

Aus der Abteilung für Experimentelle Pneumologie.  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Prof. Dr. Quoc Thai Dinh

**Immunhistochemische Untersuchung über die Verteilung und Colokalisation von  
TRPV1, TRPA1 sowie FcεRI innerhalb der Mastzellpopulationen im Hausstaub-  
milben-Mausmodell für allergische Atemwegsentzündung.**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes  
2021**

vorgelegt von:  
Florian Buchholz  
geboren am 27.05.1995 in Lebach

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Verzeichnisse .....</b>	<b>5</b>
1.1	Abbildungsverzeichnis.....	5
1.2	Diagrammverzeichnis.....	6
1.3	Tabellenverzeichnis.....	7
1.4	Abkürzungsverzeichnis .....	7
<b>2</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>9</b>
2.1	Deutsche Zusammenfassung.....	9
2.2	Summary .....	10
<b>3</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>11</b>
3.1	Asthma bronchiale.....	11
3.1.1	Epidemiologie.....	11
3.1.2	Ätiologie und Pathophysiologie .....	11
3.1.3	Zelltypologie beim Asthma bronchiale.....	12
3.1.4	Beteiligte Zytokine .....	13
3.2	Die TRP - Kanäle – Übersicht .....	15
3.3	Transiente Rezeptor-Potential-Kationenkanal Subfamilie V .....	16
3.3.1	Funktionsweise.....	16
3.3.2	Capsaicin / Wahrnehmung von Schärfe.....	16
3.3.3	Temperaturempfinden .....	17
3.3.4	H <sup>+</sup> -Ionen.....	17
3.3.5	Modulatoren .....	17
3.3.6	Schmerzwahrnehmung .....	18
3.3.7	Bronchokonstriktion und Hustenreflex.....	18
3.3.8	Mukussekretion .....	19
3.3.9	Darmmukosa .....	19
3.3.10	Apoptose .....	19
3.4	TRPA1 – ein weiterer Kanal der TRP-Familie.....	20
3.4.1	Aktivierung und Funktion.....	20
3.4.2	Expression von TRPV1 und TRPA1 im Körper .....	23
3.4.3	Colokalisation und Interaktion von TRPA1 und TRPV1 .....	25
3.5	FcεRI - high-affinity IgE receptor .....	25
3.5.1	Aktivierung und Funktion.....	26



3.5.2	Lokalisation von FcεRI .....	26
3.5.3	Bedeutung von FcεRI bei Asthma .....	27
3.6	Ziel der Doktorarbeit .....	27
<b>4</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>29</b>
4.1	Mäuse .....	29
4.2	HDM-Mausmodell .....	29
4.3	Blutentnahme .....	30
4.4	BAL .....	30
4.5	Entnahme und Präparation der Lungen .....	30
4.6	Beschichtung der Objektträger .....	31
4.7	Herstellung der Schnitte .....	31
4.8	Histologische Färbungen .....	31
4.8.1	Diff-Quick .....	31
4.8.2	HE-Färbung .....	32
4.8.3	PAS – Färbung .....	32
4.8.4	Toluidinblau .....	32
4.9	IgE – ELISA Serum .....	33
4.10	Immunohistochemie mit 3 Antikörpern .....	33
4.11	Immunohistochemie bei 2 gleichen Hosts (Fab-staining) .....	34
4.12	Auswertung der Immunhistochemie .....	36
4.13	Statistik .....	37
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>38</b>
5.1	Bronchoalveoläre Lavage (BAL) .....	38
5.2	Gesamt – IgE – Spiegel im Serum .....	44
5.3	HE – Färbung Gefrierschnitte .....	45
5.4	PAS – Färbung Gefrierschnitte .....	47
5.5	Toluidinblau .....	49
5.6	Immunhistochemie .....	51
5.6.1	Tryptase + TRPV1 – Nachweis Knockout .....	51
5.6.2	Gesamtmastzellzahl im Lungengewebe .....	53
5.6.3	Expression des TRPV1-Rezeptors in den verschiedenen Mastzellpopulationen .....	55
5.6.4	Expression des TRPA1-Rezeptors in den verschiedenen Mastzellpopulationen .....	59
5.6.5	Colokalisation von TRPA1 und TRPV1 auf Mastzellen .....	66

5.6.6	Expression des hochaffinen Mastzellrezeptors in den verschiedenen Mastzellpopulationen.....	71
5.6.7	Colokalisation von TRPV1 und FcεRI auf Mastzellen .....	76
5.6.8	Colokalisation von TRPA1 und FcεRI auf Mastzellen .....	81
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>89</b>
6.1	Kritische Betrachtung des Studiendesigns.....	89
6.2	Interpretation der Ergebnisse und Vergleich mit ähnlichen Studien.....	91
6.2.1	Bronchoalveoläre Lavage (BAL) .....	91
6.2.2	Gesamt-IgE-Level im Serum .....	92
6.2.3	Lichtmikroskopie.....	93
6.2.4	Gesamtmastzellzahl / mm <sup>2</sup> .....	93
6.2.5	Expression von TRPV1 bei Asthma und Vergleich zwischen M <sub>T</sub> / M <sub>TC</sub> .....	95
6.2.6	Expression von TRPA1 bei Asthma und Vergleich zwischen M <sub>T</sub> / M <sub>TC</sub> sowie TRPV1 <sup>-/-</sup> und Wildtypmäusen .....	96
6.2.7	Colokalisation von TRPV1 mit TRPA1 .....	98
6.2.8	Expression von FcεRI bei Asthma und Vergleich zwischen M <sub>T</sub> / M <sub>TC</sub> sowie TRPV1 <sup>-/-</sup> und Wildtypmäusen .....	98
6.2.9	Colokalisation von TRPV1 mit FcεRI.....	99
6.2.10	Colokalisation von TRPA1 mit FcεRI.....	100
6.3	Schlussfolgerungen .....	100
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>101</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>121</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>122</b>

# 1 Verzeichnisse

## 1.1 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1 Modell eines TRP-Kanals</b> .....	15
Abbildung 2 HDM Modell .....	29
Abbildung 3 BAL C57BL6/J / Saline .....	38
Abbildung 4 BAL C57BL6/J / HDM .....	38
Abbildung 5 BAL C57BL6/J TRPV1 <sup>-/-</sup> /Saline .....	39
Abbildung 6 BAL C57BL6/J TRPV1 <sup>-/-</sup> /HDM .....	39
Abbildung 7 HE-Färbung C57BL6/J / Saline + C57BL6/J / HDM .....	45
Abbildung 8 HE-Färbung C57BL6/J TRPV1 <sup>-/-</sup> / Saline + C57BL6/J TRPV1 <sup>-/-</sup> / HDM .....	46
Abbildung 9 PAS-Färbung C57BL6/J / Saline + C57BL6/J / HDM .....	47
Abbildung 10 PAS-Färbung C57BL6/J TRPV1 <sup>-/-</sup> / Saline + C57BL6/J TRPV1 <sup>-/-</sup> / HDM .....	48
Abbildung 11 Toluidinblau-Färbung C57BL6/J / Saline + C57BL6/J / HDM .....	49
Abbildung 12 Toluidinblau-Färbung C57BL6/J TRPV1 <sup>-/-</sup> / Saline .....	50
Abbildung 13 Isotypen- + Positivkontrolle Tryptase + TRPV1 + DAPI .....	51
Abbildung 14 C57BL6/J / Saline Tryptase + TRPV1 + DAPI .....	52
Abbildung 15 C57BL6/J TRPV1 <sup>-/-</sup> / HDM Tryptase + TRPV1 + DAPI .....	52
Abbildung 16 C57BL6/J / HDM Tryptase + DAPI .....	53
Abbildung 17 C57BL6/J / HDM Tryptase + Chymase + TRPV1 + DAPI .....	55
Abbildung 18 Isotypenkontrolle: C57BL6/J / Saline Tryptase + Chymase + TRPA1 + DAPI .....	59
Abbildung 19 C57BL6/J / Saline Tryptase + Chymase + TRPA1 .....	60
Abbildung 20 C57BL6/J / HDM Tryptase + Chymase + TRPA1 .....	60
Abbildung 21 C57BL6/J TRPV1 <sup>-/-</sup> / Saline Tryptase + Chymase + TRPA1 .....	61
Abbildung 22 Isotypenkontrolle : C57BL6/J / Saline Tryptase+TRPV1+TRPA1 .....	66
Abbildung 23 C57BL6/J / Saline Tryptase+TRPV1+TRPA1 .....	67
Abbildung 24 C57BL6/J / HDM Tryptase+TRPV1+TRPA1 .....	67
Abbildung 25 Isotypenkontrolle : C57BL6/J TRPV1 <sup>-/-</sup> / HDM Tryptase + Chymase + FcεRI .....	71
Abbildung 26 C57BL6/J / HDM Tryptase + Chymase + FcεRI .....	72

Abbildung 27 C57BL6/J TRPV1 <sup>-/-</sup> / HDM Tryptase + Chymase + FcεRI.....	72
Abbildung 28 Isotypenkontrolle : C57BL6/J / Saline Tryptase + TRPV1 + FcεRI .....	76
Abbildung 29 C57BL6/J / Saline Tryptase+TRPV1+ FcεRI .....	77
Abbildung 30 C57BL6/J / HDM Tryptase+TRPV1+ FcεRI .....	77
Abbildung 31 Isotypenkontrolle : C57BL6/J / Saline Tryptase + FcεRI + TRPA1 .....	81
Abbildung 32 C57BL6/J / Saline Tryptase + FcεRI + TRPA1 .....	82
Abbildung 33 C57BL6/J / HDM Tryptase + FcεRI + TRPA1 .....	82
Abbildung 34 C57BL6/J TRPV1 <sup>-/-</sup> / Saline Tryptase + FcεRI + TRPA1 .....	83
Abbildung 35 C57BL6/J TRPV1 <sup>-/-</sup> / HDM Tryptase + FcεRI + TRPA1 .....	83

## 1.2 Diagrammverzeichnis

Diagramm 1 Übersicht BAL .....	40
Diagramm 2 Gesamtzellzahl BAL.....	41
Diagramm 4 Makrophagen BAL .....	42
Diagramm 3 Eosinophilie BAL.....	42
Diagramm 5 Lymphozyten BAL.....	43
Diagramm 6 Neutrophile BAL.....	43
Diagramm 7 IgE Spiegel Serum .....	44
Diagramm 8 Gesamtzahl Mastzellen.....	54
Diagramm 9 Übersicht Tryptase + Chymase + TRPV1 + DAPI .....	56
Diagramm 10 Prozentsatz TRPV1-positiver Mastzellen.....	57
Diagramm 11 TRPV1-Expression in den Subpopulationen.....	58
Diagramm 12 Übersicht Tryptase + Chymase + TRPA1 .....	62
Diagramm 13 Prozentsatz TRPA1-positiver Mastzellen.....	63
Diagramm 14 Vergleich der Mastzellsubpopulationen bezüglich TRPA1 .....	64
Diagramm 15 TRPA1- und Chymase-negative Mastzellen .....	65
Diagramm 16 Übersicht Tryptase + TRPV1 + TRPA1 + DAPI.....	68
Diagramm 17 Prozentsatz TRPV1 und TRPA1 - positiver - Mastzellen.....	69
Diagramm 18 Prozentsatz einfach positiver Mastzellen (nur TRPA1 oder TRPV1).....	69
Diagramm 19 Prozentsatz TRPV1 , bzw. TRPA1 – positiver Mastzellen .....	70
Diagramm 20 Übersicht Tryptase + Chymase + FcεRI .....	73
Diagramm 21 Prozentsatz FcεRI-positiver Mastzellen .....	74

Diagramm 22 Vergleich der Mastzellsubpopulationen bezüglich FcεRI.....	75
Diagramm 23 Übersicht Tryptase + TRPV1 + FcεRI + DAPI .....	78
Diagramm 24 Prozentsatz doppelt und einfach positiver Mastzellen für TRPV1/ FcεRI.....	79
Diagramm 25 Prozentsatz TRPV1 / FcεRI - positiver Mastzellen.....	80
Diagramm 26 Übersicht Tryptase + TRPA1 + FcεRI + DAPI .....	84
Diagramm 27 Prozentsatz doppelt (für TRPA1 und FcεRI) positiver Mastzellen .....	85
Diagramm 28 Prozentsatz einfach positiver Mastzellen(entweder TRPA1 oder FcεRI).....	86
Diagramm 29 Prozentsatz doppelt (für TRPA1 und FcεRI) negativer Mastzellen.....	86
Diagramm 30 Prozentsatz TRPA1-positiver Mastzellen.....	87
Diagramm 31 Prozentsatz FcεRI -positiver Mastzellen .....	88

### 1.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Expression von TRPV1 und TRPA1 im Körper .....	23
Tabelle 2 Antikörperliste .....	35
Tabelle 3 : Filter für die Auflichtfluoreszenz.....	36

### 1.4 Abkürzungsverzeichnis

12-HETE	12-Hydroxyeicosatetraenoic acid
AHR	Airway hyperresponsiveness
APES	3-Aminopropyltriethoxysilan
CD23	Fc epsilon RII (niedrigaffiner IgE-Rezeptor)
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
DALY	Disability-adjusted life year
ECF-A	Eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Antikoagulanzen)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular signal-regulated kinase

FcεRI	high-affinity IgE receptor
FEV1	Forced Expiratory Volume in 1 Second
GERD	Gastroösophagealer Reflux
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
HDM	House Dust Mite
ICS	inhalative Corticosteroide
IFN-gamma	Interferon-gamma
IgE/IgG	Immunglobulin E/Immunglobulin G
IL-3/4/5 u.a.	Interleukin 3/4/5 u.a.
LABA	Long acting beta2-Agonst
NKA	Neurokinin A
OVA	Ovalbumin
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PBS	Phosphate buffered saline
ROS	Reactive oxygene species
SABA	Short acting beta2-Agonst
SCF	Stem cell factor
SP	Substanz P
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor alpha
TRP	Transient receptor potential
TRPA1	Transient Receptor Potential Cation Channel, Subfamily A, Member 1
TRPV1	transient receptor potential cation channel subfamily V member 1
VK	Vitalkapazität
WT	Wildtyp

## 2 Zusammenfassung

### 2.1 Deutsche Zusammenfassung

Gegenstand der hier vorgestellten Arbeit ist die Rolle dreier Rezeptoren (TRPV1, TRPA1, FcεRI) in der Pathogenese allergischen Asthmas. Die Behandlung aller Mäuse erfolgt nach dem gleichen Protokoll eines HDM-Mausmodells mit der Zielsetzung, ein möglichst mit den Mechanismen der Natur vergleichbares allergisches Asthma auszulösen. Dabei nutzt die vorliegende Arbeit sowohl Lichtmikroskopie als auch ELISA, um die Unterschiede zwischen TRPV1<sup>-/-</sup>-Mäusen und Kontrollgruppe zu quantifizieren, insbesondere wird jedoch mit immunhistochemischen Färbungen gearbeitet.

Bei der Analyse der BAL zeigt sich eine deutliche Zunahme der Zahl eosinophiler Granulozyten HDM-behandelter Tiere und bei der Untersuchung der Spiegel an Immunglobulin E im Blut mittels ELISA findet sich eine signifikant gesteigerte Eosinophilie derselben. Dabei findet sich kein Unterschied zwischen TRPV1<sup>-/-</sup> und Kontrollgruppen-Mastzellen.

Eine Rolle kann jedoch angenommen werden für den TRPA1-Rezeptor und den hochaffinen Mastzellrezeptor FcεRI. So können in bis zu 90% der Lungenmastzellen immunhistochemisch der Rezeptor FcεRI und in bis zu 80% der TRPA1-Rezeptor angefärbt werden, weiterhin kann demonstriert werden, dass TRPA1 auf Lungenmastzellen HDM-behandelter Mäuse vermindert und bei TRPV1<sup>-/-</sup>- C57BL6/J vermehrt nachweisbar ist.

Diese Arbeit trägt somit dazu bei, die Rolle dieser Kanäle in Mastzellen im Rahmen von allergischem Asthma weiter einzugrenzen. Dabei rückt sie weiter ab von dem bisher vielfach postulierten TRPV1-Rezeptor und weist eher auf eine Rolle des strukturell verwandten, aber funktionell distinkten TRPA1-Rezeptors hin. Sie legt damit die Grundlage für weitere Untersuchungen, um dessen genaue Funktion weiter zu klassifizieren.

**Schlagwörter:** Asthma; HDM-Mausmodell; TRPV1; TRPA1, FcεRI; Immunhistochemie; ELISA; BAL

## 2.2 Summary

The subject of this work is the role which the 3 receptors TRPV1, TRPA1 and FcεRI play in the pathogenesis of allergic asthma. Every mouse was treated following the same protocol, an HDM-mice-model, aiming to cause allergic asthma. In doing this, the present work uses as well light microscopy as also ELISA to quantify the differences between TRPV1<sup>-/-</sup>-mice and the control group, although mainly it used immunohistochemical colorations.

In analysing the BAL, a significant increase in the number of eosinophilic Granulocytes was demonstrated in animals which were treated with HDM and regarding the levels of immunoglobulin E in the blood of the animals using ELISA a significant increase in HDM-treated mice can be noted. There is no difference visible between TRPV1<sup>-/-</sup>-mast cells and the controls.

An important role can be assumed for the the high-affinity IgE receptor FcεRI and the TRPA1-receptor, though. FcεRI can be stained immunohistochemically in up to 90% of mast cells in the lung and TRPA1 in up to 80%. Furthermore it can be demonstrated, that in the asthma-control-group TRPA1 is expressed to a lesser extent, but in TRPV1<sup>-/-</sup> - C57BL6/J significantly more.

Hence, this work helps in narrowing down the role of these channels in allergic asthma. In doing so it moves away from the TRPV1-channel and suggests a major role of the structurally related, but functionally different TRPA1-channel. Thereby, it lays the foundation for further studies to classify this role more precisely.

**Keywords:** asthma; HDM-mice-model; TRPV1; TRPA1, FcεRI; immunohistochemistry; ELISA; BAL



## 3 Einleitung

### 3.1 Asthma bronchiale

Asthma ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Atemwege, die gekennzeichnet ist durch die Kardinalsymptome:

- anfallsartige Atemnot mit expiratorischer Atemflussobstruktion durch bronchiale Hyperreagibilität
- Husten
- Brustenge
- Fehlen von Symptomen im beschwerdefreien Intervall

Klinisch wird die Krankheit in 3 Schweregrade (mild, moderat und schwer) unterteilt. [70]

#### 3.1.1 Epidemiologie

Man geht davon aus, dass weltweit etwa  $300 \times 10^6$  Personen und in manchen Regionen der Erde mehr als 25% aller Bewohner betroffen sind, dabei gilt Asthma bronchiale als verantwortlich für ca. 0,4 % aller Todesfälle und 1% aller disability-adjusted life years (DALYs). [70,71,162]

#### 3.1.2 Ätiologie und Pathophysiologie

Man unterscheidet im Wesentlichen 2 Arten von Asthma: das extrinsische oder allergische Asthma, das insbesondere im Kindesalter auftritt (30%), sowie das intrinsische, bzw. endogene Asthma, welches vorwiegend im fortgeschrittenen Lebensalter auftritt (30%), wobei Mischformen (40%) die Regel sind. Asthma, das erst beim Erwachsenen auftritt, wird als „late-onset-Asthma“ bezeichnet. [110,137]

##### 3.1.2.1 Extrinsisches Asthma

Die Ätiologie ist multifaktoriell. Die hohe Prävalenz bei Kindern asthmatischer Eltern (60-80%, falls beide Elternteile betroffen sind) lässt auf eine genetische Komponente schließen, wobei die Gene ORMDL3 und CC16 als dafür bedeutsam identifiziert wurden. Zum Ausbruch des Asthmas kommt es aber erst nach Antigenexposition, gefolgt von einer durch Immunglobulin E (IgE) vermittelten (=Typ1) Entzündung der Atemwege, die in weiteren Schritten zu unspezifischer bronchialer Hyperreagibilität, Schleimhautödem, Bronchospasmus, Epithelschäden, bronchialem Remodeling und überschießender Mukusproduktion mit in der Folge gestörter bronchialer Selbstreinigung (=Clearance) führt. [35,110]

Besonders wichtig erscheinen für den Mechanismus Mastzellen (Freisetzung von Mediatoren wie Histamin, ECF-A [= Eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis], Leukotriene, Bradykinin), Eosinophile sowie T-Lymphozyten. Meist beginnt die Krankheit mit einem einzelnen, immunologisch wirksamen Antigen, weitet sich im Laufe der Zeit jedoch auf ein größeres Spektrum an Antigenen aus. [44,110]

### 3.1.2.2 Intrinsisches Asthma

Beim intrinsischen (auch nicht-allergischen Asthma) besteht kein Zusammenhang der Symptome mit Umweltantigenen. Diese Form tritt gehäuft auf nach Atemwegsinfektionen und ist typischerweise von schwererer Natur mit verstärkter, insbesondere eosinophiler Entzündung der Luftwege, aber geringer ausgeprägter Airway hyperresponsiveness (=AHR). [21,38,197]

In jüngerer Vergangenheit sind darüber hinaus weitere Asthma-Formen beschrieben worden, welche nicht klar einem der beiden oben genannten Typen zugeordnet werden können und möglicherweise eine eigene Kategorie darstellen. Dazu zählt beispielsweise durch Medikamentenunverträglichkeiten (v.a. Analgetika), gastroösophagealen Reflux (GERD) und chemisch-irritative Stoffe ausgelöstes Asthma. [158]

### 3.1.3 Zelltypologie beim Asthma bronchiale

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass kein signifikanter Unterschied zwischen Personen mit bzw. ohne Asthma die Zahl an Entzündungszellen (v.a. Lymphozyten) im Epithel und der Lamina propria betreffend besteht, dagegen können bei Asthmatikern aber vermehrt atypisch geformte Lymphozyten und Neutrophile gefunden werden. [36,127]

Weiterhin konnte eine Vermehrung der eosinophilen Granulozyten in der BAL, ein Shift innerhalb der Eosinophilenpopulation hin zu mehr aktivierten ( $EG^{2+}$ ) Eosinophilen sowie ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen aktivierten T-Lymphozyten ( $CD^{25+}$ ) und  $EG^{2+}$ -Eosinophilen nachgewiesen werden, was darauf hindeuten könnte, dass unter anderem T-Lymphozyten verantwortlich sind für die Rekrutierung der eosinophilen Granulozyten. [36]

Dabei wechseln die Eosinophilen zu einem „hypodensen“, autoaggressiven Phänotyp, welcher Superoxide und Leukotriene produziert und somit einen zytotoxischen Effekt auf benachbarte Zellen ausübt. Außerdem wurde auch eine positive Rückkopplung durch Produktion von IL-3, IL-5 und GM-CSF beschrieben. [75,124]

Inoue et al. zeigten 2016, dass eosinophilenreiches Asthma tendenziell länger dauert, zu schwereren Symptomen und einem verstärkten Remodeling führt. [57,93]

Mastzellen galten lange Zeit als die entscheidenden Vermittler der Immunantwort beim Asthma bronchiale. Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Bindung des konstanten Anteils von IgE - Antikörpern über die Mas-related-G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und FcεRI- Oberflächen-Rezeptoren und in der Folge einer Degranulation verschiedener Entzündungsmediatoren schrieb man ihnen eine zentrale Rolle zu. [89,175]

Eine Studie von Williams et al. aus dem Jahr 2000 zeigt allerdings, dass Mäuse, welche keine Mastzellen und keine IgE exprimieren, ebenfalls Asthma entwickeln können. Dabei wird aber auch zu bedenken gegeben, dass dies auf einen Effekt der Adjuvantien, die bei der Sensibilisierung der Mäuse benutzt werden, zurückzuführen sein könnte. [251] In anderen Studien wird nämlich das Gegenteil beschrieben, und zwar, dass Mäuse ohne Mastzellen keine AHR entwickeln, dies aber nach Injektion mit murinen Knochenmarksmastzellen doch tun. In der gleichen Studie wurde ebenfalls die funktionelle Rolle der Mastzellen bei Asthma untersucht und es konnte gezeigt werden, dass Mäuse unter Behandlung mit Mastzellstabilisatoren (Ketotifen) keine AHR entwickeln. [117]

### **3.1.4 Beteiligte Zytokine**

#### **3.1.4.1 TH2 – Zytokine**

Antigenpräsentation an TH2-Lymphozyten führt zu einer Freisetzung von IL-3, IL-4, IL-5 und GM-CSF. IL-4 induziert einen Isotypenswitch hin zu IgE, welche an den high-affinity-Rezeptor FcεRI binden und somit eine Mastzelldegranulation auslösen. IL-3, IL-5 und GM-CSF dagegen scheinen einen direkten Effekt auf die Proliferation, Differenzierung und Migration der eosinophilen Granulozyten zu haben. [75]

#### **3.1.4.2 Mastzellmediatoren**

Mastzellen sind eine heterogene Gruppe gewebständiger Zellen, die in 2 Populationen unterteilt werden: MC<sub>T</sub> (Tryptase-positiv, Chymase-negativ) und MC<sub>TC</sub> (Tryptase – und Chymase-positiv), wobei erstere bevorzugt in Schleimhäuten vorkommen und eine Rolle bei allergischen/parasitären Erkrankungen einnehmen, während letztere eher in Bindegewebe zu finden sind und bei Fibrosen wichtig zu sein scheinen. [53]

Mastzellen stammen ab von hämatopoetischen Progenitorzellen, welche insbesondere im Knochenmark, aber beispielsweise auch in weißem Fettgewebe zu finden sind, die Ausreifung erfolgt im Gewebe. [104] In allergischem Asthma scheint hierbei insbesondere der hochspezifische Mastzellrezeptor FcεRI eine Rolle zu spielen, welcher über ein

Crosslinking zu einer Aktivierung der Mastzellen und einer Migration ins Gewebe führt. [62,167]

Lokalisiert sind diese vor allem in direkter Nachbarschaft zu Epithel, Blutgefäßen und Nerven sowie in Luftwegen und im Gastrointestinaltrakt auch in der Nähe glatter Muskelzellen und Drüsen. [90]

Mastzellen enthalten Granula mit verschiedenen Mediatoren (Histamin, Heparin, Proteasen wie Chymase und Tryptase, Plättchenaktivierender Faktor [PAF], Tumornekrosefaktor alpha [TNF-  $\alpha$ ] und sind überdies Produzenten fettlöslicher Arachidonsäuremetaboliten (IL-1/4/5/6/13/33, Prostaglandine, Leukotriene). Diese Signale führen in der Summe zu gesteigerter IgE-Produktion, Leukozytenadhäsion, -aktivierung und -migration, Fibroblastenaktivierung, Bronchokonstriktion, Mukusproduktion, Vasodilatation sowie Nervenstimulation, zusammengefasst also zu entscheidenden Effekten in der Pathophysiologie allergischer Erkrankungen. [53,82,174] Eine besondere Rolle kommt den beiden Proteasen Chymase und Tryptase (benannt nach ihrer Ähnlichkeit zu Trypsin/Chymotrypsin) zu, welche zusammen ca. 25% der Gesamtproteinmenge in Mastzellen ausmachen.

