behandlung ohne TNF- α für 6 h bzw. 48 h. Die Werte sind normalisiert auf die Referenzgene und bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle K (0,2 % DMSO; 1 % ddH₂O) angegeben. Die Daten wurden mittels Nalimov-Tests von Ausreißern bereinigt. Zim: Zimtaldehyd; AP: AP-18.

Tabelle 34: Rohdaten RT-qPCR bei TNF- α Behandlung unter Vorbehandlung mit TRPA1 Agonist/Antagonist

6 h	<i>CXCL8</i>				<i>TRPA1</i>				
	K_{TNF}	Zim	AP	Zim + AP	K_{TNF}	Zim	AP	Zim + AP	
x-fache Änderung zur Kontrolle (K_{TNF})	1,01	0,91	1,06	2,88	1,11	0,92	0,66	1,81	Pt. 1
	1,01	0,95	1,08	2,51	0,57		0,68		
	0,98	0,96	1,08		1,32	0,69		3,15	
		0,74	0,94	0,72		0,62	1,16	2,00	Pt. 2
	1,02	0,75	0,99	0,80	1,00	1,40	0,74	2,45	
	1,02	0,77	0,97	0,85	1,00	1,89		2,60	
	1,03	1,87	0,84	1,52	1,00			1,40	Pt. 3
	0,99	1,85	0,84	1,49	1,20	1,11	3,18	2,17	
	0,98	1,81	0,86	1,46	0,80	1,34			
	1,02	0,42	1,09	0,77	1,42	0,47	0,58	0,29	Pt. 4
	0,99	0,42	1,09	0,70	0,52	0,14	0,73	0,19	
	0,99	0,43	1,15	0,71	1,06				
MW	1,00	0,99	1,00	1,31	1,00	0,95	1,11	1,78	
SD	0,02	0,55	0,11	0,77	0,28	0,54	0,93	1,00	
48 h	<i>CXCL8</i>				<i>TRPA1</i>				
	K_{TNF}	Zim	AP	Zim + AP	K_{TNF}	Zim	AP	Zim + AP	
x-fache Änderung zur Kontrolle (K_{TNF})	1,01	2,27	1,03	0,48	0,88	0,60	0,21	0,23	Pt. 1
	0,99	2,08	1,09	0,49	1,31	0,80	0,29	0,41	
	1,00		1,44	0,63		0,78	0,30	0,26	
	1,02	0,59	0,53	0,21	1,22	0,53	0,66	1,51	Pt. 2
	1,01	0,64	0,56	0,25		0,52	0,38		
	0,97	0,61	0,56	0,23	0,96			1,27	
	0,97	1,12	1,33	0,97	1,60	0,29		0,61	Pt. 3
		1,12	1,45	1,02	0,88		1,07		
	0,99	1,14	1,39		0,81	1,44	0,91	1,18	
	0,97	0,54	0,61	0,63		1,23	0,98	0,97	Pt. 4
	1,03	0,54	0,64	0,63	0,23	1,37	0,95	1,46	
	1,00	0,54	0,63	0,65	0,82			1,47	
	1,02	0,61	0,59	0,60	0,98	0,46	1,38	0,76	Pt. 5
	0,99	0,49	0,58	0,56	1,28	0,69	0,80	0,71	
	0,98	0,52	0,61	0,50	1,02	0,58	0,69	0,92	
MW	1,00	0,92	0,87	0,56	1,00	0,77	0,72	0,90	
SD	0,02	0,59	0,37	0,24	0,34	0,37	0,36	0,45	

Rohdaten der x-fachen Änderung der relativen Genexpression von *TRPA1* bzw. *CXCL8* in HaCaT-Zellen nach Vorbehandlung mit TRPA1 Agonist und/oder Antagonist und anschließender Behandlung mit 20 ng/mL TNF- α für 6 h bzw. 48 h. Die Werte sind normalisiert auf die Referenzgene und bezogen auf die Kontrolle K_{TNF} (0,2 % DMSO; 20 ng/mL TNF- α) angegeben. Die Daten wurden mittels Nalimov-Tests von Ausreißern bereinigt. Zim: Zimtaldehyd; AP: AP-18.

Tabelle 35: Rohdaten des ELISA-Tests unter Vorbehandlung mit TRPA1 Agonist/Antagonist

ohne TNF- α		IL-8								
		6 h				48 h				
		K	Zim	AP	Zim + AP	K	Zim	AP		Zim + AP
x-fache Änderung zur Kontrolle (K)	0,94	1,14	0,86	0,90	0,99	1,04	0,69		Pt. 1	
	1,06	1,03	0,86	1,10	1,01	0,98	0,60			
	1,07	2,49	2,14	2,39	0,98	1,21	0,81	1,05	Pt. 2	
	0,93	4,19	1,20	2,49	1,02	1,28	0,82	1,23		
	1,11		1,33	1,81	1,00	1,00	1,44	1,15	Pt. 3	
	0,89		1,14	0,63	1,00	0,98	1,36	1,11		
		2,12	1,17	0,63	1,07	0,78	1,21	1,43	Pt. 4	
	1,00	0,93	1,48	1,62	0,93		1,09	1,56		
	1,16	2,63		2,90	0,98	1,11	1,13	0,85	Pt. 5	
	0,84	4,37	2,77	1,19	1,02	1,39	1,06	1,53		
MW	1,00	2,36	1,44	1,57	1,00	1,09	1,02	1,24		
SD	0,11	1,35	0,63	0,81	0,04	0,18	0,28	0,25		
mit TNF- α		6 h				48 h				
		K _{TNF}	Zim	AP	Zim + AP	K _{TNF}	Zim	AP	Zim + AP	
x-fache Änderung zur Kontrolle (K _{TNF})	0,91	1,04	1,03	1,30	0,94	0,74	0,99	0,78	Pt. 1	
	1,09	1,19	1,02	1,24	1,06	0,72	0,99	0,92		
	1,00	1,15	0,91	1,17	1,03	0,69	0,89	0,35	Pt. 2	
	1,00			1,36	0,97	0,83	0,95	0,37		
	1,08	1,38	1,07	1,35	1,05	0,91	0,92	0,71	Pt. 3	
	0,92	0,84	0,91	0,80	0,95	0,95	0,93	0,81		
	0,96	0,88	0,68	0,36	1,02	0,85	0,64	0,52	Pt. 4	
	1,04	0,85	0,77	0,58	0,98	0,87	0,63	0,55		
MW	1,00	1,05	0,91	1,02	1,00	0,82	0,87	0,63		
SD	0,07	0,20	0,14	0,39	0,05	0,09	0,15	0,21		

Rohdaten der x-fachen Änderung der relativen freigesetzten Menge an IL-8 in HaCaT-Zellen nach Vorbehandlung mit TRPA1 Agonist und/oder Antagonist und anschließender Behandlung mit 20 ng/mL TNF- α für 6 h bzw. 48 h. Die Werte sind normalisiert auf die Referenzgene und als x-fache Änderung bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle K (0,2 % DMSO; 1 % ddH₂O) bzw. TNF- α Kontrolle K_{TNF} (0,2 % DMSO; 20 ng/mL TNF- α) angegeben. Die Daten wurden mittels Nalimov-Tests von Ausreißern bereinigt. *Zim*: Zimtaldehyd; *AP*: AP-18.