Tryptase ist in allen Mastzellen zu finden und wird als möglicher Mastozytose-Indikator gesehen. Es wird im Komplex mit Heparin gespeichert und bisher konnte dieses Enzym in keiner anderen Körperzelle nachgewiesen werden. Das Protein liegt in Mastzellen in aktivierter Form vor, eine Selbstverdauung wird verhindert durch das protonenreiche Milieu innerhalb der Granula. Mastzellüberstand löst eine nicht unbeachtliche Verengung der Bronchien aus, welche durch Aprotinin, einem Tryptase-Antagonisten, deutlich abgeschwächt wird. Außerdem wirkt Tryptase vasoaktiv, proinflammatorisch, chemotaktisch und als Stimulanz der Gewebeheilung. [122,204] Es ist überdies bedeutend beim Airway-Remodeling. Es wurde gezeigt, dass es, vermittelt über eine Aktivierung der Matrix Metalloprotease-1, zu einer gesteigerten Produktion extrazellulärer Matrix führt und weiterhin Asthmasymptome verschlechtert. [178]

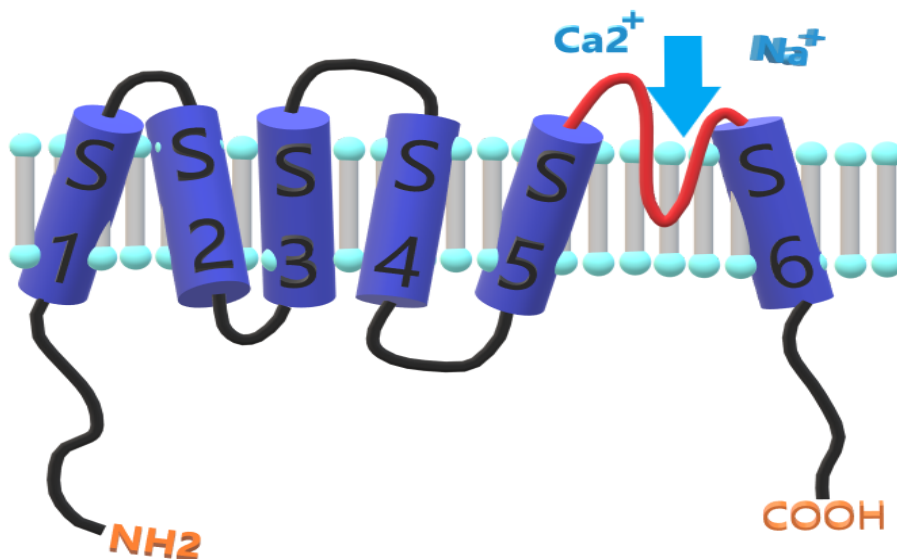
Chymase ist nicht in allen Mastzellen vorhanden und in den menschlichen Alveolen geht man nur von etwa 6% Chymase-positiver Mastzellen aus, wohingegen in kleineren Luftwegen fast 50 Prozent der Mastzellen positiv anfärbbar für Chymase sind. Hautmastzellen enthalten fast zu 100%, Mastzellen in der Submukosa des Dünndarms zu 77% (wohingegen in der Mukosa nur zu 19%) und Knochenmarksmastzellen zu 50% Chymase. Es wird zusammen mit Histamin während der Exozytose der Mastzellen aus deren Granula freigesetzt und potenziert den Effekt ebendieses Moleküls. Außerdem spielt es eine entscheidende Rolle in der glandulären Sekretion. In der BAL von Mukoviszidose-Patienten werden Werte von bis zu 87% Chymase-exprimierender Mastzellen gefunden

(normal: 0-7%), sodass insbesondere bei diesem Krankheitsbild eine wichtige Rolle anzunehmen ist. [17,122,134]

Sowohl Chymase als auch Tryptase besitzen Peptidase-Aktivität und sind in der Lage, das vasoaktive intestinale Peptid (VIP; beide, vor allem aber Tryptase), Substanz P (SP) (Chymase) und Angiotensin I (Chymase, 20x potenter als das Angiotensin-Converting-Enzym ACE) zu aktivieren. Chymase spielt weiterhin eine Rolle beim Prozessieren verschiedener Matrix-Proteine (z.B. Laminin, Fibronectin, Gap junctions, Insulin-like growth factor 1) sowie Enzymvorstufen (Matrix-Metalloproteasen, Transforming growth factor beta, Stem cell factor (SCF), Kallikrein u.a.). [54,69,89,243]

### 3.2 Die TRP - Kanäle – Übersicht

Zuerst beschrieben wurden Transient receptor potential cation - Kanäle (TRPC) 1969 bei einer Mutante der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. [105] Dabei stammt der Name des „transient receptor potential“ von dem beobachteten schnellen Abfall des Membranstroms bei anhaltender Lichtstimulation. [171,172] Bis heute wurden 8 Unterfamilien mit innerhalb jeder Familie jeweils ähnlichem Aufbau und Aktivierungsmechanismus dieser Kanäle identifiziert, darunter die Vanilloid-Rezeptoren (TRPV) und die Ankyrin-Unterfamilie. [109,153]



**Abbildung 1 Modell eines TRP-Kanals**

Zur Familie der TRP-Kanäle gehören mindestens 28 Proteine [65], denen gemeinsam ist, dass sie aufgebaut sind aus 6 Transmembrandomänen, flankiert von der variablen zytoplasmatischen Domäne, von denen jeweils 4 Homo- oder Hetero-Tetramere formen und Kationen (v.a.  $\text{Ca}^{2+}$ ) bereits nach leichter Konformationsänderung das Durchqueren

der Membran durch einen Ionenkanal zwischen Domäne 5 und 6 ermöglichen. [55,109,200]

TRP – Kanäle konnten bereits in Hefezellen nachgewiesen werden, was dafürspricht, dass sie schon sehr lange existieren. [109] Bekannt ist, dass sie in vielen unterschiedlichen Geweben des menschlichen Körpers exprimiert werden (Haut, ZNS, Gastrointestinaltrakt, Mukosa, Atmungssystem) und eine wichtige Rolle bei der Wahrnehmung von Umweltreizen spielen. [226] Auch wurde, der Entdeckung der Expression im endoplasmatischen Retikulum (ER) folgend, eine Rolle bei der Calciumhomöostase und Apoptose postuliert. [231] Mutationen in bestimmten TRP-Kanälen können zudem zur Entwicklung eines Nephrotischen Syndroms sowie endständigem Nierenversagen führen, bzw. weitere Nierenkrankheiten (z.B. im Rahmen eines Diabetes oder autoimmuner Prozesse) beeinflussen. [76,103]

### **3.3 Transiente Rezeptor-Potential-Kationenkanal Subfamilie V**

TRPV1 gilt als der bekannteste Rezeptor der TRP-Familie und wurde 1997 zum ersten Mal mithilfe humaner embryonaler Nierenzellen isoliert. [40] Der humane Rezeptor, welcher aufgebaut ist aus 839 Aminosäuren, ist insbesondere bekannt für seine Rolle in der Schmerzwahrnehmung und als Ansatzpunkt in der Entwicklung neuer Analgetika. [40] Aufgrund verschiedener Probleme, darunter einer gefährlichen Hyperthermie unter Blockade des Rezeptors, gelang es bisher nicht, ein systemisches Medikament zur klinischen Reife zu bringen. [91] Dagegen wird Capsaicin mit vielversprechenden Ergebnissen in verschiedenen Pflastern und Cremes bereits verwendet, z.B. zur Behandlung von Pruritus und verschiedenen Arten von Schmerz. [108]

#### **3.3.1 Funktionsweise**

Nach der Aktivierung von Nervenfaser-assoziierten-TRPV1 durch einen der zahlreichen Agonisten kommt es zu einer Signalkaskade, die letztendlich zu einer Freisetzung verschiedener Neuropeptide aus der Nervenfaser, z.B. SP, Neurokinin A (NKA) und Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) führt. SP vermittelt Vasodilatation, Plasmaexsudation und Mukussekretion, während NKA beispielsweise Bronchokonstriktion und eine Verstärkung cholinergischer Reflexe verursacht. [20]

#### **3.3.2 Capsaicin / Wahrnehmung von Schärfe**

Capsaicin ist ein potenter Agonist des TRPV1-Rezeptors und Bestandteil von scharfen Speisen und verschiedenen Paprikaarten. In Säugetieren konnte nachgewiesen werden, dass eine Capsaicin - Exposition terminaler Nervenendigungen zu Aktivierung

ebendieser und damit zu einem Gefühl brennenden Schmerzes führt. [41] Dies aber nur initial, sekundär konnte eine Desensibilisierung und somit, wie weiter unten weiter ausgeführt, eine mögliche Anwendung als Analgetikum nachgewiesen werden. [27,43,95]

### 3.3.3 Temperaturempfinden

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass eine Temperatur, die 43°C übersteigt und damit schmerzhaft für den Menschen ist, in der Lage ist, den TRPV1-Rezeptor zu aktivieren. [41,43,233] Bereits über 20°C konnte ein Anstieg der Calciumkonzentration im Zytoplasma verzeichnet werden, aber erst bei Überschreiten der 42°C – Schwelle war diese Antwort signifikant größer als die Antwort der Kontrollgruppe auf die gleiche Temperatur. [41] Dabei korrelieren Temperatur- und Capsaicin-abhängige Ströme auf statistisch signifikantem Niveau miteinander ( $r=0,82$ ). Weiterhin kann eine Cross-Desensibilisierung und eine Abnahme der Hitzeströme in Anwesenheit von TRPV1-Antagonisten (Ruthenium rot / Capsazepin) beobachtet werden. [232] In vivo kommen diese Temperaturen z.B. vor bei exzessiver sportlicher Betätigung. In einem pathologischen Setting kann es bei Verbrennung der Haut, bei Fieber und auch in von Asthma vorbelasteten Atemwegen zu solchen Temperaturen kommen. [186,226]

Überdies wurden mehrere Substanzen identifiziert, beispielsweise Ethanol und Prostaglandine (die bei Inflammation eine entscheidende Rolle spielen), welche die Temperaturschwelle für die Aktivierung des Rezeptors absenken (von 43° auf 34°C) und den Stromfluss verstärken können. [100,191,234,240]

Gleichzeitig existieren allerdings auch Studien, welche demonstrieren, dass die Rolle des Rezeptors nicht absolut zu sein scheint. 2014 wiesen Woodbury et al. eine normale Antwort TRPV1-negativer Mäuse auf Temperaturänderungen nach. [254]

### 3.3.4 H<sup>+</sup>-Ionen

Es wurde beobachtet, dass ein Abfall des pH in den Bereich 7,0-5,5, ein Bereich der durchaus auch physiologisch ist bei außergewöhnlicher Laktatbelastung oder im Falle von Krankheiten wie COPD und Asthma [119,198,226,246], eine Aktivierung des TRPV1-Rezeptors und einen Strom über die Zellmembran bewirken kann, welcher durch Capsazepin signifikant verringert wird. [31,232,233]

### 3.3.5 Modulatoren

Versuche mit H89, einem Antagonisten der Proteinkinase A, zeigten, dass dieser Antagonist die Prostaglandin-induzierte Antwort komplett unterdrückte. [100]

Ähnliche Effekte wurden für die Proteinkinase C beschrieben, die darüber hinaus auch selbst zu einer Öffnung des TRPV1-Kanals führt. Die Proteinkinase C ist beispielsweise von Bedeutung in der durch Bradykinin und Anandamide in Gang gesetzten Signalkaskade. [191,240]

### **3.3.6 Schmerzwahrnehmung**

*Definition Schmerz = „An unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage, or described in terms of such damage.“ [228]*

Die Expression von TRPV1 in Hinterhorn- und trigeminalen Ganglien sowie C- und A $\delta$ -Fasern zusammen mit seiner Aktivierung von toxischen Substanzen lässt eine Rolle in der polymodalen Integration verschiedener Stimuli und der Schmerzempfindung vermuten und zahlreiche Studien untermauern diese These. [1,42,43,96,151,180,232]

In mehreren Studien aus den Jahren 1987-1989 konnte ein analgetischer Effekt nach der topischen Administration von Capsaicin bei verschiedenen Krankheitsbildern gezeigt werden, darunter diabetische Polyneuropathie, Cluster-Kopfschmerz, Herpes Zoster, Psoriasis sowie Post-Mastektomie-Schmerz und lokaler Stumpf-Schmerz. [26,27,114,194,196,208,249]

Auch neuere Studien bestätigen dies, beispielsweise konnte eine Antagonisierung des TRPV1-Rezeptors E.Coli-infizierter Mäuse ein Auftreten des chronischen pelvinen Schmerzsyndroms verhindern, der gleiche Effekt konnte ebenfalls beobachtet werden bei TRPV1<sup>-/-</sup>-Mäusen. [195]

### **3.3.7 Bronchokonstriktion und Hustenreflex**

Bei Patienten mit chronischem Husten sind, im Vergleich zu einer asymptomatischen Kontrollgruppe, signifikant vermehrt ( $p < 0,01$ ) TRPV1-positive glatte Muskelzellen in den Bronchien vorzufinden. [106,169]

Weiterhin kann bei asthmatischen Patienten durch Gabe von Capsaicin eine Verminderung des FEV1 erreicht werden, wohingegen bei gesunden Probanden dieser Effekt nicht nachweisbar ist. [107] Auch eine Unterdrückung des Hustenreflexes durch TRPV1-Antagonisten kann beobachtet werden. [68]

Darüber hinaus konnte in einem Ovalbumin-Maus-Modell aus dem Jahr 2018 objektiviert werden, dass eine Ausschaltung des TRPV1-Rezeptors durch Capsazepin und TRPV1-siRNA zu einer verringerten Hyperreaktivität der Atemwege, verminderten Leveln an Entzündungsmediatoren und geringerem Remodeling führt. [51] Dieser Effekt der verringerten AHR bei ACh-Inhalation und verminderter Inflammation nach Behandlung mit



TRPV1-Antagonisten wurde in weiteren Studien im Zusammenhang mit feinen Luftpartikeln bestätigt. [155,256]

### 3.3.8 Mukussekretion

Applikation von Capsaicin als Aerosol in die Trachea von Ratten führt zu einer signifikanten Zunahme der Mukusmenge im MRT und in der BAL. Sowohl Capsazepin als auch Neurokinin 1 - und Neurokinin 2 - Antagonisten unterdrücken diesen Effekt. [133,226]

### 3.3.9 Darmmukosa

Die Darmmukosa wird innerviert von Hinterhornganglien sowie Ganglien des N. Vagus. Viele dieser Neurone sind TRPV1-positiv und man nimmt eine Rolle bei der Entstehung alkoholinduzierter Magen-Darm-Ulzera an. [92]

### 3.3.10 Apoptose

Es konnte nachgewiesen werden, dass Capsaicin auf einem statistisch signifikanten Niveau ( $p < 0,05$ ) zu Zelltod in kortikalen Neuronen von Ratten führt. Dieser Effekt konnte aufgehoben werden durch Capsazepin. Weitere Studien bestätigen diese proapoptotische Wirkung durch ER-Stress, vermittelt durch Calcium-Influx aus dem endoplasmatischen Retikulum durch Aktivierung des TRPV1-Pools der ER-Membran. [7,183,221]

Weitere Untersuchungen zeigten, dass L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Blocker das Ausmaß der Zytotoxizität verringern können. [207] Ebenfalls konnte die Zytotoxizität verringert werden durch Inhibitoren der ERK (Extracellular signal-regulated kinase) und Antioxidantien, so dass der apoptotische Effekt von TRPV1 vermutlich vermittelt wird durch L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, ERK und reaktive Sauerstoffspezies (ROS). [207]

Partikel-induzierte Apoptose durch kleinste Partikel in der Luft sind ein weltweites Gesundheitsproblem, hauptsächlich weil sie kardiovaskuläre sowie pulmonale Probleme verursachen. Eine Studie aus dem Jahr 2004 konnte zeigen, dass der Partikel-induzierte Zelltod durch Blockierung des TRPV1-Rezeptors mit Capsazepin verhindert werden kann und TRPV1 damit ein wichtiger Bestandteil in der Signalkette sein muss. Die gleiche Studie bestätigt das Ergebnis ebenfalls für TRPV1<sup>-/-</sup>. [2]

### 3.4 TRPA1 – ein weiterer Kanal der TRP-Familie

Isoliert wurde der TRPA1-Rezeptor zum ersten Mal im Jahr 1999 von humanen Lungenfibroblasten. Das Gen ist lokalisiert auf 8q13 und codiert für ein 1119 Aminosäuren langes Protein. [126] Seinen Namen erhält das Protein daher, dass es in seiner N-terminalen Domäne 13 -18 Ankyrin-Wiederholungen enthält, wobei jede Wiederholung aus 33 Aminosäuren besteht. Der generelle Aufbau entspricht dem aller TRP-Kanäle. [23,126,257]

Zum aktuellen Zeitpunkt wurden 5 Antagonisten des TRPA1-Rezeptors in klinischen Studien zugelassen, die meisten davon wurden in Phase 1 abgebrochen, eine davon erreichte jedoch auch Phase 2 (Glenmark GRC 17536 zu diabetischer Neuropathie) und erbrachte laut Hersteller statistisch signifikante und klinisch relevante Effekte. [46,48,93,97,184]

#### 3.4.1 Aktivierung und Funktion

##### 3.4.1.1 Funktionsweise

TRPA1 kann direkt aktiviert werden durch verschiedene Liganden, was zu einer Konformationsänderung und somit zu einem Membranstrom führt. Der Rezeptor kann aber auch aktiviert werden durch die Phospholipase-C-assoziierte Signalkaskade. Viele Neurotransmitter und Wachstumsfaktoren aktivieren die Phospholipase C (z.B. Bradykinin), sodass eine Verstärkung der Entzündungsreaktion über TRPA1 möglich erscheint. [22]

Diese wird am ehesten vermittelt über einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle und verstärkte Ausschüttung verschiedener Zytokine (NKA, SP, CGRP, ATP, Leukotriene, TNF- $\alpha$ , und IL-1 $\beta$ ), welche die Inflammation und verstärkte Kontraktion glatter Muskelfasern der Bronchien begünstigen. [128,256,257]

##### 3.4.1.2 Chemosensor

TRPA1 kann aktiviert werden von allyl-Isothiocyanat, besser bekannt als Senföl, sowie Zimtaldehyd, welches aus Zimtöl gewonnen wird. [230,257]

Weiterhin erfolgt eine Aktivierung durch Moleküle, welche insbesondere bei oxidativem Stress auftreten, wie zum Beispiel ROS, reaktive Stickstoffverbindungen, Akrolein (enthalten in Tränengas) und andere elektrophile Moleküle (z.B. 4-Hydroxynonenal und 4-Oxynonenal). [25,230,257] Auch viele in der Luft enthaltene Schadstoffe regen TRPA1 an, darunter Formaldehyd,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , UV-Licht und Schwermetalle. [257] Ebenfalls scheint eine wichtige Rolle des Rezeptors in Bezug auf die schädlichen Effekte von

Tabak möglich, da er aktiviert wird von einer Reihe Moleküle, welche enthalten sind in Tabakrauch (z.B. Krotonaldehyd, Akrolein, Acetaldehyd und Nikotin). [10,34,227]

Auch einige Medikamente wie NSAR, manche Anästhetika (Isofluran, Lidocain), nitrierte Fettsäuren und Entzündungsmediatoren wie Prostaglandine und Bradykinin (über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und die Phospholipase C) führen zu einem Stromfluss über die Membran. [19,23,230,257]

#### 3.4.1.3 Temperatur

Für den TRPA1-Rezeptor wurde eine direkte Aktivierung durch Kälte postuliert, die Studienlage hierzu ist aber noch uneinheitlich. Einige Paper konnten diesen Effekt nachweisen [19,74,132,144,146,209,220,242,253], wohingegen andere, ebenfalls sehr hochkarätig publizierte Studien, diesen widerlegen. [22,47,59,129,138,147,266,268] Insbesondere aktuellere Studien beschreiben ebenfalls eine Rolle in der Reaktion des Körpers auf Hitze, ähnlich TRPV1. [113,209,239,259]

#### 3.4.1.4 Mechanotransduktion und Schmerz

Gleiches gilt für die Mechanotransduktion in Haarzellen des Innenohrs, die zwar vorgeschlagen und durch den Nachweis von TRPA1-mRNA im Innenohr, dem Nachweis von TRPA1 in Stereozilien, sowie dem Nachweis eines verringerten Stroms bei TRPA1-knockdown – Haarzellen der Maus und des Zebrafisch untermauert wurde, aber in Knockout-Mäusen nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte. [60,146]

Darüber hinaus zeigten TRPA1<sup>-/-</sup> Mäuse eine verringerte Antwort auf schmerzhafte Nadelstiche. [146] Dieses Ergebnis konnte in einer weiteren Studie bestätigt werden, wobei hierbei keine Nadelstiche, sondern mechanischer Druck verwendet wurde. [188]

Weitere Studien zeigen ebenfalls eine mögliche Rolle in weiteren Formen des Schmerzes wie neuropathischem und dysfunktionalem Schmerz und krebsassoziierten Hyperalgesie. [12,15,125,214,244]

#### 3.4.1.5 Juckreiz

Eine Behandlung mit TRPA1-Antagonisten führt zu einer verringerten Hyperalgesie bei Mäusen im Rahmen der Behandlung von Juckreiz und auch eine direkte Rolle in der Signalkaskade Histamin-induzierten Juckreizes wurde beschrieben. [235,252,262]

Neuere Studien bestätigen ebenfalls diese Rolle des Rezeptors in der Pathogenese des Histamin-induzierten, aber auch Histamin-unabhängigen Juckreizes im Rahmen verschiedener Erkrankungen, darunter atopischer Erkrankungen wie der atopischen

Dermatitis und allergischen Kontaktdermatitis, aber auch verbrennungsinduzierten Juckreizes und parasitärer Erkrankungen wie Skabies. [161,202,252,258,261]

Für Psoriasis dagegen konnte ein protektiver Effekt des TRPA1-Rezeptors demonstriert werden und auch in der Pathogenese des Zimtaldehyd-induzierten Juckreizes konnte eine Rolle des TRPA1-Rezeptors nicht bestätigt werden. [73,267]

#### 3.4.1.6 Hypoxie

Hypoxie führt über eine Inhibition der Prolyl-Hydroxylase und damit einer Dehydroxylierung von Prolinmolekülen der N-terminale Ankyrin-repeats zu einer Öffnung des Kanals. [170,225] Über den gleichen Pathomechanismus vermutet eine japanische Forschergruppe (So et al.) ebenfalls eine Rolle in der Entwicklung von Dysästhesie bei Mäusen im Rahmen eines verminderten Blutflusses bei vaskulären Erkrankungen. [212,213]

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine schnelle Änderung von chronischer Hypoxie zu Normoxie in Mäusen zu einer Mastzellaktivierung über den TRPA1-Rezeptor und Degranulierung führen kann. [163]

#### 3.4.1.7 Bedeutung von TRPA1 bei Asthma

In einem spezifischen OVA-Mausmodell zu nicht-allergischem Asthma, das  $\text{ClO}^-$  (einen TRPA1-Agonisten) beinhaltete, konnte gezeigt werden, dass TRPA1<sup>-/-</sup>-Mäuse in diesem Modell keine bronchiale Hyperreagibilität entwickeln, wohingegen Wildtyp-Mäuse und TRPV1<sup>-/-</sup>-Mäuse eine signifikant stärkere Reaktion zeigen. ( $p < 0.01$ )

Die Autoren schließen daraus, dass die bronchiale Hyperreagibilität in ihrem Modell das Resultat einer Interaktion zwischen dem Nervensystem und dem Immunsystem über TRPA1 sein muss. Dabei scheint SP ebenfalls eine entscheidende Rolle zu spielen. [85,117]

Ähnlich dem TRPV1-Rezeptor und in gegenseitiger Beeinflussung führt auch die Aktivierung von TRPA1 zur spezieübergreifenden Auslösung des Hustenreflexes, beziehungsweise unterdrücken entsprechende Antagonisten diesen. [30,33,94,157]

Funktionell kommt es bei einer Inhibition von TRPV1 und TRPA1, möglicherweise aufgrund eines verminderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms und geringeren Zytokin-Ausschüttung, zu deutlich verminderter AHR und Inflammation, wobei der Effekt von TRPA1 im Vergleich zu TRPV1 deutlicher ausgeprägt ist und eine weitere Studie diesen Effekt im Rahmen eines OVA-Mausmodell bei TRPV1<sup>-/-</sup> Mäusen gar nicht nachweisen konnte, wohl aber bei TRPA1<sup>-/-</sup> Mäusen. [16,117,238,256]

Auch in einem Modell zur allergischen Rhinitis konnte gezeigt werden, dass ein TRPA1-Anatgonist (namentlich HC-030031) zu einer geringeren Entzündungsreaktion

(gemessen über Zelldifferenzierung und Quantifizierung von Typ-2-Zytokinen in nasaler und bronchialer Lavage sowie direkter histopathologischer Beurteilung), verringertem Juckreiz und weniger bronchialer Hyperreagibilität in den oberen Atemwegen mit Ovalbumin behandelte Mäuse zu führen scheint. [85]

In einer weiteren Studie wurde ebenfalls untersucht, ob TRPV1 und TRPA1 über nicht-neuronale Mechanismen zu einer Inflammation der Atemwege führen können und im Ergebnis wurde dies nur für TRPA1 bestätigt. Hierzu wurden Fibroblasten, Epithelzellen und glatte Muskelzellen der Lunge in Kultur getrennt mit TRPA1- und TRPV1-Antagonisten behandelt und ihre Reaktion auf Akrolein und Zigarettenrauch beobachtet. Nur bei TRPA1-Antagonisten kam es zu einer Reduktion der IL-8-Ausschüttung. [177] Dies stimmt überein mit den Ergebnissen anderer zu diesem Thema veröffentlichter Publikationen. [72,223,224]

### 3.4.2 Expression von TRPV1 und TRPA1 im Körper

Tabelle 1 Expression von TRPV1 und TRPA1 im Körper

	TRPV1	TRPA1
<b>Respirations-trakt</b>	<p>Im oberen Respirationstrakt, bevorzugt in und in der Nähe glatter Muskelzellen sowie in und unter dem Epithel [247]</p> <p>In den unteren Luftwegen, v.a. im Gefäßendothel, im glatten Muskel der Gefäße, in submukösen Drüsen, in zilientragenden Epithelzellen und in Rezeptoren des Respirationstrakts [248]</p>	<p>In Epithel und glatten Muskelzellen der Luftwege und der Lunge [177]</p> <p>In Afferenzen des N.vagus [176]</p>

	TRPV1	TRPA1
<b>Nerven-system</b>	<p>In Hinterhornganglien des Rückenmarks (35-50%) [168]</p> <p>In Trigeminalganglien (35-50%) und trigeminalen Nervenfasern [131,229]</p> <p>In den Schichten 3 + 5 der Hirnrinde [168]</p> <p>Im Limbischen System [168]</p> <p>In Thalamus + Hypothalamus [168]</p> <p>In Striatum, Mesencephalon, Formation reticularis und Substantia nigra [168]</p> <p>Im Zerebellum [168]</p> <p>In der unteren Olive [168]</p>	<p>In sensorischen, insbesondere schmerzbezogenen Neuronen von Trigemini-, Hinterhorn- sowie Vagusnervganglien [28,56,85,220,230]</p> <p>In Haarzellen des Innenohrs [60]</p> <p>In Astrozyten [206]</p> <p>Im sympathischen Nervensystem [211]</p>
<b>Gastrointestinal-trakt</b>	<p>In Hinterhornganglien sowie Ganglien des N. Vagus [92]</p>	<p>Insbesondere in enterochromaffine Zellen [181] und parasympathisches Efferenzen des Kolon/Blinddarm [148]</p> <p>In Hinterhorn- sowie Vagusnervganglien [28,56,220,230]</p>
<b>Mastzellen</b>	<p>In murinen + humanen Mastzellen, insbesondere im Zytoplasma [31,263]</p> <p>Bei Mastozytose sind annähernd 100% der Mastzellen positiv [216]</p>	<p>In Mastzellen der menschlichen Haut [182]</p>
<b>weitere</b>	<p>In Urothelium [29], Keratinozyten [120], Epithel des temporomandibulären Übergangs [121], Kardiomyozyten [11]</p>	<p>In Fibroblasten der Submukosa des Oropharyngealtrakts [6]</p> <p>In Keratinozyten, Prostata [99], Endothel und weiteren vaskulären Zellen [77,78], Odontoblasten und im Zahnfleisch [79,80], Harnblase [123,141]</p> <p>In Kardiomyozyten [11]</p>

### 3.4.3 Colokalisation und Interaktion von TRPA1 und TRPV1

Eine Studie aus dem Jahr 2016 demonstriert, dass sowohl TRPV1 als auch TRPA1 exprimiert und colokalisiert sind in Kardiomyozyten, sowie in 30-50% aller TRPV1-positiven Neuronen. Dagegen exprimieren Neuronen kaum jemals TRPA1 isoliert ohne TRPV1. [86,139,219,220,241]

Beide Rezeptoren scheinen sich gegenseitig zu beeinflussen. In verschiedenen Studien wurde postuliert, dass TRPA1 TRPV1 desensibilisieren kann und umgekehrt. [3,4,129] Allerdings wurde auch gezeigt, dass TRPA1-Aktivierung die Sensitivität von TRPV1-Kanälen erhöhen kann. [215,264] Als möglicher Signalweg wurde in verschiedenen Publikationen vorgeschlagen, dass, da TRPA1 aktiviert werden kann durch einen intrazellulären Anstieg der Calcium-Konzentration, dieser vermittelt sein könnte durch TRPV1. [22,129,215]

Es ist bekannt, dass TRP-Kanäle in der Lage sind, Homotetramere zu formen. [135] In der Folge wurden für verschiedene Kanäle auch Heteromere nachgewiesen, so 2014 von Fischer et al. auch für TRPV1 und TRPA1, wobei TRPA1 in diesem Heteromer eine inhibierende Wirkung auf TRPV1 auszuüben scheint. [49,87,112,140,218]

## 3.5 FcεRI - high-affinity IgE receptor

Der hochaffine IgE-Rezeptor (auch FcεRI/ Fc epsilon RI) gehört funktionell und strukturell zur Familie der B- und T-Zell-Rezeptoren und ist aufgebaut aus 4 transmembranären Domänen, begrenzt von den proteintypischen Amino- und Carboxygruppen. Dabei übernimmt die alpha-Untereinheit antigenbindende Funktionen, die beta-Untereinheit dient der Signalverstärkung und die 2 gamma-Untereinheiten vermitteln das Signal. Im Allgemeinen bildet der Rezeptor Homodimere, welche über Disulfidbrücken verbunden sind, wobei in Menschen auch eine alternative trimere Form existiert. [192] Er bindet hochaffin die konstante Fc-Region von Immunglobulin E (IgE), einem Antikörper der vor allem eine Rolle in der Parasitenabwehr sowie bei Erkrankungen des allergischen Formenkreises spielt. [143,237,255]

Im Unterschied dazu bindet der auf vielen Zellen lokalisierte FcεRII-Rezeptor, ein strukturell nicht verwandtes C-Typ-Lektin, auch bekannt unter CD23, mit niedriger Affinität an IgE. [45]

Auch lösliche, nicht-zellgebundene Formen beider Rezeptoren sind beschrieben. [189]

### 3.5.1 Aktivierung und Funktion

Die Aktivierung des Rezeptors erfolgt entweder direkt durch den konstanten Teil eines IgE-Antikörpers (im Verhältnis 1:1), dabei ist ein Crosslinking mehrerer Rezeptoren über multivalente Antigene oder über das IgE- und Fc $\epsilon$ RI-bindene Protein Galectin 3 vonnöten. [136,189,205,237] Dies führt über Phosphorylierung der alpha- und gamma-Einheit zu einer Signalkaskade, die unter anderem die Phospholipase C aktiviert und damit möglicherweise auch Einfluss auf TRPA1 nimmt.

Weiterhin kommt es zu einer intrazellulären Calciumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum, damit zu einer Aktivierung der Proteinkinase C und über den Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration ebenfalls zu einer möglichen direkten Wirkung auf TRPA1. Ebenfalls festgestellt werden kann eine Aktivierung verschiedener Kinasen (ERK, c-Jun-N-terminale Kinasen, mitogen-activated protein-Kinasen u.a.), eine Histaminfreisetzung aus der Zelle und eine gesteigerte Zytokinproduktion der Zelle. [13,22,129,215]

Das Endresultat all dieser Prozesse ist eine Mastzellaktivierung und die Exozytose oben bereits beschriebener Mastzellgranula. [192]

### 3.5.2 Lokalisation von Fc $\epsilon$ RI

Bis zu diesem Zeitpunkt wurde Fc $\epsilon$ RI in seiner tetrameren Form nachgewiesen auf Mastzellen und basophilen Granulozyten. [143,192,255] Die trimere Form wird insbesondere exprimiert von antigenpräsentierenden Zellen (Dendritische Zellen, Langerhanszellen der Haut, Monozyten) und eosinophilen Granulozyten. [159,164,192,255] Dabei scheinen nahezu alle Knochenmarks-Mastzellen positiv für Fc $\epsilon$ RI zu sein (untersucht durch Durchflusszytometrie), was für die enorme Wichtigkeit des Proteins spricht. [134]

Besonders dicht ist die Fc $\epsilon$ RI-Dichte in Gewebsmastzellen (bis zu 500 000 Kopien / Zelle), vermutlich als Folge einer Hochregulation durch IgE. [98,143,159]

Es wurde gezeigt, dass der Großteil der Fc $\epsilon$ RI-Rezeptoren intrazellulär lokalisiert sind. Bei Expression auf der Zelloberfläche ohne Bindung eines IgE-Antikörpers werden 50% der Rezeptoren innerhalb von 24h zurück in die Zelle verlagert. Kommt es dagegen zu einer Bindung, persistiert der Rezeptor auf der Zelle. [160]



### 3.5.3 Bedeutung von FcεRI bei Asthma

Die Sofortreaktion beim allergischen Asthma wird im Wesentlichen vermittelt durch IgE. Es gibt bereits Medikamente (z.B. der IgE-spezifische Antikörper Omalizumab), welche mit großem Erfolg über eine Verringerung der IgE-Spiegel zu einer Verbesserung des allergischen Asthmas führen. Dabei reduziert Omalizumab die FcεRI-Expression asthmakrankter Patienten auf basophilen Granulozyten um 95% und verringert signifikant die Spiegel von IL-4, IL-8 und IL-13 als Antwort auf FcεRI-Aktivierung. Bei Mastzellen kam es durch Omalizumab ebenfalls zu einer Reduktion der FcεRI-Expression von 89% nach einer Woche, Tendenz mit der Zeit steigend und einer um mehr als 90% verringerten Histaminausschüttung. [24,98,260]

Für die allergische, IgE-vermittelte Sofortreaktion beim Asthma scheint in erster Linie der FcεRI-Rezeptor verantwortlich zu sein, welcher über ein Crosslinking mit anderen FcεRI-Rezeptoren zu Mastzelldegranulation sowie der Neusynthese von Lipidmediatoren führt. [13,98]

## 3.6 Ziel der Doktorarbeit

Es ist bekannt, dass Mastzellen eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Asthma und im Besonderen der frühen Phase spielen. Ein entscheidender Rezeptor hierfür ist der hochaffine Mastzellrezeptor FcεRI.

Die beiden Rezeptoren TRPV1 und TRPA1 sind von großer Bedeutung als polymodale Integrationszentren für verschiedene chemische, thermische und physikalische Stimuli. Es wurde bereits gezeigt, dass TRPV1 und TRPA1 in Neuronen und zumindest TRPA1 vermutlich auch in nicht-neuronalen Zellen eine wichtige Funktion in der Pathogenese allergischen Asthmas spielen und dort auch als möglicher Therapieansatz gelten. Da weiterhin insbesondere zur Expression der Rezeptoren in Lungenmastzellen bisher keine Arbeiten publiziert wurden, soll in dieser Arbeit hierzu ein erster Grundstein gelegt werden.

Ebenfalls ist bekannt, dass sowohl FcεRI als auch TRPV1 und TRPA1 auf Mastzellen exprimiert werden und über verschiedene Signalwege eine Interaktion wahrscheinlich ist. Es ist daher gut denkbar, dass über die Vermittlung der Interaktion zwischen neuronalem System und Immunsystem hinaus die Rezeptoren ebenfalls als Werkzeug der Mastzellen dienen, um schädliche Einflüsse in der Umgebung wahrzunehmen und darauf zu reagieren.

Der erste Teil dieser Publikation beschäftigt sich damit, die bronchoalveoläre Lavage, die IgE-Level im Blut sowie das bronchiale Remodeling gesunder Kontrolltiere mit dem

an Asthma erkrankter Tiere sowie gesunden und erkrankten TRPV1<sup>-/-</sup>- C57BL6/J zu vergleichen.

Im zweiten Teil der Arbeit wird untersucht, ob und welcher Anteil der Mastzellen TRPV1, TRPA1 und FcεRI exprimiert, inwieweit diese miteinander colokalisiert sind, auf welcher der Mastzellpopulationen M<sub>TC</sub> und M<sub>T</sub> sie bevorzugt vorkommen und inwiefern das Ausschalten des TRPV1-Rezeptors in Knockout-Mäusen zu einer Veränderung des Verteilungsmusters der beiden verbleibenden Rezeptoren führt.

Das Ziel hierbei ist, näher zu untersuchen, auf welche Art und Weise Mastzellen mit ihrer Umgebung in einer pathologischen Umgebung, wie beim Asthma bronchiale gegeben, interagieren und welche Rolle dabei insbesondere ihre Populationen M<sub>T</sub> und M<sub>TC</sub> einnehmen sowie welchen Einfluss der TRPV1-Rezeptor in der Pathogenese und der Ausprägung des Schweregrades allergischen Asthmas nimmt.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Mäuse

Es handelte sich um insgesamt 32 Versuchstiere (C57BL6/J; TRPV1<sup>-/-</sup> aus kongener Inzucht), aufgeteilt auf 4 Gruppen à jeweils 8 Tieren. Bei der Hälfte dieser Tiere handelte es sich um TRPV1<sup>-/-</sup>-Mäuse (Gruppen C+D), bei der anderen um Wildtypmäuse (Gruppen A + B). Bei Versuchsbeginn waren diese 6-8 Wochen alt und klinisch gesund. Die Mäuse wurden im Tag-Nacht-Rhythmus (12 h Licht / Tag) bei 22°C gehalten. Futterpellets sowie Wasser waren zu jeder Tageszeit verfügbar. Vor Versuchsbeginn hatten alle Tiere 1 Woche Zeit, um sich an ihre Umgebung zu gewöhnen. Die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes wurden zu jedem Zeitpunkt eingehalten und überwacht durch die Tierschutzbeauftragte der Universität des Saarlandes.

### 4.2 HDM-Mausmodell

Abbildung 2 HDM Modell

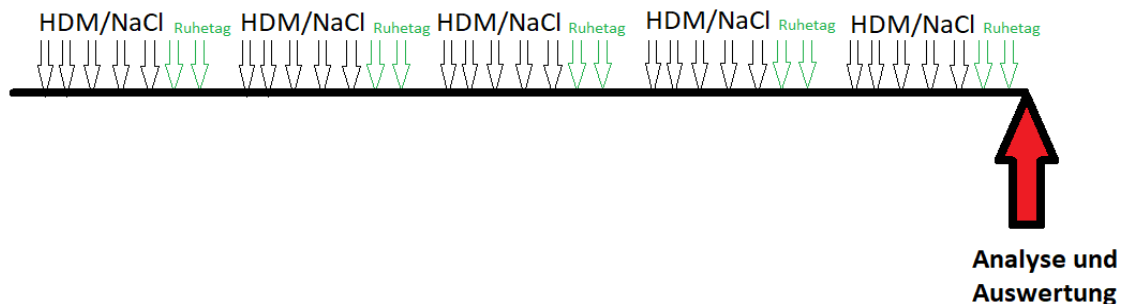


Abbildung 2 Behandlungsschema an 5 Tagen in der Woche mit Hausstaubmilben-Extrakt über einen Zeitraum von 5 Wochen.

Die Mäuse wurden jeweils an 5 Tagen der Woche behandelt, danach folgten 2 behandlungsfreie Tage. Gruppe A und C wurden als Kontrollgruppe intranasal mit physiologischer Kochsalzlösung behandelt, Gruppen B und D mit HDM-Hausstaubmilbenextrakt (pro Behandlungstag intranasal 50 µl in der Konzentration 0,5 mg/ml Kochsalzlösung). Um die Behandlung möglichst stressfrei für die Tiere zu gestalten, wurden sie für die Dauer der Applikation mit Isofluran (abbvie) anästhesiert. Das gleiche Anästhetikum wurde ebenfalls benutzt, um die Tiere vor Entnahme des gesamten zirkulierenden Blutvolumens aus der Vena cava inferior einzuschläfern.

Das gleiche Modell wurde bereits in unserer Arbeitsgruppe etabliert und mehrmals mit Erfolg verwendet. [149,203]

### 4.3 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte aus der Vena cava inferior mithilfe einer dünnen, mit EDTA vorbehandelten Spritze nach Betäubung der Tiere und Eröffnen des Bauchraums. Das gewonnene Blut wurde bis zur Zentrifugation auf Eis gelagert. Nach Zentrifugation bei 4° C bei 3xG für 20 Minuten wurde das Serum abpipettiert und bei -80°C gelagert. Das Zellpellet wurde verworfen.

### 4.4 BAL

Vor Entnahme der Lungen wurden diese zur Zellgewinnung gespült. Hierzu wurde eine dünne Kanüle in die Trachea eingeführt und mit 1 ml PBS-Lösung insgesamt 3 mal durchspült. Zu Beginn erfolgte die Zellzählung mithilfe einer Neubauer- Zählkammer.

Die gewonnene Suspension wurde bis zur Zentrifugation auf Eis gelagert. Nach Zentrifugation bei 4°C für 10 Minuten mit 1200 rpm wurde der Überstand abpipettiert und bei -80°C eingefroren. Das Zellpellet wurde mit 1 ml PBS (Gruppe B + D), bzw. 0,5 ml PBS (Gruppe A + C) resuspendiert. 250 µl dieser Suspension wurden weiterverdünnt mit 750 µl PBS. Anschließend wurden jeweils 200 µl pro Zellfleck auf die Objektträger gegeben und bei 1300 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Die Fixation erfolgte in einem Methanolbad für 10 Minuten. Nach Trocknung wurden die Objektträger bei -20°C gelagert. Die Färbung erfolgte mit Diff-Quick.

Zur Auswertung wurden Fotos in 20x Vergrößerung gemacht, ca. 200 Zellen pro Tier ausgezählt und die prozentualen Anteile der einzelnen Zellpopulationen errechnet, die absoluten Zahlen wurden rechnerisch aus diesen Ergebnissen und der Gesamtzellzahl pro ml der bronchoalveolären Lavage des jeweiligen Tieres ermittelt.

### 4.5 Entnahme und Präparation der Lungen

Nach Eröffnen des Brustkorbs wurde ein kleiner Teil der Lungen abgetrennt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Reste der Lungen wurden in Zamboni-Lösung (2%iges Formaldehyd + 0,1 M Phosphatpuffer pH=7,4 + Pikrinsäure 15%) eingelegt und im Kühlschrank bei 8°C gelagert. Nach 24h wurde die Zamboni-Lösung für mehrere Tage aus den Lungen mit PBS ausgewaschen, bis die Lungen nicht mehr gelb anfärbten, und für weitere 24h in 30%ige Sucrose-Lösung bei 8°C zur Kryoprotektion eingelegt. Am Folgetag wurden die Lungen in Tissue-Tek (Sakura) eingebettet, mithilfe flüssigen Stickstoffs eingefroren und bei -20°C aufbewahrt.

## 4.6 Beschichtung der Objektträger

Die für die Kryoschnitte verwendeten Objektträger wurden alle mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APES) beschichtet. Dies ist sinnvoll, da durch kovalente Bindungen zwischen der Glasoberfläche sowie den Silanmolekülen eine positive Ladung geschaffen wird, an der die Gewebe [d.h. die negativ geladenen Gruppen (Sialinsäuren, Carboxylgruppen, Sulphatestergruppen)] besser haften bleiben. [116]

Zu Beginn wurden die Objektträger für 5 Minuten in Aceton gegeben. Anschließend erfolgte die Beschichtung in 2% APES, ehe die Objektträger für weitere 5 Minuten in Aceton und anschließend 5 Minuten in destilliertes Wasser gegeben wurden. Die Trocknung der Objektträger erfolgte bei Raumtemperatur.

## 4.7 Herstellung der Schnitte

Die Schnitte wurden bei - 24°C in einem Kryostat (LEICA CM 1950) hergestellt. Die gefrorenen Lungen wurden hierzu mit Tissue-Tek (Sakura) auf den entsprechenden Platten fixiert. Überschüssiges Gewebe wurde mit der Klinge entfernt, bis ein glatter Schnitt möglich war (TRIM-Modus). Anschließend wurden 8µm-Schnitte (sect-Modus; mithilfe eines Restrainers und Vakuumsaugers) hergestellt, auf dem APES-beschichteten Objektträger fixiert und wieder bei -20° C eingelagert.

## 4.8 Histologische Färbungen

### 4.8.1 Diff-Quick

Zu Beginn wurden die Objektträger mit der BAL 15 Minuten bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Anschließend erfolgte für 45 Sekunden in Diff-Quick-Lösung 1 (eosinophil; Xanthen-Farbstoff + ph-Puffer + Natriumazid) die Färbung des Zytoplasmas und direkt im Anschluss für weitere 45 Sekunden in Diff-Quick-Lösung 2 (basophil; Thiazin-Farbstoff + ph-Puffer) die Färbung der Zellkerne. Das Auswaschen des überschüssigen Farbstoffes erfolgte anschließend im Wasserbad, bis keine blauen Schlieren mehr entstanden. Eingedeckt wurden die Objektträger mit Entellan (Merck) und gelagert anschließend bei Raumtemperatur.

### **4.8.2 HE-Färbung**

Vor Beginn der Färbung trockneten die Schnitte 20 min an der Luft bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden sie für 6 min in Hämatoxylin gegeben. Nach einem kurzen Zwischenschritt in destilliertem Wasser wurden die Objektträger für 5 min in lauwarmem Leitungswasser gebläut und anschließend ein weiteres Mal in destilliertem Wasser gewaschen (30 s). Danach erfolgte die Rotfärbung in Eosin G (0,5% wässrig) für 2 min. Um Wasser zu entziehen, wurden die nunmehr gefärbten Präparate in aufsteigender Reihenfolge erst in 70%, dann in 85% und schließlich in 99% Ethanol für je 1 min belassen. Der letzte Schritt bestand in einem Xylolbad für 3 min und letztendlich dem Eindecken mit Entellan (Merck).

### **4.8.3 PAS – Färbung**

Für die PAS-Färbung wurden die Schnitte 1,5 h bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Anschließend erfolgte eine Spülung mit PBS (pH 7,4) für 5 min. Dann wurden die Schnitte 5 min lang in Periodsäure 0,1% (Merck Milipore 8222880100) gegeben und für eine Minute in fließendem, lauwarmem Wasser gewaschen, ehe sie für 2 x 2 min in destilliertem Wasser gespült wurden. Daraufhin lagen die Schnitte für 20 min in Schiff Reagenz (ROTH) bei 4°C. Gespült wurde in Sulfitwasser für 3 x 2 min und anschließend in destilliertem Wasser, in das die Schnitte 3x eingetaucht wurden. Im Anschluss wurden die Schnitte für 8 min in Hämatoxylin gegeben und kurz in H<sub>2</sub>O dest abgespült. Das Bläuen erfolgte in Ammoniakwasser unter Mikroskopkontrolle (ca. 6 min). Um Wasser zu entziehen, wurden die nunmehr gefärbten Präparate in aufsteigender Reihenfolge erst in 70%, dann in 85% und schließlich in 99% Ethanol für je 1 min gegeben. Der letzte Schritt bestand in einem Xylolbad für 3 min und letztendlich dem Eindecken mit Entellan (Merck).

### **4.8.4 Toluidinblau**

Zu Beginn wurden die Schnitte 10 min bei Raumtemperatur trocknen gelassen und anschließend 15 min in PBS (pH=7,4) rehydriert. Gefärbt wurden sie für 2-3 min in Toluidinblau-Lösung der Firma Roth Carl GmbH & Co. KG. Die gefärbten Präparate wurden in der Folge in aufsteigender Reihenfolge 2 x 2 min in 70% Ethanol und 2 x 2 min in reinen Ethanol gegeben. Dies dient dazu, den Präparaten Wasser zu entziehen. Im letzten Schritt wurden die Objektträger für 2 min in einem Xylolbad belassen, unter dem Abzug getrocknet und mit Entellan (Merck) eingedeckt.

## 4.9 IgE – ELISA Serum

Bei dem verwendeten ELISA handelte es sich um einen Sandwich-ELISA der Marke invitrogen. Die Versuchsdauer erstreckte sich über 2 Tage. An Tag 1 erfolgte das Ansetzen des Coating buffers auf PBS-Basis mit dem Capture-Antibody (Anti-IgE; 1:250 Verdünnung). Anschließend wurden 100 µl/Well der Lösung verwendet und die Wells-Platte bei 4°C über Nacht inkubiert.

An Tag 2 erfolgte ein zweimaliges Auswaschen der Wells-Platte (1x PBS für 1 min) mithilfe einer Wasch-Saug-Station. Anschließend wurde die Wells-Platte ausgeklopft und pro Well 250 µl Blocking-Buffer hinzugegeben, welcher für 2 h dort belassen wurde. In der Wartezeit erfolgte das Verdünnen der Serumproben (kranke Tiere 1:440; gesunde Tiere 1:44) mit dem Assay-Buffer sowie das Ansetzen der Standards (insgesamt 8; von 250 ng/ml bis 0 ng/ml).

Nach einem erneuten 2-maligen Auswaschen der Wells-Platte wurden je 50 µl Assay-Buffer mit 50 µl der Standards/Proben zusammen pipettiert und für 2 h inkubiert. Anschließend erfolgten 4 weitere Waschdurchgänge und die Inkubation mit je 100 µl des Detection-antibody für 1 h (1:250 Verdünnung; anti-IgE Biotin-gekoppelt).

Um eine Farbreaktion zu erhalten, wurden nach Ablauf der Wartezeit sowie dem viermaligen Waschen der Wells-Platte 100 µl / Well Streptavidin (1:400 Verdünnung mit Assay-Buffer) hinzugegeben und für 30 min belassen. Es wurde 4 weitere Male gewaschen, ehe das Substrat (TMB) hinzugefügt wurde. Nach einer Reaktionszeit von genau 15 min wurde die Farbreaktion gestoppt mit 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Die Messung der Wells-Platte erfolgte bei Licht der Wellenlänge 450 nm.

## 4.10 Immunohistochemie mit 3 Antikörpern

Zu Beginn wurden die Kryoschnitte für 15 min bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend in PBS für 5 min rehydriert. Nach dem Einspannen in die Shandon-Cover-Plates erfolgte ein zweimaliges Waschen bei Durchflusssgeschwindigkeit. Um unspezifische Färbung durch den Sekundärantikörper zu reduzieren, wurden diese Bindungsstellen anschließend für mindestens 90 min mit 5% Esel-Serum (in PBS) geblockt. Der folgende Schritt bestand in der Behandlung mit den 3 Primärantikörpern (in Esel-Serum; 100 µl) und der einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur, ehe die Schnitte über Nacht bei 4°C gelagert wurden.

Am nächsten Tag erfolgten am Anfang 2 Waschschritte mit PBS, anschließend die Behandlung mit den Sekundärantikörpern (gelöst in Esel-Serum; 100 µl) für 90min bei

Raumtemperatur. Um Zellen besser identifizieren zu können, erfolgte im Anschluss die Färbung der Zellkerne mit DAPI für 15 min.

Als letztes wurde erneut gewaschen (3x mit PBS + 1x mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ ) und die Gewebe mit Fluoroshield eingedeckt. Die Schnitte wurden mindestens für 5 h, maximal aber für 5 Tage trocknen lassen, ehe sie erneut bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren wurden.

Zu jedem Zeitpunkt der Färbung und des Arbeitens mit den fertigen Schnitten wurde darauf geachtet, die Antikörper möglichst wenig Licht auszusetzen.

Die Isotypenkontrolle wurde bei jeder Färbung nach dem gleichen Prinzip behandelt, wobei aber statt des Primärantikörpers 5%-Esel-Serum appliziert wurde.

#### **4.11 Immunohistochemie bei 2 gleichen Hosts (Fab-staining)**

Zu Beginn wurden die Kryoschnitte für 15 min bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend in PBS für 5 min rehydriert. Nach dem Einspannen in die Shandon-Cover-Plates erfolgte ein zweimaliges Waschen bei Durchflussgeschwindigkeit. Um unspezifische Färbung durch den Sekundärantikörper zu reduzieren, wurden diese Bindungsstellen anschließend für mindestens 90 min mit 5% Esel-Serum (in PBS) geblockt. Der folgende Schritt bestand in der Behandlung mit dem Primärantikörper (in Esel-Serum; 100  $\mu\text{l}$ ) und der einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur, ehe die Schnitte über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert wurden.

Am nächsten Tag erfolgten initial 2 Waschschritte mit PBS (5 min + 10 min), anschließend die Behandlung mit dem Fab-Sekundärantikörper (gelöst in Esel-Serum; 100  $\mu\text{l}$ ) für 2 h bei Raumtemperatur. Die beiden Waschschritte wurden wiederholt und dann Primärantikörper 2 + 3 (in Esel-Serum; 100  $\mu\text{l}$ ) hinzugegeben, für eine Stunde bei Raumtemperatur belassen und wieder über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert.

An Tag 3 wurden die Schnitte erneut mit PBS gewaschen (5 min + 10 min) und die beiden Sekundärantikörper (ebenfalls in Esel-Serum; 150  $\mu\text{l}$ ) für 2 h inkubiert. Um Zellen besser identifizieren zu können erfolgte anschließend die Färbung der Zellkerne mit DAPI für 15 min.

Als letztes wurde erneut gewaschen (3 x 5 min mit PBS + 1 x 5 min mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ ) und die Gewebe mit Fluoroshield eingedeckt. Die Schnitte wurden mindestens für 5 h, maximal aber für 5 Tage trocknen lassen, ehe sie erneut bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren wurden.

Zu jedem Zeitpunkt der Färbung und des Arbeitens mit den fertigen Schnitten wurde darauf geachtet, die Antikörper möglichst wenig Licht auszusetzen.



Die Isotypenkontrolle wurde bei jeder Färbung nach dem gleichen Prinzip behandelt, wobei aber statt des Primärantikörpers 5%-Esel-Serum appliziert wurde.

Tabelle 2 Antikörperliste

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
Anti-Mast-Cell-Tryptase-Antibody, mouse, abcam	1:100	Donkey Anti-Mouse, IgG, Cy3, Jackson-Immuno-Research	1:400
Anti-Chymase-Antikörper, Rabbit, AF647, Biorbyt	1:50	Donkey anti-rabbit, Alexa-Fluor 647, Jackson-Immuno-Research	1:100
	1:100	Donkey Fab anti-rabbit, Alexa-Fluor 488, Jackson-Immuno-Research	1:400
TRPV1 – Antibody, Rabbit, Novus biologicals	1:50	Donkey Anti-sheep, IgG, Alexa Fluor 488, Jackson-Immuno-Research	1:100
	1:100	Donkey anti-rabbit, Alexa-Fluor 647, Jackson-Immuno-Research	1:400
TRPA1-Antikörper, sheep, abcam	1:100	Donkey anti-rabbit, Alexa-Fluor 488, Jackson-Immuno-Research	1:400
Anti-FcεRI-Antikörper, Armenian Hamster, abcam	1:100	Goat, Anti-Armenian Hamster, AF 488, Jackson-Immuno-Research	1:400
Serum Esel, unkonj., Dianova	5:100		

## 4.12 Auswertung der Immunhistochemie

Zur Auswertung wurde das Mikroskop Olympus BX51 Fluoreszenz-Mikroskop sowie die Olympus-DP72-Kamera und X-Cite Series 120Q-Fluoreszenzlampe (EXFO) in 20x-facher Vergrößerung verwendet. Als Programm zur Auswertung diente AxioVision von Zeiss.

Dieses Mikroskop und dieses Programm wurden ebenfalls benutzt für die Bilder in 40x-Vergrößerung sowie für die Bilder der Lichtmikroskopie (Kamera von Zeiss).

Tabelle 3 : Filter für die Auflichtfluoreszenz

CY 3	Tryptase
CY 2	FcεRI, TRPA1, TRPV1
CY 5	Chymase, TRPV1, FcεRI

Es wurden 15 Bilder in 20x-Vergrößerung pro Tier gemacht und alle deutlich identifizierbaren Mastzellen in die Auswertung mit einbezogen. Dabei wurde darauf geachtet, dass verschiedene Anteile der Lunge (weiter kranial und weiter kaudal) verwendet wurden. Eine Zelle war für ihren Marker positiv, wenn eine deutliche Anfärbbarkeit im Vergleich zum Isotyp vorlag.

Bestimmt wurde der Anteil der jeweils für ihren Marker positiven Mastzellen an allen Mastzellen.

Zur Bestimmung der Gesamtmastzellzahl pro Lungenflächeneinheit wurde die Fläche eines der Bilder in 20x Vergrößerung berechnet. Das Ergebnis wurde mit der Anzahl der ausgezählten Bilder multipliziert und die Anzahl der Mastzellen durch dieses Produkt geteilt.

### 4.13 Statistik

Für die Auswertung der statistischen Daten wurde das Programm GraphPad Prism 5, bzw. vereinzelt GraphPad Prism 7 und 8 der Firma Graphpad Software benutzt.

Bei allen Stichproben handelte es sich um unverbundene Stichproben (unterschiedliche Tiere, zum gleichen Zeitpunkt gemessen).

Die Bestimmung der Verteilungsform (normalverteilt oder nicht-normalverteilt) erfolgte mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests.

Waren die Daten normalverteilt und es waren 4 Datensätze vorhanden wurde anschließend mithilfe eines One-way-Anova und des Bonferroni's Multiple Comparison – post-Test auf Signifikanz hin untersucht.

Waren die Daten nicht normalverteilt und es waren 4 Datensätze vorhanden wurden der Kruskal-Wallis test und der Dunn's Multiple Comparison Test verwendet, um auf Signifikanz zu prüfen.

Bei Normalverteilung und 2 Datensätzen wurde der ungepaarte T-Test zur Signifikanztestung verwendet und bei Nicht-Normalverteilung mit 2 Datensätzen der Mann Whitney Test.

Für alle Tests galt das Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Die Auswertung erfolgte getrennt nach Makrophagen, eosinophilen Granulozyten, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten.

Abbildung 3 BAL C57BL6/J / Saline

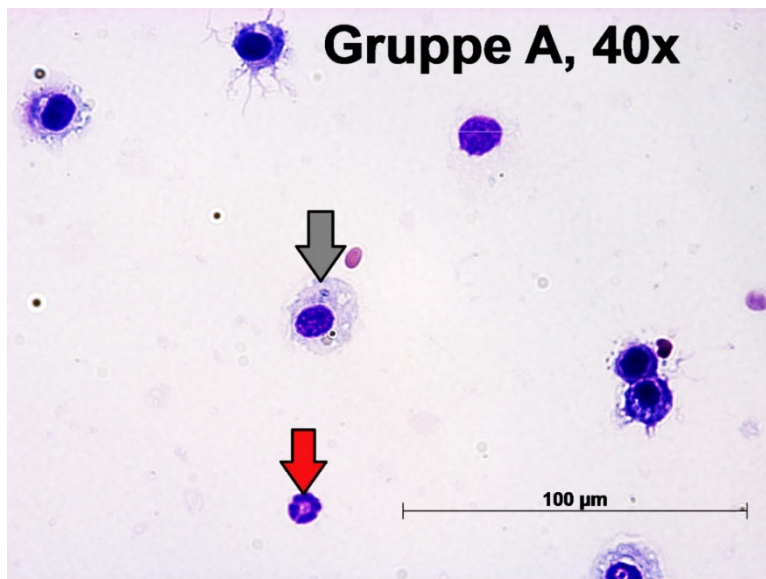


Abbildung 4 BAL C57BL6/J / HDM

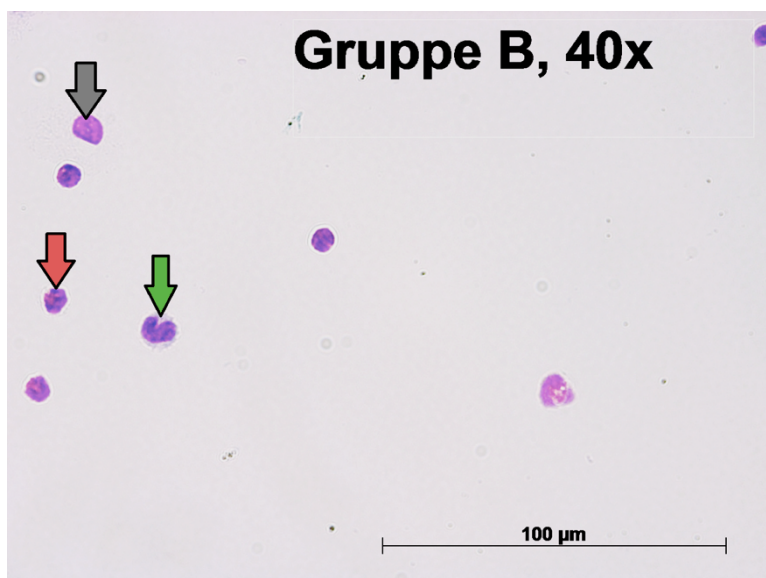
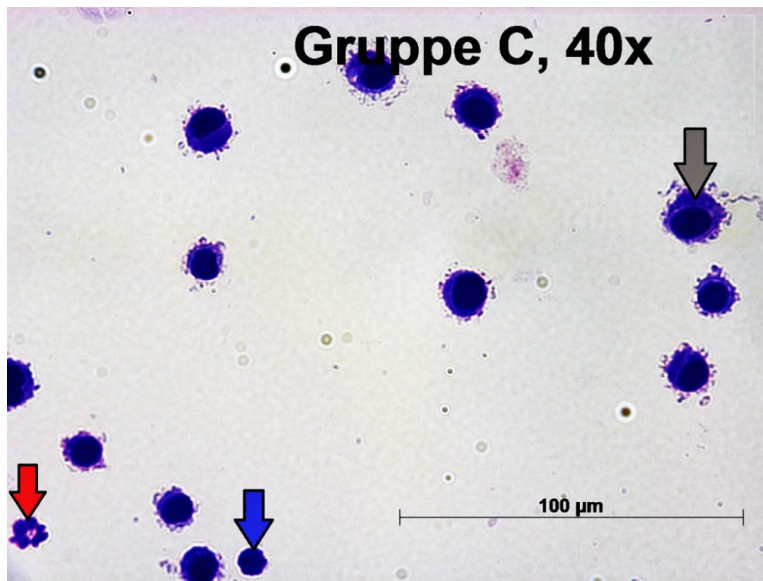
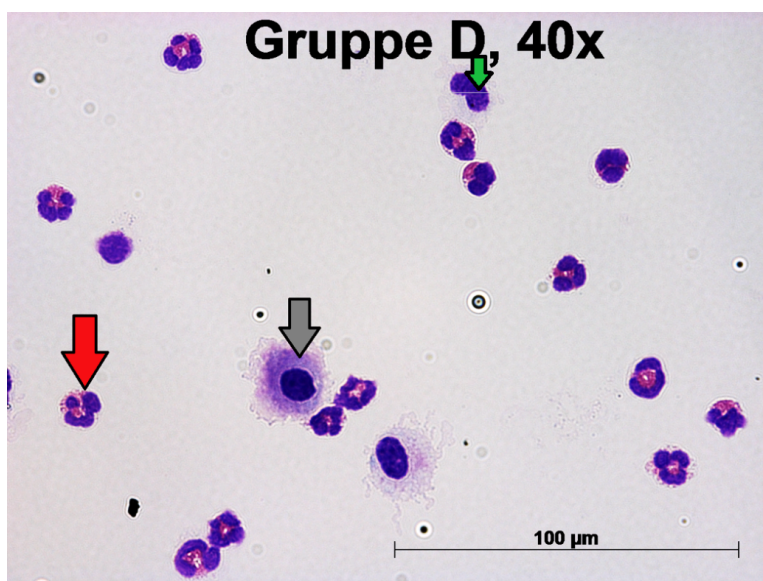


Abbildung 5 BAL C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup>/SalineAbbildung 6 BAL C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup>/HDM

Abbildungen 3-6 zeigen einen exemplarischen Ausschnitt jeder Gruppe bei 40x Vergrößerung (A = C57BL6/J mit Salinen behandelt, B = C57BL6/J mit HDM behandelt, C = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit Salinen behandelt, D = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit HDM behandelt). Mit rot markiert wurden eosinophile Granulozyten, mit blau Lymphozyten, mit grün neutrophile Granulozyten und mit grau Makrophagen

Diagramm 1 Übersicht BAL

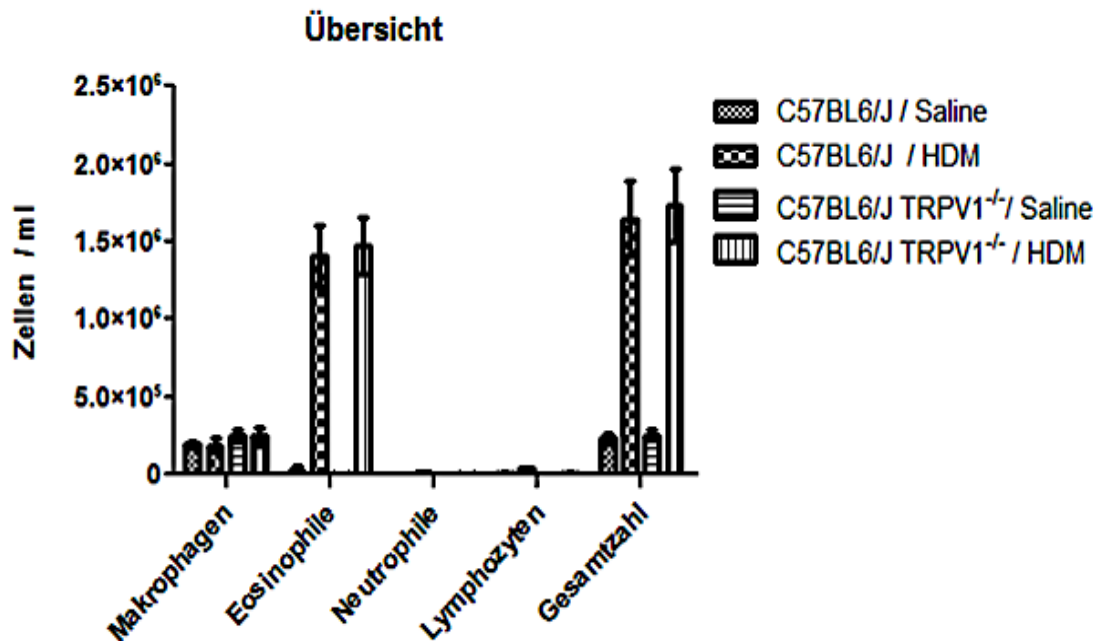


Diagramm 1 zeigt die verschiedenen Gruppen (A = C57BL6/J mit Salinen behandelt, B = C57BL6/J mit HDM behandelt, C = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit Salinen behandelt, D = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit HDM behandelt), aufgeteilt nach Zellarten (Makrophagen, eosinophile Granulozyten, neutrophile Granulozyten, Lymphozyten) und Gesamtzellzahl, aufgetragen nach Zellen / ml BAL

Der Übersichtlichkeit halber schließt sich eine Aufteilung in die einzelnen Zellpopulationen an.

Diagramm 2 Gesamtzellzahl

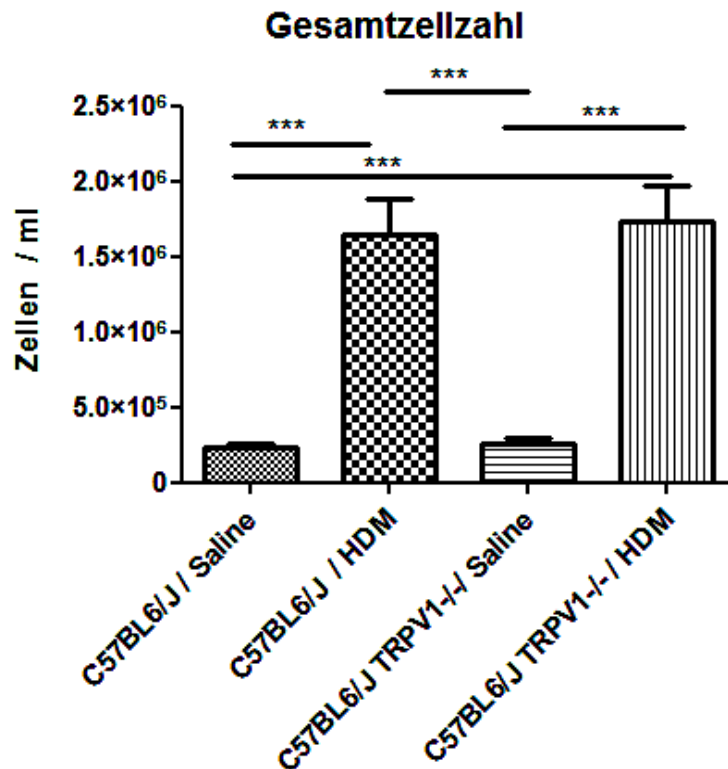


Diagramm 2 zeigt die Gesamtzellzahl der verschiedenen Gruppen (A = C57BL6/J mit Salinen behandelt, B = C57BL6/J mit HDM behandelt, C = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit Salinen behandelt, D = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit HDM behandelt), aufgetragen nach Zellen / ml BAL

In den mit HDM behandelten Gruppen zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Gesamtzellzahl im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen.

(A:  $233438 \pm 84091$ ; B:  $1,646 \cdot 10^6 \pm 630547$ ; C:  $255938 \pm 102765$ ;

D:  $1,733 \cdot 10^6 \pm 531992$ ; A vs B \*\*\*, A vs D \*\*\*, C vs B \*\*\* und C vs D \*\*\*)

Zwischen den TRPV1-Knockout-Mäusen und den Wildtyp (WT)-Mäusen zeigt sich bei gleicher Behandlung jeweils kein signifikanter Unterschied bezüglich der Gesamtzellzahl.

Diagramm 3 Makrophagen

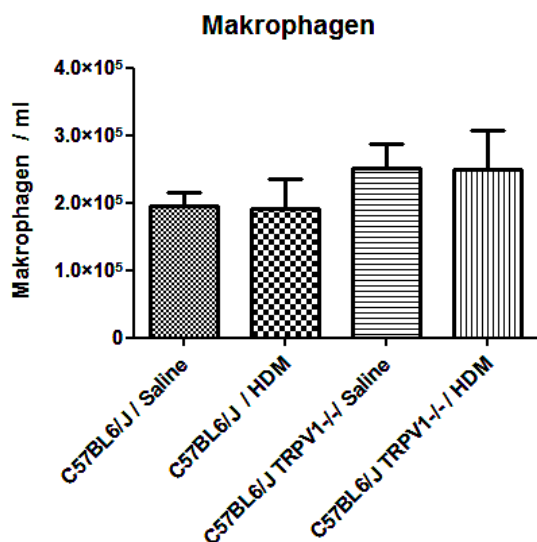


Diagramm 4 Eosinophile Granulozyten

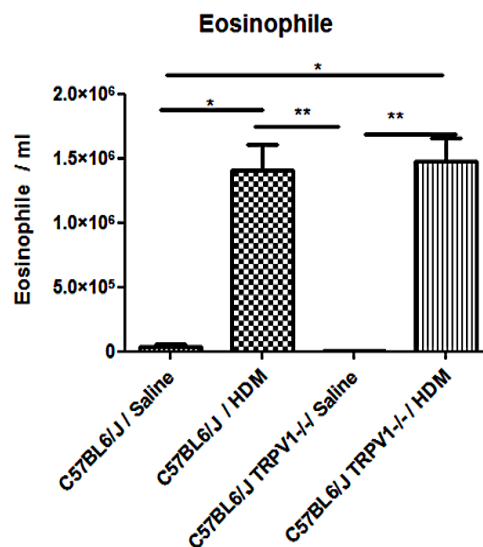


Diagramm 3 zeigt die Anzahl an Makrophagen in den verschiedenen Gruppen (A = C57BL6/J mit Salinen behandelt, B = C57BL6/J mit HDM behandelt, C = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit Salinen behandelt, D = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit HDM behandelt), aufgetragen nach Makrophagen / ml BAL.

Diagramm 4 zeigt die Anzahl an eosinophilen Granulozyten in den verschiedenen Gruppen (A = C57BL6/J mit Salinen behandelt, B = C57BL6/J mit HDM behandelt, C = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit Salinen behandelt, D = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit HDM behandelt), aufgetragen nach Eosinophile / ml BAL.

Die Anzahl an Makrophagen / ml BAL betreffend ist kein signifikanter Unterschied ( $p=0,35$ ) zwischen den verschiedenen Gruppen festzustellen. (A:  $194367 \pm 56686$  vs B:  $190336 \pm 121541$  vs C:  $251243 \pm 101887$  vs D:  $249149 \pm 130771$ )

In den mit HDM behandelten Gruppen zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Anzahl an Eosinophilen im Vergleich zu den beiden mit NaCl behandelten Gruppen.

(A:  $31846 \pm 57236$ ; B:  $1,409 \cdot 10^6 \pm 530485$ ; C:  $3661 \pm 3325$ ; D:  $1,474 \cdot 10^6 \pm 411925$ ; A vs B \*; A vs D \*; C vs B \*\*; C vs D \*\*)

Auch bezüglich der Anzahl an Eosinophilen / ml BAL zeigt sich bei gleicher Behandlung jeweils kein signifikanter Unterschied zwischen den TRPV1-Knockout-Mäusen und den Wildtyp-Mäusen



Diagramm 5 Lymphozyten

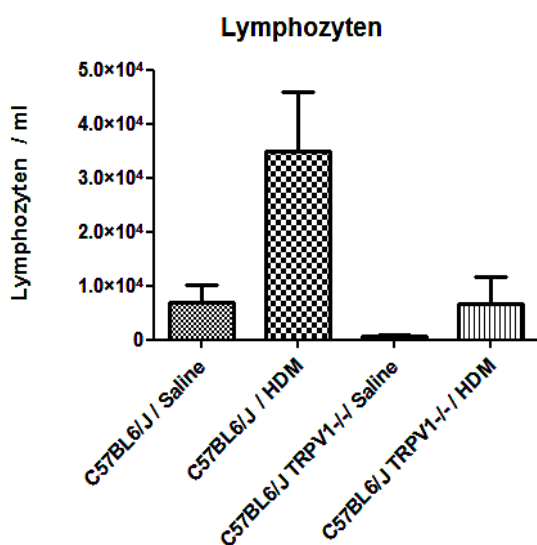


Diagramm 6 Neutrophile Granulozyten

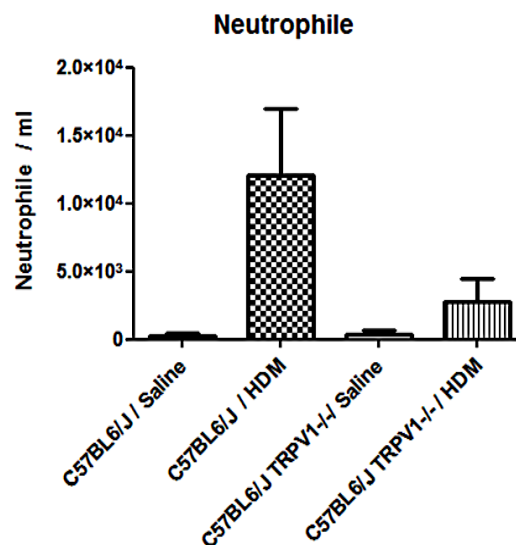


Diagramm 5 zeigt die Anzahl an Lymphozyten in den verschiedenen Gruppen (A = C57BL6/J mit Salinen behandelt, B = C57BL6/J mit HDM behandelt, C = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> / HDM, D = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit HDM behandelt), aufgetragen nach Lymphozyten / ml BAL.

Diagramm 6 zeigt die Anzahl an neutrophilen Granulozyten in den verschiedenen Gruppen (A = C57BL6/J mit Salinen behandelt, B = C57BL6/J mit HDM behandelt, C = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit Salinen behandelt, D = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit HDM behandelt), aufgetragen nach Neutrophile / ml BAL.

Pro ml BAL sind die Lymphozyten in den beiden mit HDM behandelten Gruppen vermehrt vorzufinden, allerdings auf einem statistisch nicht signifikanten Niveau. ( $p=0,09$ ) (A:  $6932 \pm 8948$  und C:  $662,4 \pm 729,3$  vs B:  $34811 \pm 29590$  und D:  $6694 \pm 11316$ )

Pro ml BAL sind die Neutrophilen in den beiden mit HDM behandelten Gruppen vermehrt vorzufinden, allerdings ebenfalls auf einem statistisch nicht signifikanten Niveau. ( $p>0,05$  im Dunn-Test)

(A:  $292,3 \pm 573,1$  vs B:  $12034 \pm 13145$  vs C:  $371,3 \pm 698,9$  vs D:  $2769 \pm 3804$ )

Zwischen den TRPV1-Knockout-Mäusen und den WT-Mäusen zeigt sich bei gleicher Behandlung jeweils kein signifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl an Neutrophilen bzw. Lymphozyten pro ml BAL.

## 5.2 Gesamt – IgE – Spiegel im Serum

Diagramm 7 IgE Spiegel Serum

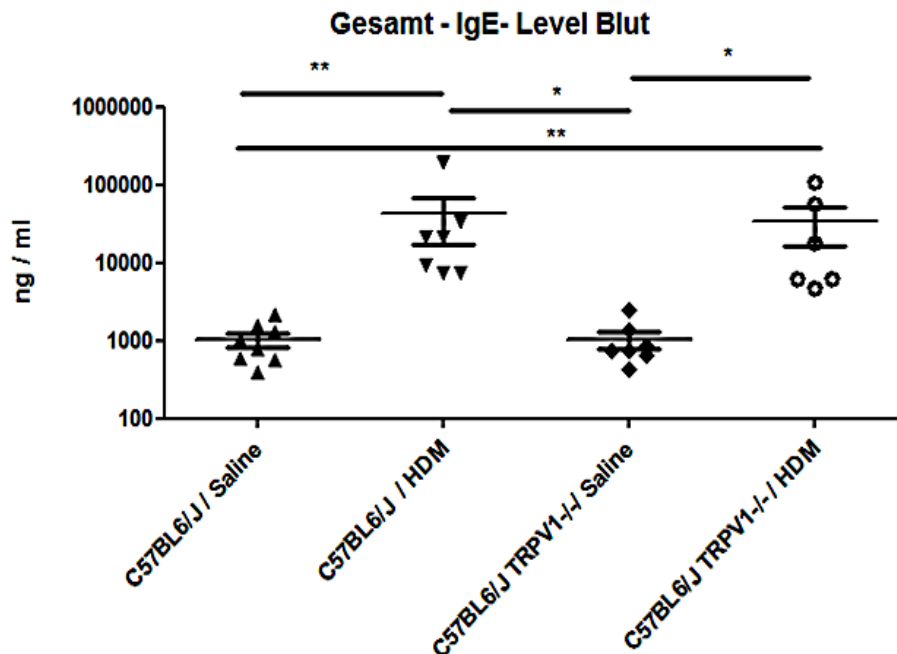


Diagramm 7 zeigt die Menge an Gesamt-IgE im Blut der behandelten Mäuse in den verschiedenen Gruppen (A = C57BL6/J mit Salinen behandelt, B = C57BL6/J mit HDM behandelt, C = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit Salinen behandelt, D = C57BL6/J =TRPV1<sup>-/-</sup> mit HDM behandelt) in ng / ml Serum.

In den mit HDM behandelten Gruppen zeigt sich ein signifikanter Anstieg der IgE-Spiegel im Vergleich zu den beiden mit NaCl behandelten Gruppen.

(A: 1042 ± 588 ng/ml; B: 42990 ± 69433 ng/ml; C: 1036 ± 690 ng/ml;

D: 33651 ± 42318 ng/ml; A vs B \*\*; A vs D \*; C vs B \*\*; C vs D \*)

Zwischen den TRPV1-Knockout-Mäusen und den WT-Mäusen zeigt sich bei gleicher Behandlung jeweils kein signifikanter Unterschied der Serum-IgE-Spiegel.

### 5.3 HE – Färbung Gefrierschnitte

Abbildung 7 HE-Färbung C57BL6/J / Saline + C57BL6/J / HDM

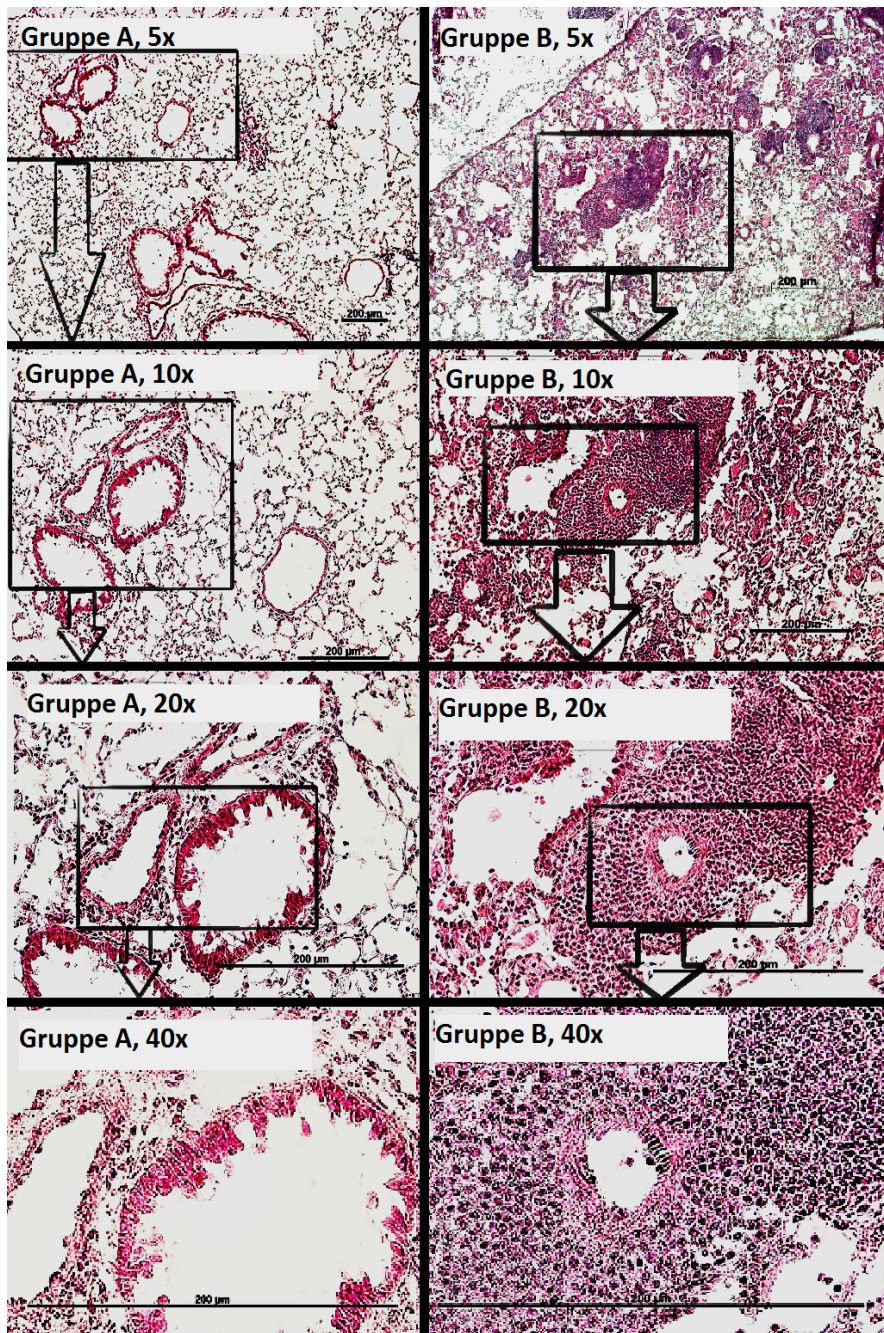


Abbildung 7 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen unterschiedlicher Vergrößerungen aus dem Bronchialgewebe der WT-Gruppen A und B nach HE-Färbung. (A = C57BL6/J mit Salinen behandelt, B = C57BL6/J mit HDM behandelt). Es ist deutlich eine Akkumulation inflammatorischer Zellen um die Bronchioli der mit HDM behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten. Auch das bronchiale Remodeling mit Dickenzunahme der Wände der Bronchioli kann festgestellt werden.



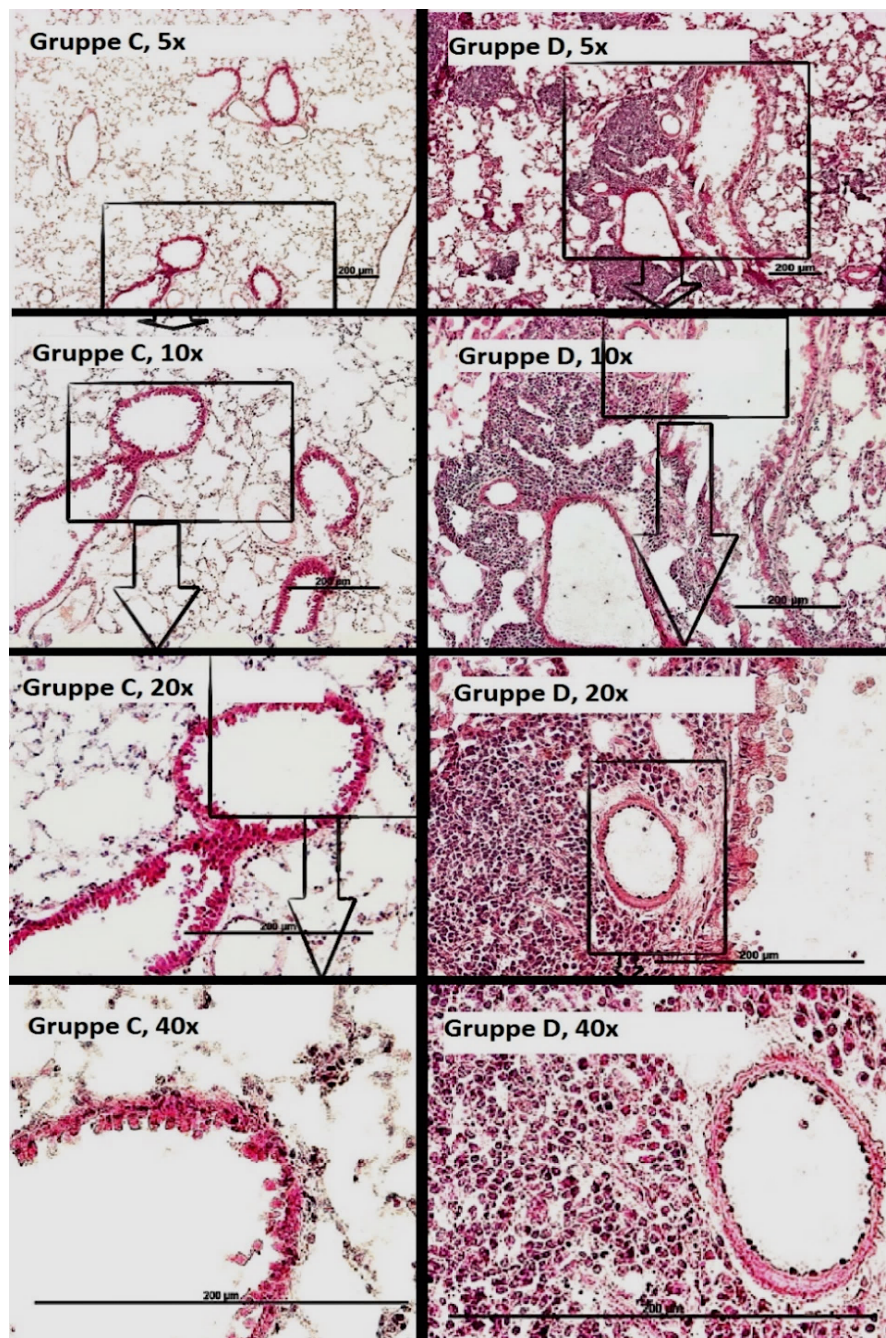
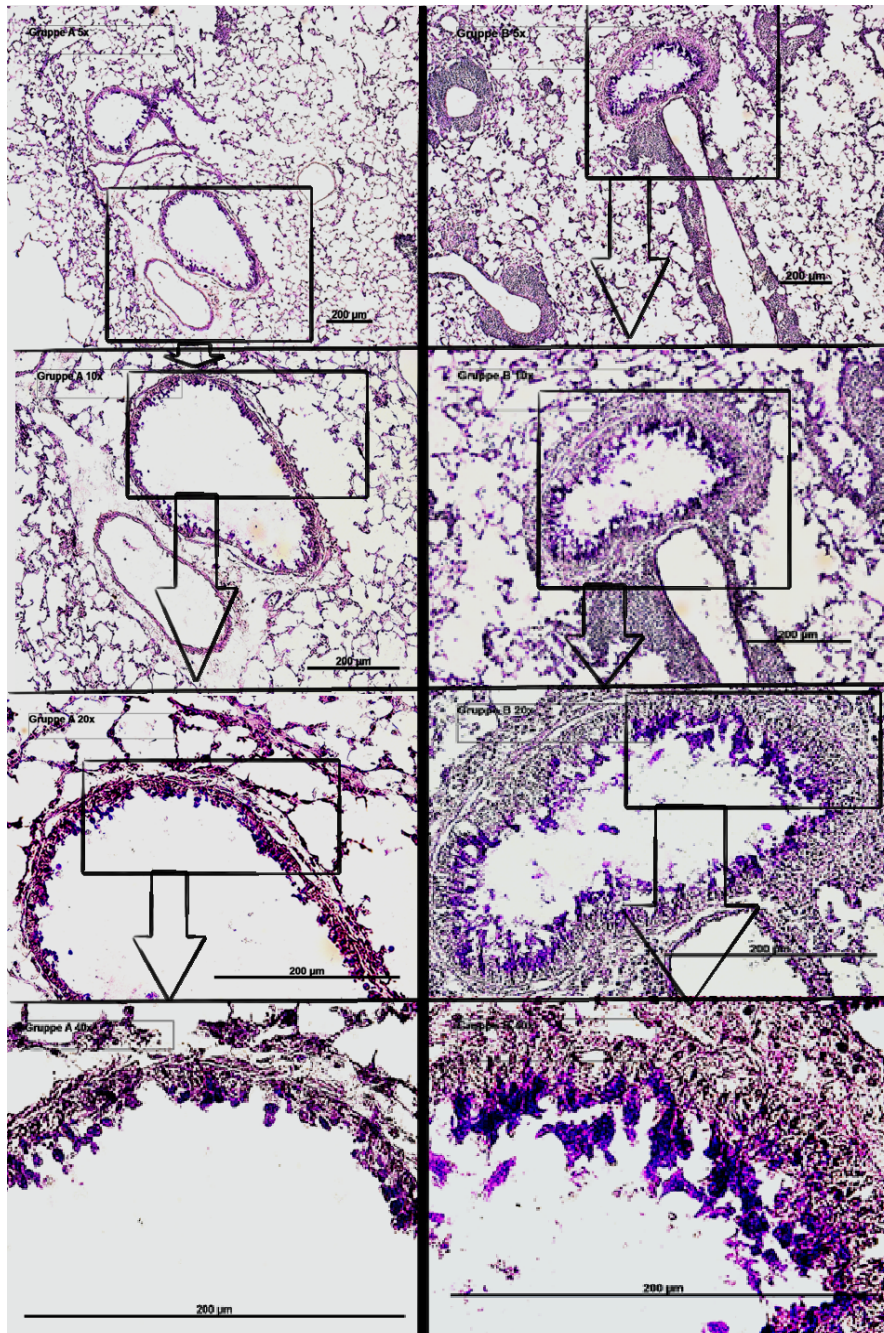
Abbildung 8 HE-Färbung C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> / Saline + C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> / HDM

Abbildung 8 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen unterschiedlicher Vergrößerungen aus dem Bronchialgewebe der TRPV1<sup>-/-</sup> - Gruppen C und D nach HE-Färbung. (C = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> / NaCl, D= C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit HDM behandelt) Es ist deutlich eine Akkumulation inflammatorischer Zellen um die Bronchioli der mit HDM behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten. Auch das bronchiale Remodeling mit Dickenzunahme der Wände der Bronchioli kann festgestellt werden.



## 5.4 PAS – Färbung Gefrierschnitte

Abbildungung 9 PAS-Färbung C57BL6/J / Saline + C57BL6/J / HDM



Abbildungung 9 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen unterschiedlicher Vergrößerungen aus dem Bronchialgewebe der WT-Gruppen A und B nach PAS-Färbung. (A = C57BL6/J mit Salinen behandelt, B = C57BL6/J mit HDM behandelt) Es ist deutlich eine Mukusan-sammlung im Lumen der Bronchioli sowie eine Becherzellhyperplasie der mit HDM be-handelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten. Auch das bronchiale Remodeling mit Dickenzunahme der Wände der Bronchioli kann festgestellt werden.



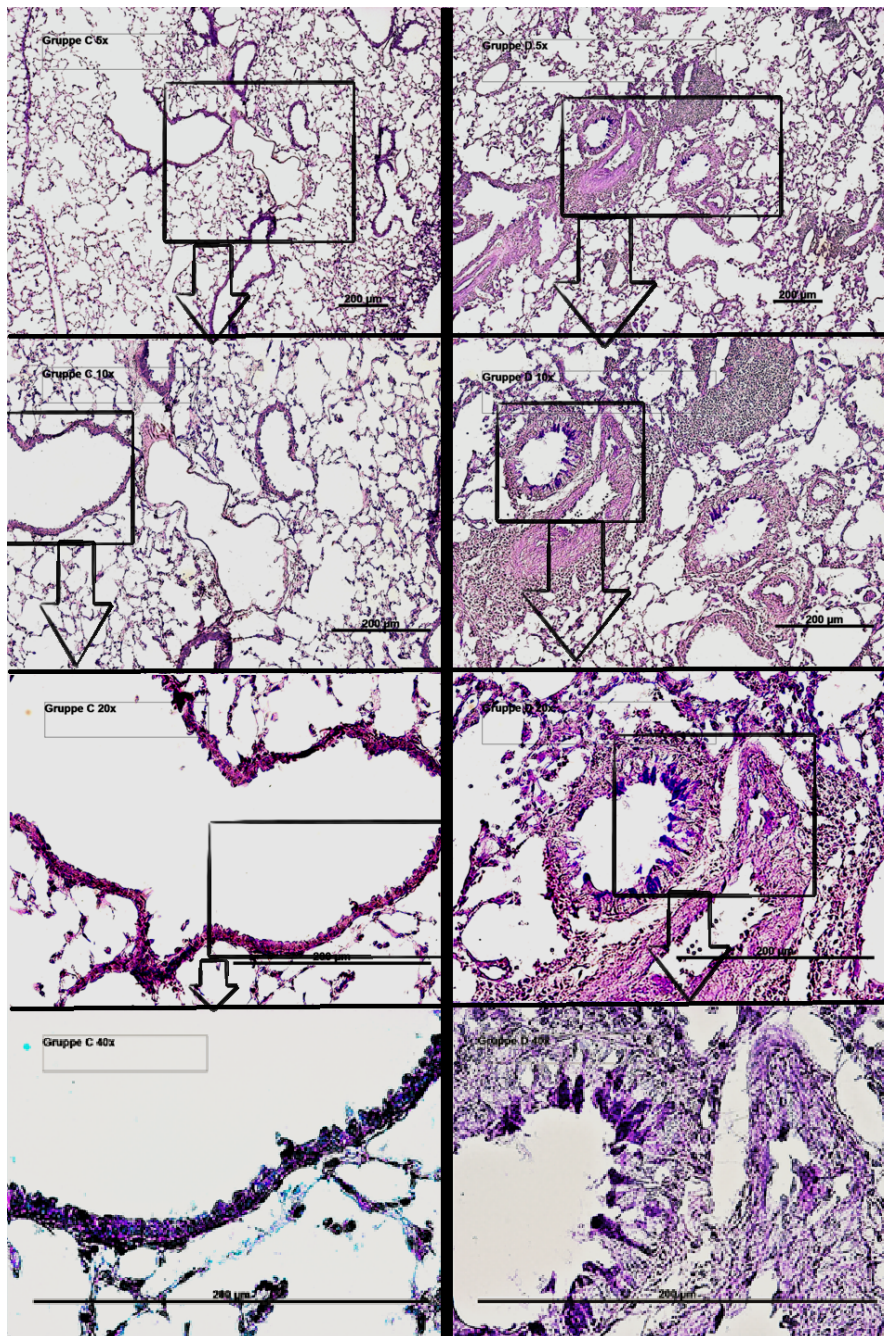
Abbildung 10 PAS-Färbung C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> / Saline + C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> / HDM

Abbildung 10 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen unterschiedlicher Vergrößerungen aus dem Bronchialgewebe der TRPV1<sup>-/-</sup> - Gruppen C und D nach PAS-Färbung. (C = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit Salinen behandelt, D = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit HDM behandelt)

Es ist deutlich eine Mukusansammlung im Lumen der Bronchioli sowie eine Becherzellhyperplasie der mit HDM behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten. Auch das bronchiale Remodeling mit Dickenzunahme der Wände der Bronchioli kann festgestellt werden.



## 5.5 Toluidinblau

Abbildung 11 Toluidinblau-Färbung C57BL6/J / Saline + C57BL6/J / HDM

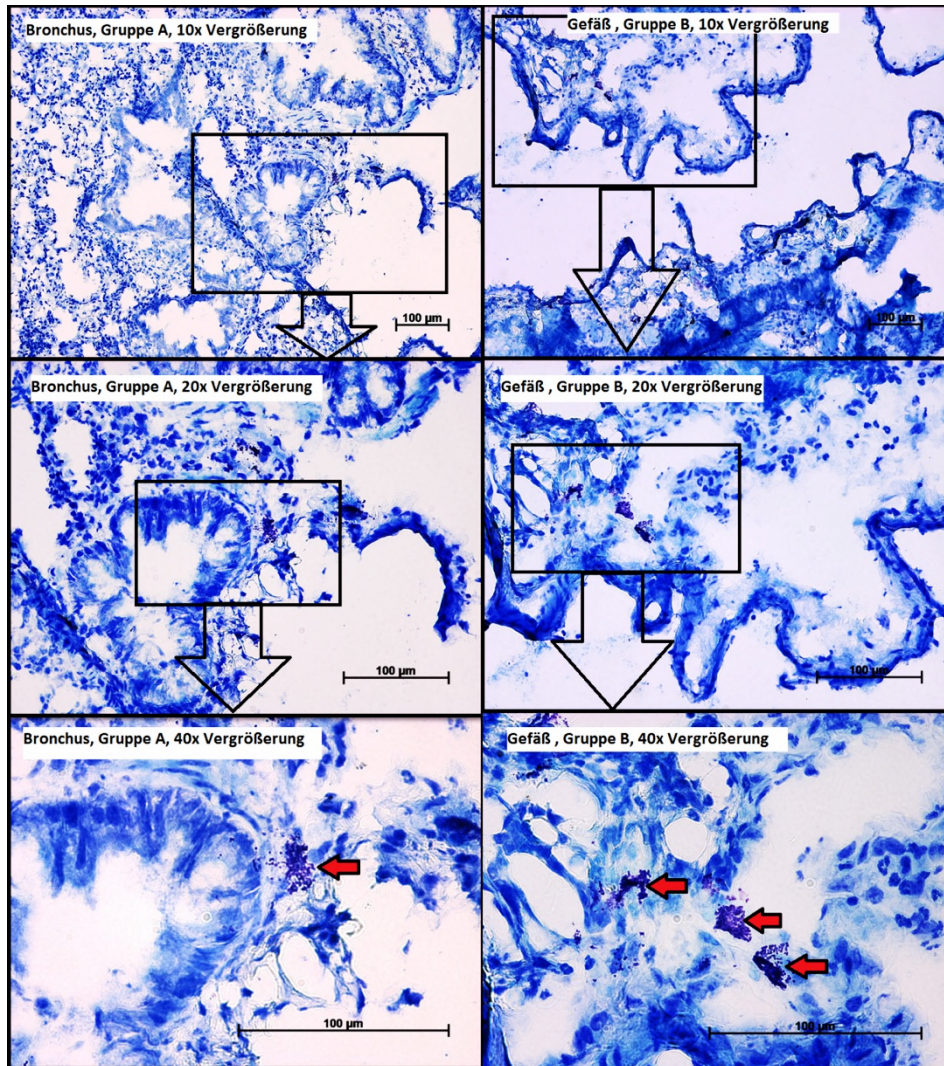


Abbildung 11 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen unterschiedlicher Vergrößerungen aus dem Bronchialgewebe der WT-Gruppen A und B nach Toluidinblau-Färbung. (A = C57BL6/J mit Salinen behandelt, B= C57BL6/J mit HDM behandelt)

Rot angefärbt wurden die Granula der Mastzellen. Man beachte, dass sich diese (mit roten Pfeilen markiert) vor allem in der Nähe von Bronchien (s. links) und großer Gefäße (s. rechts) befinden.

Abbildung 12 Toluidinblau-Färbung C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> / Saline

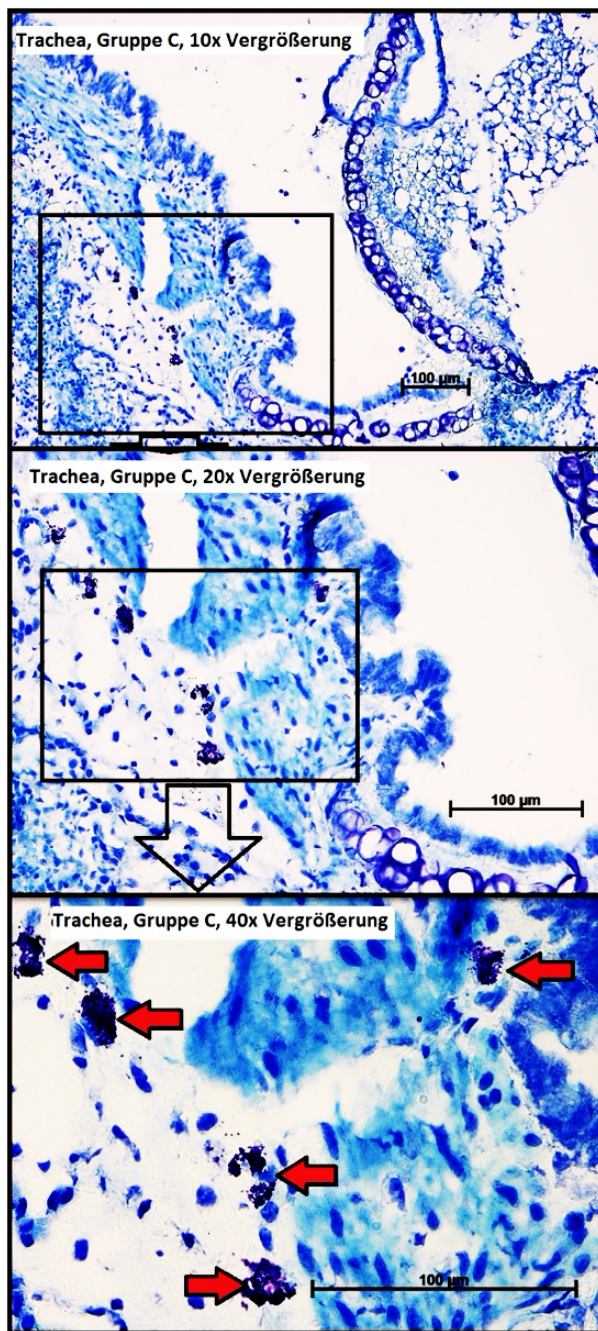


Abbildung 12 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen unterschiedlicher Vergrößerungen aus dem Bronchialgewebe der Gruppe C (C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> / Saline).

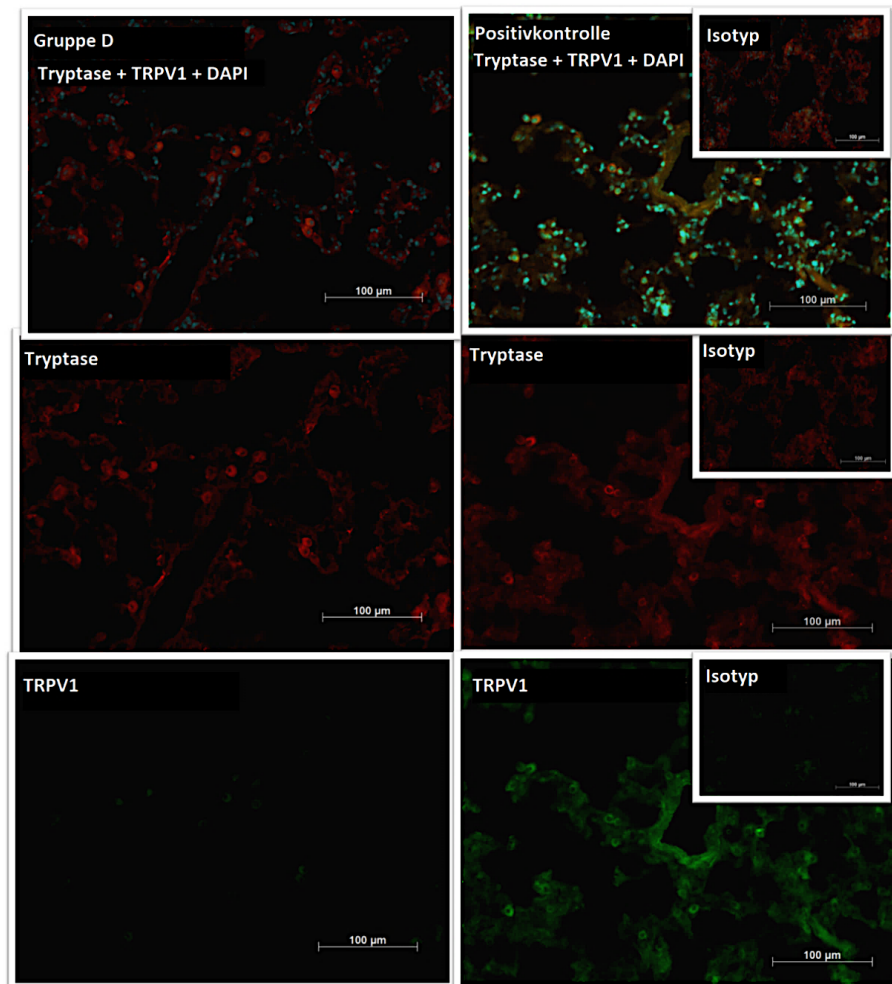
Rot angefärbt wurden die Granula der Mastzellen (markiert mit roten Pfeilen). Man beachte deren Nähe zur Trachea.



## 5.6 Immunhistochemie

### 5.6.1 Tryptase + TRPV1 – Nachweis Knockout

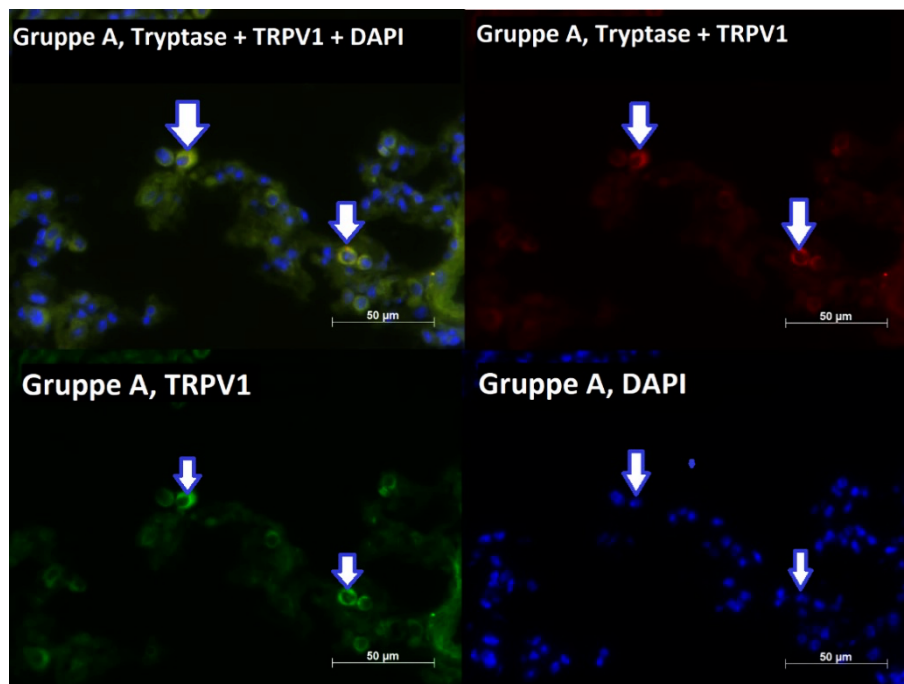
Abbildungung 13 Isotypen- + Positivkontrolle Tryptase + TRPV1 + DAPI



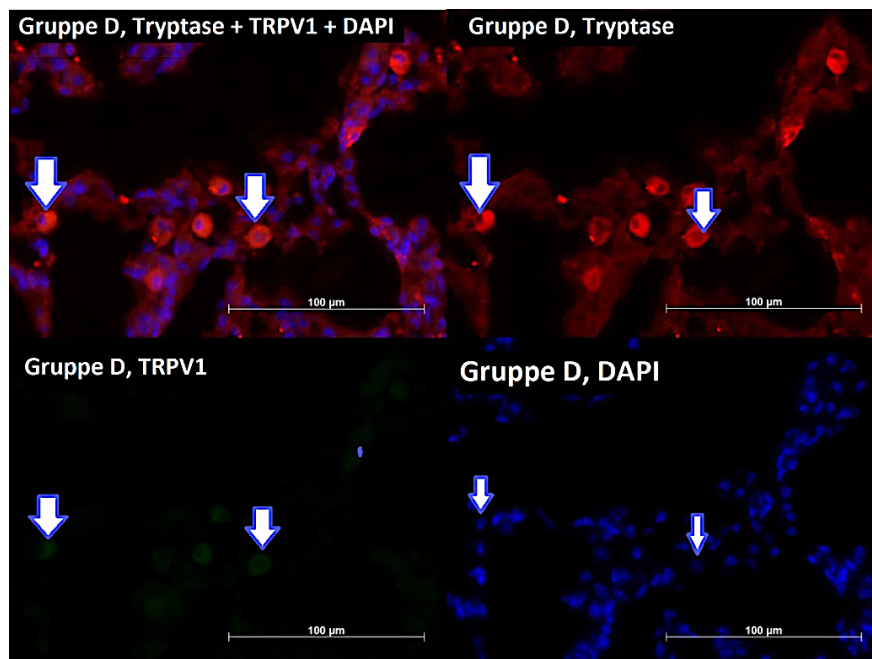
Abbildungung 13 zeigt beispielhaft Bilder der Färbung. Dargestellt wurde ein Tier der Gruppe D (C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> / HDM) im Vergleich zum Isotyp und zur Positivkontrolle (C57BL6/J / NaCl). Rot leuchten die Tryptase-positiven Zellen, also Mastzellen und grün die TRPV1-positiven Zellen. Cyanblau leuchtet die Kernfärbung DAPI.

Es ist festzustellen, dass während die Positivkontrolle sowohl deutlich positiv ist für Tryptase als auch für TRPV1 im Vergleich zum Isotyp, die C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> nur positiv sind für Tryptase und nicht für TRPV1.

Abbildungung 14 C57BL6/J / Saline Tryptase + TRPV1 + DAPI



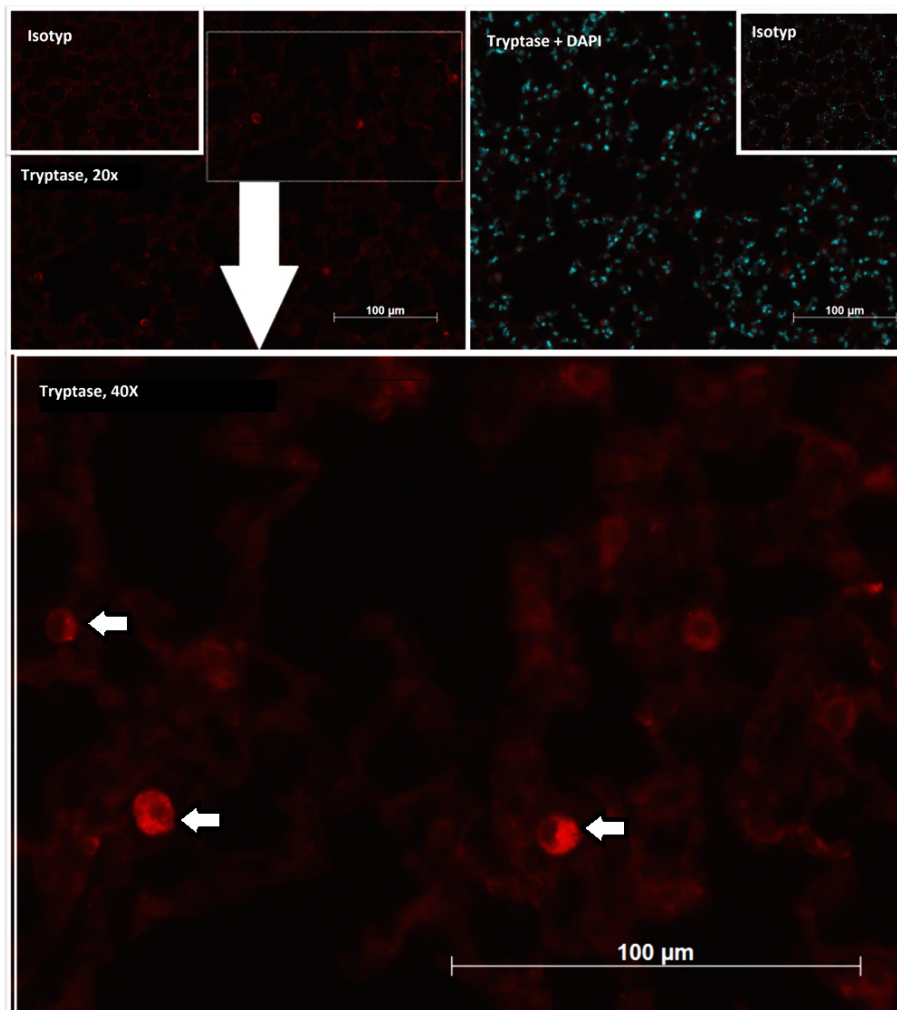
Abbildungung 15 C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> / HDM Tryptase + TRPV1 + DAPI



Abbildungen 14 und 15 zeigen beispielhaft Bilder der gleichen Färbung in 40x Vergrößerung. Mit blauen Pfeilen sind beispielhaft jeweils 2 Mastzellen markiert.

### 5.6.2 Gesamtmastzellzahl im Lungengewebe

Abbildungung 16 C57BL6/J / HDM Tryptase + DAPI



Abbildungung 16 zeigt beispielhaft Bilder der Färbung. Dargestellt wurde ein Tier der Gruppe B (C57BL6/J / HDM) im Vergleich zum Isotyp. Rot leuchten die Tryptase-positiven Zellen, also Mastzellen, Cyanblau leuchtet die Kernfärbung DAPI. Die weißen Pfeile zeigen beispielhaft einige Tryptase-markierbaren Zellen.

Es ist festzuhalten, dass die Färbung deutlich positiv ist für Tryptase im Vergleich zum Isotyp.

Diagramm 8 Gesamtzahl Mastzellen

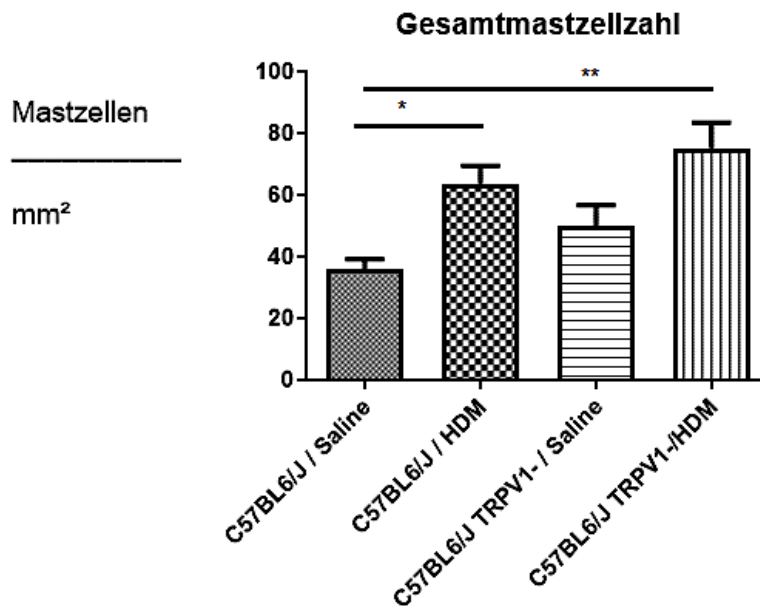


Diagramm 8 zeigt die 4 Gruppen (A = C57BL6/J mit Salinen behandelt, B = C57BL6/J mit HDM behandelt, C = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit Salinen behandelt, D = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit HDM behandelt) auf der X-Achse. Auf der Y-Achse sind die Gesamtmastzellen / mm<sup>2</sup> aufgetragen.

Es ist zu sehen, dass in den beiden Asthma-Gruppen B und D mehr Mastzellen im Lungenparenchym vorhanden sind als in den mit Salinen behandelten Kontrollgruppen.

Statistische Signifikanz erreicht diese Beobachtung beim Vergleich zwischen den Gruppen A und B (\*) sowie A und D (\*\*)

(A: 36,01 ± 8,83; B: 63,58 ± 15,55; C: 49,75 ± 18,15; D: 75,25 ± 18,39)

### 5.6.3 Expression des TRPV1-Rezeptors in den verschiedenen Mastzellpopulationen

Abbildung 17 C57BL6/J / HDM Tryptase + Chymase + TRPV1 + DAPI

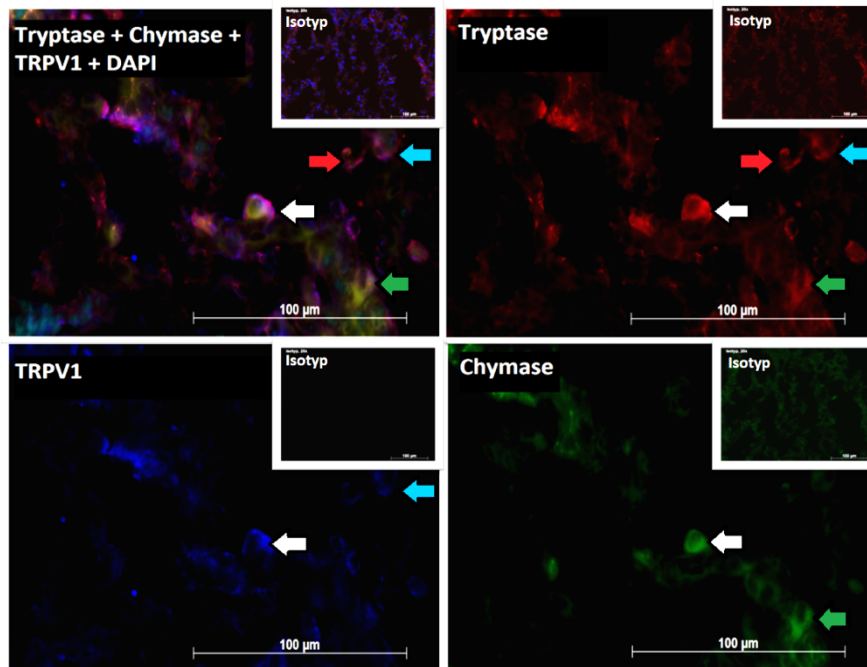


Abbildung 17 zeigt beispielhaft Bilder der Färbung in 40x Vergrößerung. Dargestellt wurde ein Tier der Gruppe B im Vergleich zum Isotyp. Rot leuchten die Tryptase-positiven Zellen, also Mastzellen, und blau die TRPV1-positiven Zellen. Grün markiert wurde das Mastzellenzym Chymase. Cyanblau leuchtet die Kernfärbung DAPI.

Es ist festzustellen, dass die Färbung deutlich positiv ist sowohl für Tryptase als auch für TRPV1 und Chymase im Vergleich zum Isotyp.

Mit Pfeilen markiert wurden beispielhaft einzelne Mastzellen (weiß = positiv für Tryptase, Chymase und TRPV1; blau = positiv nur für Tryptase und Chymase; grün = positiv nur für Tryptase und TRPV1; rot = Chymase- und TRPV1-negative Mastzelle).

Diagramm 9 Übersicht Tryptase + Chymase + TRPV1 + DAPI

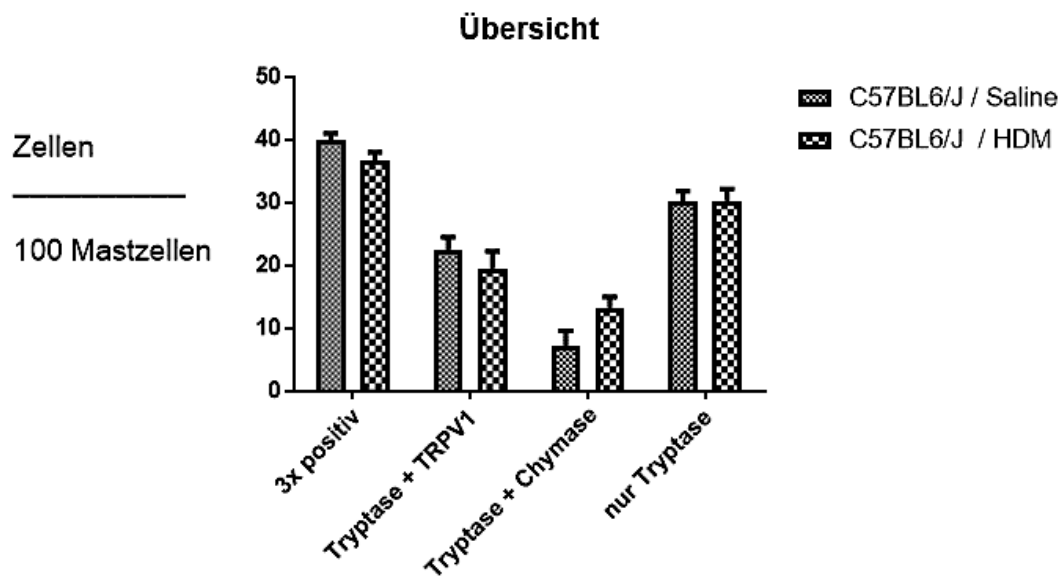


Diagramm 9 zeigt die 2 Wildtypgruppen (A = C57BL6/J mit Salinen behandelt, B= C57BL6/J mit HDM behandelt), aufgeteilt nach jeweils exprimierten Proteinen (nur Tryptase, Tryptase + Chymase, Tryptase + TRPV1, alle 3) aufgetragen nach Zellen / 100 Mastzellen.

Im Anschluss folgt die getrennte Darstellung zur besseren Übersichtlichkeit.

Diagramm 10 Prozentsatz TRPV1-positiver Mastzellen

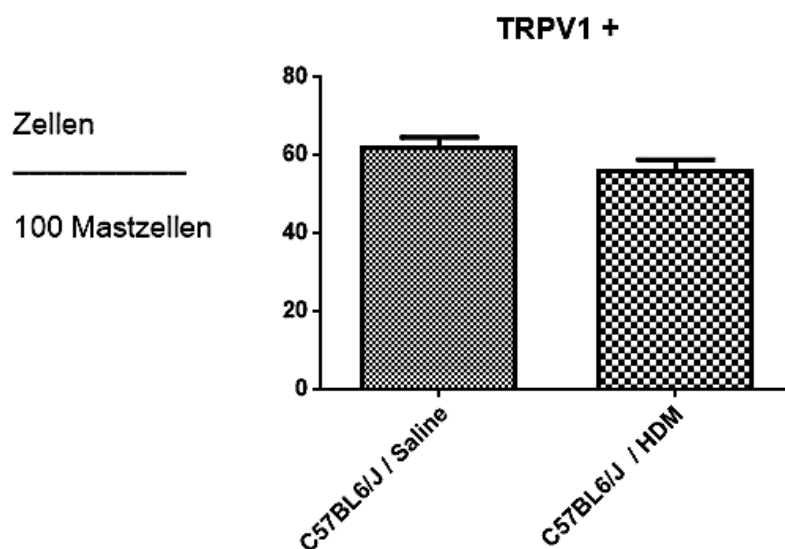


Diagramm 10 zeigt die 2 Wildtyp-Gruppen (A = C57BL6/J mit Salinen behandelt, B = C57BL6/J mit HDM behandelt). Es wurden alle TRPV1-exprimierenden Mastzellen aufgetragen nach Zellen / 100 Mastzellen. Im folgenden Diagramm wurden diese weiter aufgeteilt in die beiden Populationen  $M_T$  und  $M_{TC}$ .

Bezüglich der prozentualen TRPV1-Expression zeigt sich zwischen gesunden und asthmatischen Tieren kein statistisch signifikanter ( $p = 0,06$ ) Unterschied.

(A:  $62.55 \pm 4.94$  % vs. B:  $56.33 \pm 6.18$  %)

Diagramm 11 TRPV1-Expression in den Mastzellpopulationen

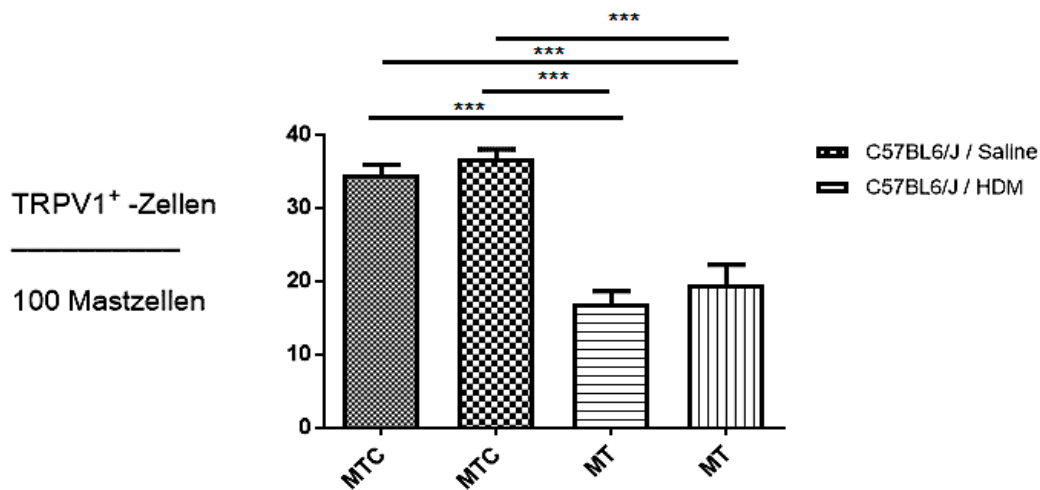


Diagramm 11 zeigt den Unterschied bezüglich der TRPV1-Expression zwischen den beiden Mastzellpopulationen ( $M_T$  = nur positiv für Tryptase,  $M_{TC}$  = positiv für Tryptase + Chymase). Diese wurden weiter unterteilt in NaCl-behandelte Mäuse und solche, welche mit HDM behandelt wurden, bei denen also Asthma ausgelöst wurde.

Es ist zu beobachten, dass Chymase-exprimierende Mastzellen auf einem statistisch deutlich signifikanten Niveau prozentual vermehrt den TRPV1-Rezeptor exprimieren.

( $M_T$ :  $34,61 \pm 3,48$  %;  $M_T$  mit Asthma:  $36,75 \pm 3,36$  %;  $M_{TC}$ :  $16,93 \pm 4,63$  %;  $M_{TC}$  mit Asthma:  $19,59 \pm 7,05$  %)

( $M_{TC}$  vs  $M_T$  \*\*\*;  $M_{TC}$  vs  $M_T$  mit Asthma \*\*\*;  $M_{TC}$  mit Asthma vs  $M_T$  \*\*\*;

$M_{TC}$  mit Asthma vs  $M_T$  mit Asthma \*\*\*)

Zwischen  $M_{TC}$  und  $M_{TC}$  mit Asthma sowie  $M_T$  und  $M_T$  mit Asthma zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied.



#### 5.6.4 Expression des TRPA1-Rezeptors in den verschiedenen Mastzellpopulationen

Abbildung 18 Isotypenkontrolle: C57BL6/J / NaCl Tryptase + Chymase + TRPA1 + DAPI

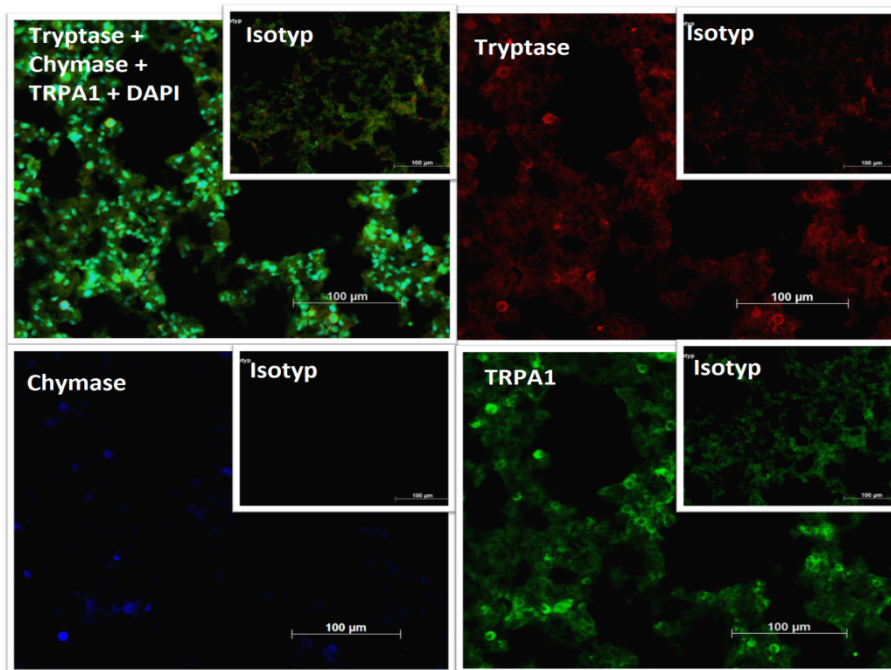


Abbildung 18 zeigt Bilder in 20x Vergrößerung der Färbung der Gruppe A. Rot leuchten die Tryptase-positiven Zellen, also Mastzellen, blau angefärbt wurde das Mastzellenchymase und grün der TRPA1-Rezeptor.

Dargestellt wurden sowohl jeder Kanal einzeln als auch alle miteinander und mit der Kernfärbung DAPI kombiniert.

Man beachte, dass auf den Bildern der Gruppen A viele Zellen als positiv zu identifizieren sind, während dies bei der Isotypenkontrolle nicht der Fall ist, was ein Qualitätskriterium für die Färbung darstellt.

Abbildung 19 C57BL6/J / Saline Tryptase + Chymase + TRPA1

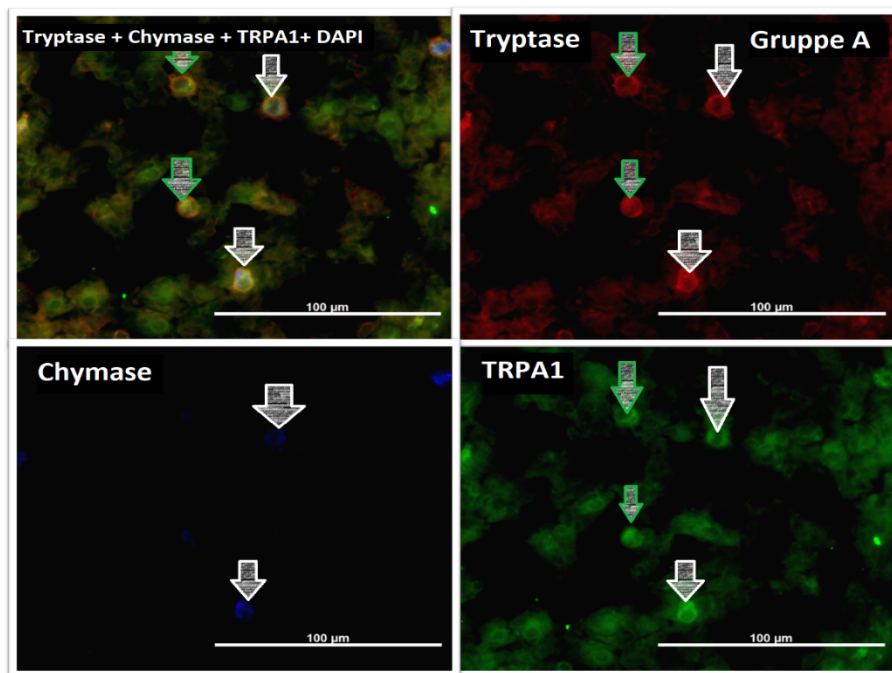


Abbildung 20 C57BL6/J / HDM Tryptase + Chymase + TRPA1

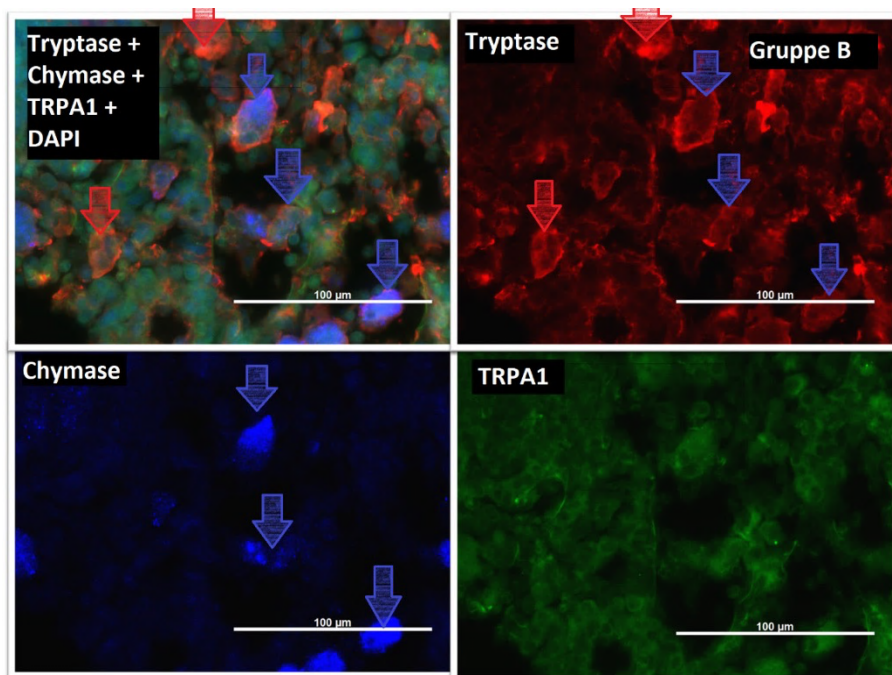
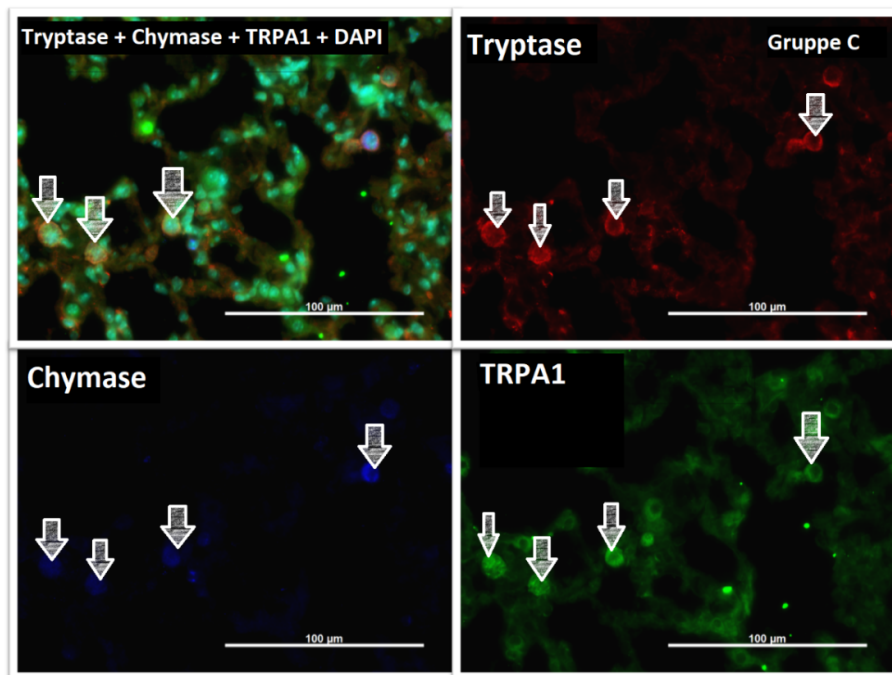


Abbildung 21 C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> / Saline Tryptase + Chymase + TRPA1

Abbildungen 19-21 zeigen Bilder der gleichen Färbung in 40x Vergrößerung. Mit Pfeilen wurden beispielhaft jeweils einzelne Mastzellen markiert. (weiß = positiv für Tryptase, Chymase und TRPA1; blau = positiv nur für Tryptase und Chymase; grün = positiv nur für Tryptase und TRPA1; rot = Chymase- und TRPA1-negative Mastzelle)

Diagramm 12 Übersicht Tryptase + Chymase + TRPA1

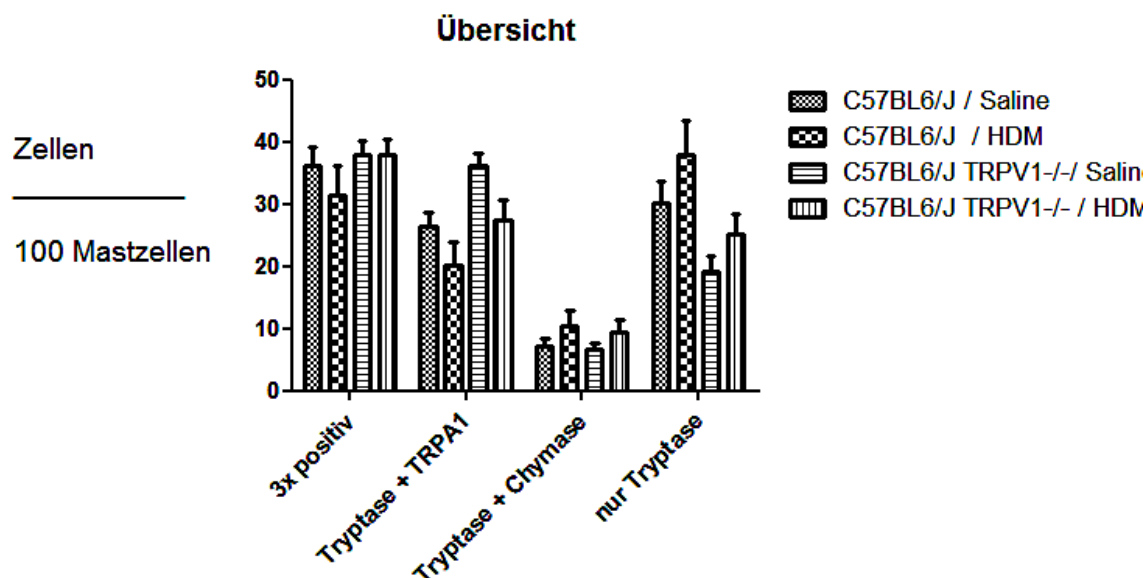


Diagramm 12 zeigt die 4 Gruppen (A = C57BL6/J mit Salinen behandelt, B = C57BL6/J mit HDM behandelt, C = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit Salinen behandelt, D = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit HDM behandelt), aufgeteilt nach den jeweils exprimierten Proteinen (nur Tryptase, Tryptase + Chymase, Tryptase + TRPA1, alle 3) aufgetragen nach Zellen / 100 Mastzellen.

Im Anschluss folgt die getrennte Darstellung zur besseren Übersichtlichkeit.

Diagramm 13 Prozentsatz TRPA1-positiver Mastzellen

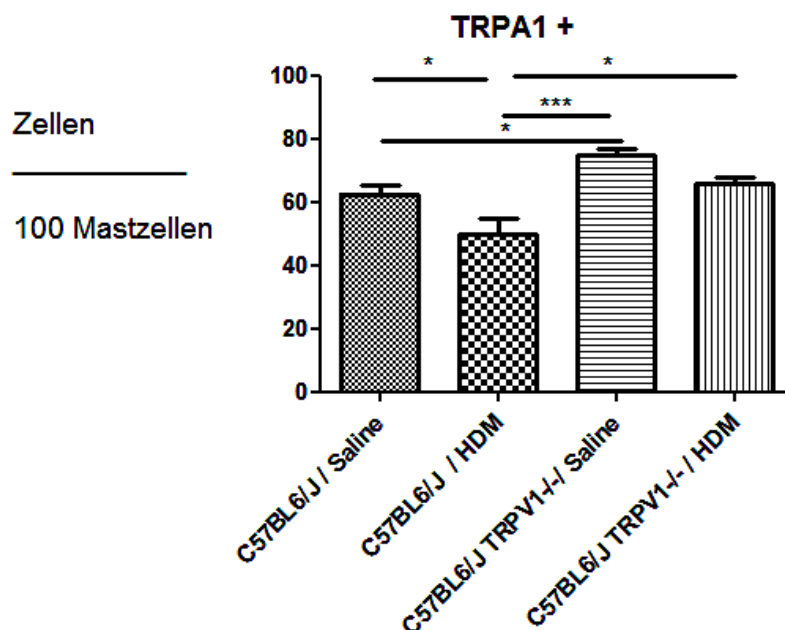


Diagramm 13 zeigt die 4 Maus-Gruppen (A = C57BL6/J mit Salinen behandelt, B = C57BL6/J mit HDM behandelt, C = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit Salinen behandelt, D = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit HDM behandelt). Es wurden alle TRPA1-exprimierenden Mastzellen aufgetragen nach Zellen / 100 Mastzellen. Im folgenden Diagramm wurden diese weiter aufgeteilt in die beiden Populationen M<sub>T</sub> und M<sub>TC</sub>.

Bezüglich der Gesamtzahl der TRPA1-exprimierenden Mastzellen zeigt sich ein signifikanter Abfall bei den mit HDM behandelten Wildtyp-Tieren im Vergleich zur entsprechenden Salin-Kontrollgruppe. (A: 62,58 ± 7,49 % vs B: 49,95 ± 11,7 %, \*)

Dieser Abfall ist auch bei den TRPV1<sup>-/-</sup> Tieren zu verzeichnen, befindet sich aber nicht im statistisch signifikanten Bereich. (C: 74,61 ± 6,03 % vs D: 65,94 ± 4,51 %, p>0,05)

Ein signifikanter Anstieg zeigt sich bei den TRPV1<sup>-/-</sup> Tieren im Vergleich zu den TRPV1-positiven Mäusen. (A: 62,58 ± 7,49 % vs C: 74,61 ± 6,03 %, \* und B: 49,95 ± 11,7 % vs D: 65,94 ± 4,51 %, \*)

Ein signifikanter Unterschied ist zwischen den mit HDM behandelten Wildtyp-Tieren und den TRPV1<sup>-/-</sup> / mit Salinen behandelten Tieren zu beobachten.

(B: 49,95 ± 11,7 % vs C: 74,61 ± 6,03 %, \*\*\*)

Diagramm 14 Vergleich der Mastzellpopulationen bezüglich TRPA1

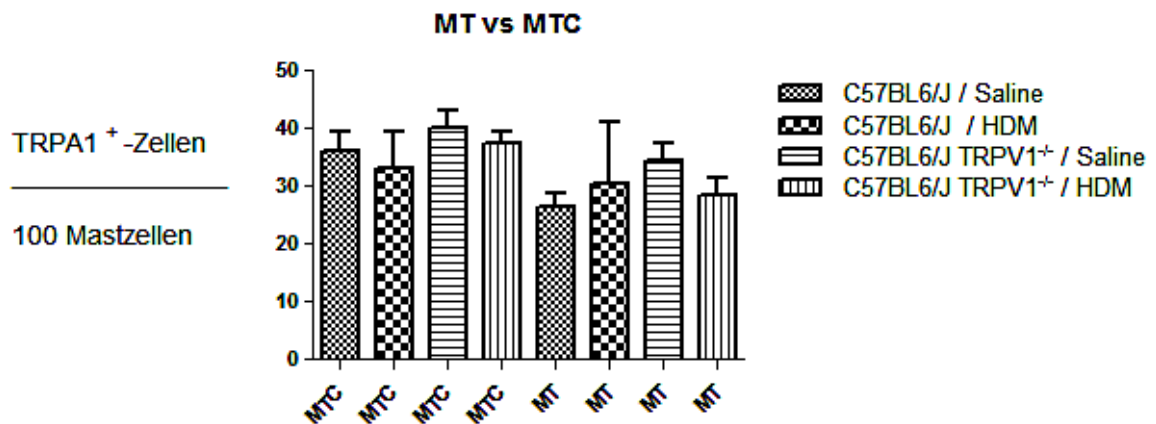


Diagramm 14 zeigt alle 4 Gruppen (A = C57BL6/J mit Salinen behandelt, B = C57BL6/J mit HDM behandelt, C = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit NaCl behandelt, D = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit HDM behandelt), aufgetragen nach TRPA1-markierbaren Mastzellen / 100 Mastzellen. Diese wurden weiter aufgeteilt in die beiden Populationen M<sub>T</sub> (nur Tryptase-positiv) und M<sub>TC</sub> (Tryptase + Chymase-positiv).

Es zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied. Weder zwischen den einzelnen Gruppen innerhalb der Mastzellpopulationen, noch zwischen den beiden Populationen M<sub>T</sub> und M<sub>TC</sub>.

(M<sub>T</sub>: A: 26,49 ± 6,05 %; B: 30,28 ± 26,53 %; C: 34,43 ± 8,29 %; D: 28,54 ± 6,72 %)

(A vs B, A vs C, A vs D, B vs C, B vs D und C vs D; p jeweils >0,05)

(M<sub>TC</sub>: A: 36,09 ± 8,99 %; B: 33,19 ± 15,36 %; C: 40,18 ± 7,8 %; D: 37,41 ± 5,19 %)

(A vs B, A vs C, A vs D, B vs C, B vs D und C vs D; p jeweils >0,05)

Diagramm 15 TRPA1- und Chymase-negative Mastzellen

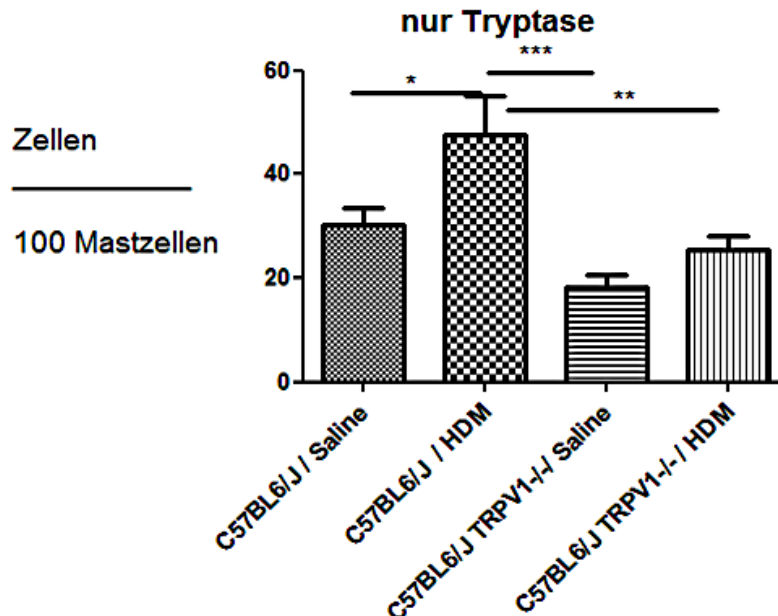


Diagramm 15 zeigt alle 4 Gruppen (A = C57BL6/J mit Salinen behandelt, B = C57BL6/J mit HDM behandelt, C = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup>, D = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit HDM behandelt). Es wurden alle Zellen aufgetragen nach Mastzellen / 100 Mastzellen, welche weder positiv markierbar für TRPA1 noch für Chymase waren.

Bezüglich der Gesamtzahl dieser Mastzellen zeigt sich ein signifikanter Anstieg bei den mit HDM behandelten Wildtyp-Mäusen im Vergleich zur entsprechenden Salin-Kontrollgruppe. (A: 30,27 ± 9,36 % vs B 47,72 ± 18,35, \*)

Ein signifikanter Unterschied zeigt sich ebenfalls zwischen den Wildtyp- und mit HDM behandelten Tieren und den TRPV1<sup>-/-</sup> - sowie mit Salinen behandelten Tieren.

(B 47,72 ± 18,35 % vs C 18,31 ± 6,35 %, \*\*\*)

Weiterhin ist eine deutlich erhöhte Zahl doppelt negativer Mastzellen zu beobachten bei mit HDM behandelten Wildtyp-Tieren verglichen mit TRPV1<sup>-/-</sup>, welche mit HDM behandelt wurden. (B 47,72 ± 18,35 % vs C 25,51 ± 6,64 %, \*)

### 5.6.5 Colokalisation von TRPA1 und TRPV1 auf Mastzellen

Abbildung 22 Isotypenkontrolle : C57BL6/J / Saline Tryptase+TRPV1+TRPA1

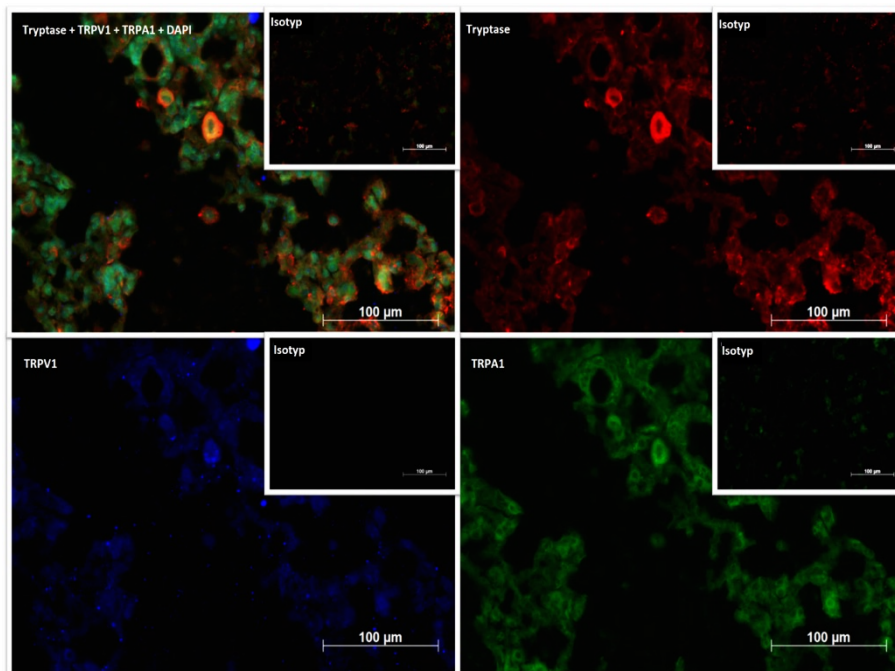


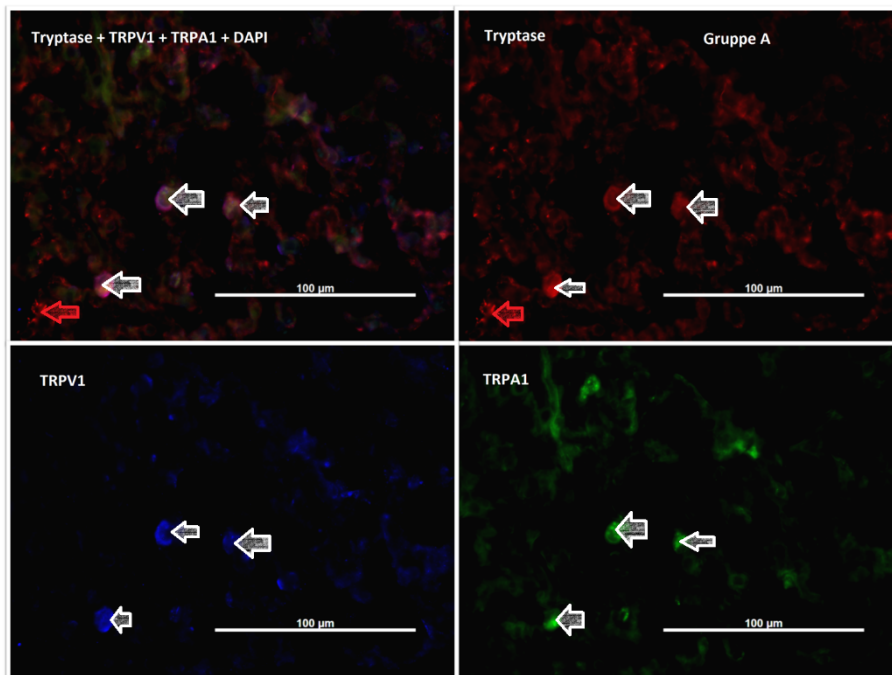
Abbildung 21 zeigt Bilder in 20x Vergrößerung der Färbung der Gruppe A. Rot leuchten die Tryptase-positiven Zellen, also Mastzellen, blau angefärbt wurde das Protein TRPV1 und grün der TRPA1-Rezeptor.

Dargestellt wurden sowohl jeder Kanal einzeln als auch alle miteinander und mit der Kernfärbung DAPI kombiniert.

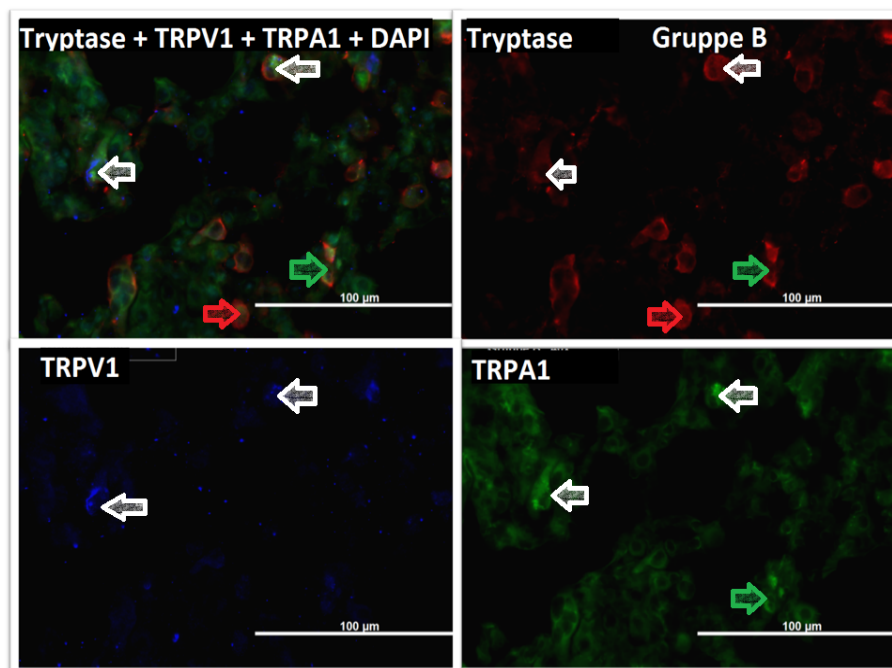
Man beachte, dass auf den Bildern der Gruppe A viele Zellen als positiv zu identifizieren sind, während dies bei der Isotypenkontrolle nicht der Fall ist, was ein Qualitätskriterium für die Färbung ist.



Abbildungung 23 C57BL6/J / Saline Tryptase+TRPV1+TRPA1



Abbildungung 24 C57BL6/J / HDM Tryptase+TRPV1+TRPA1



Abbildungen 23 und 24 zeigen Bilder der Färbung in 40x Vergrößerung. Mit Pfeilen wurden beispielhaft jeweils einzelne Mastzellen markiert. (weiß = positiv für Tryptase, TRPV1 und TRPA1; blau = positiv nur für Tryptase und TRPV1; grün = positiv nur für Tryptase und TRPA1, rot = TRPV1- und TRPA1-negative Mastzelle)

Diagramm 16 Übersicht Tryptase + TRPV1 + TRPA1 + DAPI

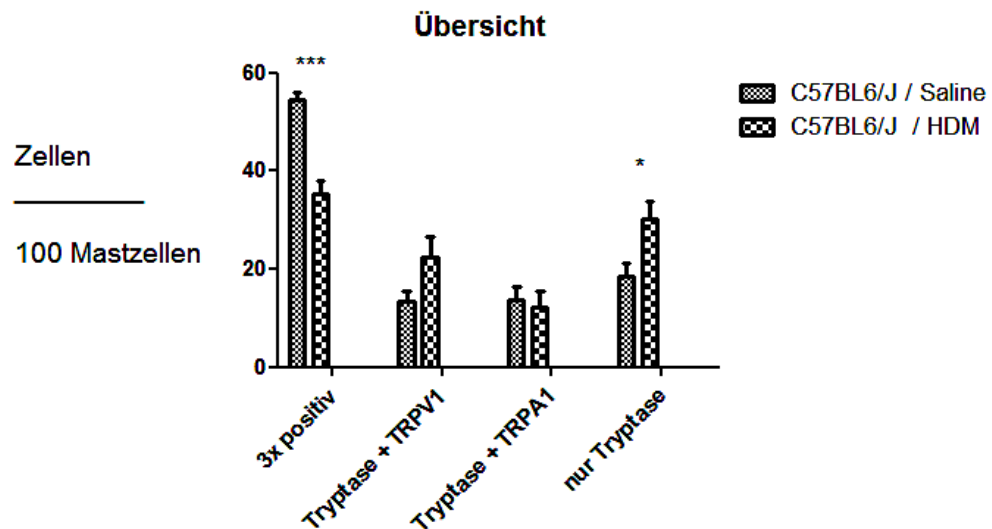


Diagramm 16 zeigt die 2 Wildtyp-Gruppen (A = C57BL6/J mit Salinen behandelt, B = C57BL6/J mit HDM behandelt), aufgeteilt nach jeweils exprimierten Proteinen (nur Tryptase, Tryptase + TRPV1, Tryptase + TRPA1, alle 3) aufgetragen nach Mastzellen / 100 Mastzellen.

Im Anschluss folgt die getrennte Darstellung zur besseren Übersichtlichkeit.

Diagramm 17 Prozentsatz TRPV1 und TRPA1 - positiver - Mastzellen

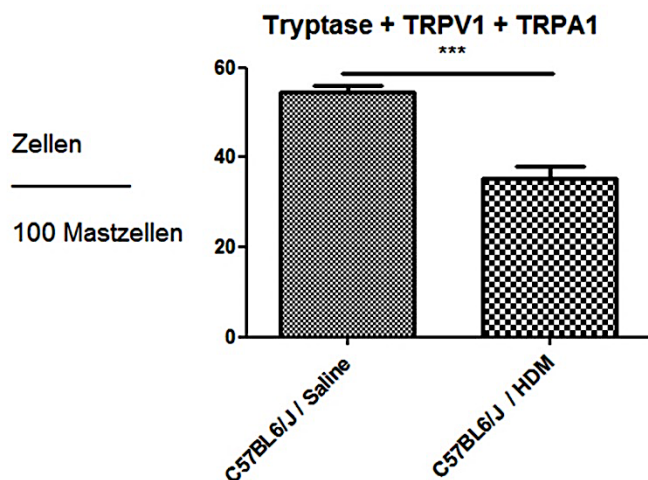
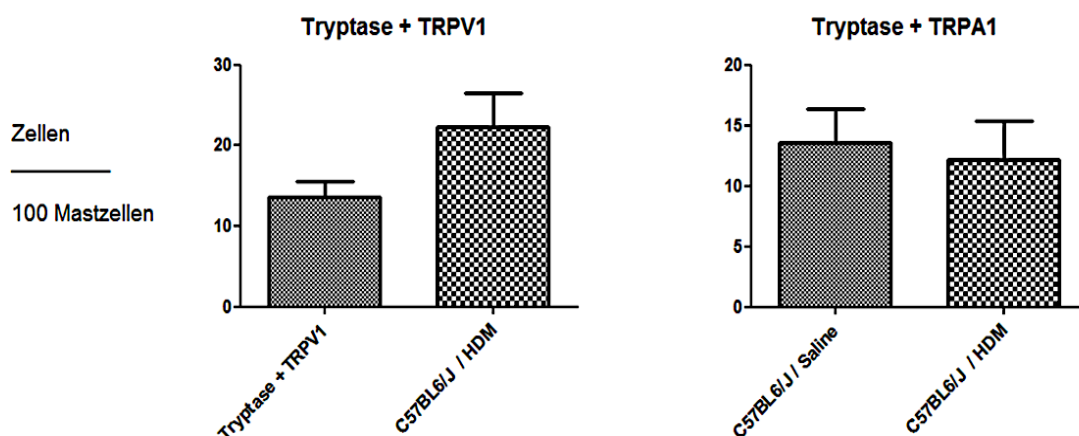


Diagramm 17 zeigt die 2 Wildtyp-Gruppen (A = C57BL6/J mit Salinen behandelt; B = C57BL6/J mit HDM behandelt). Im oberen Abschnitt wurden die Mastzellen aufgetragen nach Zellen / 100 Mastzellen, welche beide Rezeptoren gleichzeitig exprimierten.

Es zeigt sich ein signifikant ( $p < 0,0001$ ) verringertes Vorkommen von Zellen, welche die beiden Rezeptoren TRPA1 und TRPV1 colokalisiert exprimieren bei den mit HDM behandelten Tieren. (A:  $54,47 \pm 4,19$  % vs B:  $35,29 \pm 7,45$  %)

Diagramm 18 Prozentsatz einfach positiver Mastzellen (nur TRPA1 oder TRPV1)



Hier wurden die Mastzellen aufgetragen nach Zellen / 100 Mastzellen, welche jeweils nur einen der beiden Rezeptoren exprimierten

Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,07$ ) zwischen den Gruppen bezüglich der TRPV1-Expression. (A:  $13,54 \pm 5,55$  & vs B:  $22,36 \pm 10,96$ %).

Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,69$ ) zwischen den Gruppen bezüglich der TRPA1-Expression. (A:  $13,59 \pm 7,87$  % vs  $12,17 \pm 8,5$  %).

Diagramm 19 Prozentsatz TRPV1 , bzw. TRPA1 – positiver Mastzellen

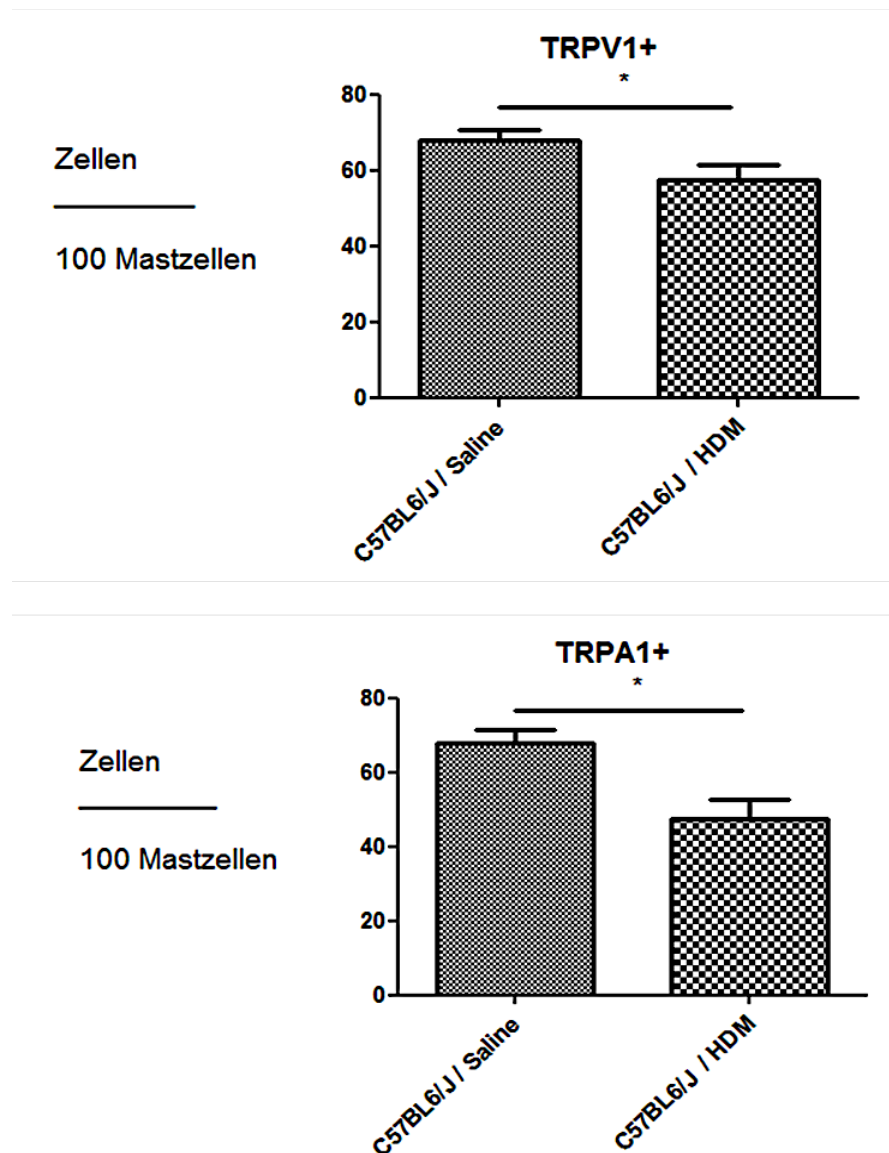


Diagramm 19 zeigt die 2 Wildtyp-Gruppen (A = C57BL6/J mit Salinen behandelt; B= C57BL6/J mit HDM behandelt). Aufgetragen wurde jeweils die Gesamtzahl TRPV1, bzw. TRPA1-exprimierender Mastzellen nach Zellen / 100 Mastzellen.

In dieser Färbung zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den NaCl und HDM-behandelten Tieren bezüglich der TRPV1-Expression.

(A:  $68,01 \pm 7,13$  % vs B:  $57,66 \pm 9,85$  %; \*)

Der zuvor beschriebene Effekt der verminderten TRPA1-Expression bei Asthma-Tieren konnte auch in dieser Färbung mit statistisch signifikantem Ergebnis reproduziert werden. (A:  $68,06 \pm 9,35$  % vs B:  $47,46 \pm 14,23$  %; \*)

### 5.6.6 Expression des hochaffinen Mastzellrezeptors in den verschiedenen Mastzellpopulationen

Abbildung 25 Isotypenkontrolle : C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> / HDM Tryptase + Chymase + FcεRI

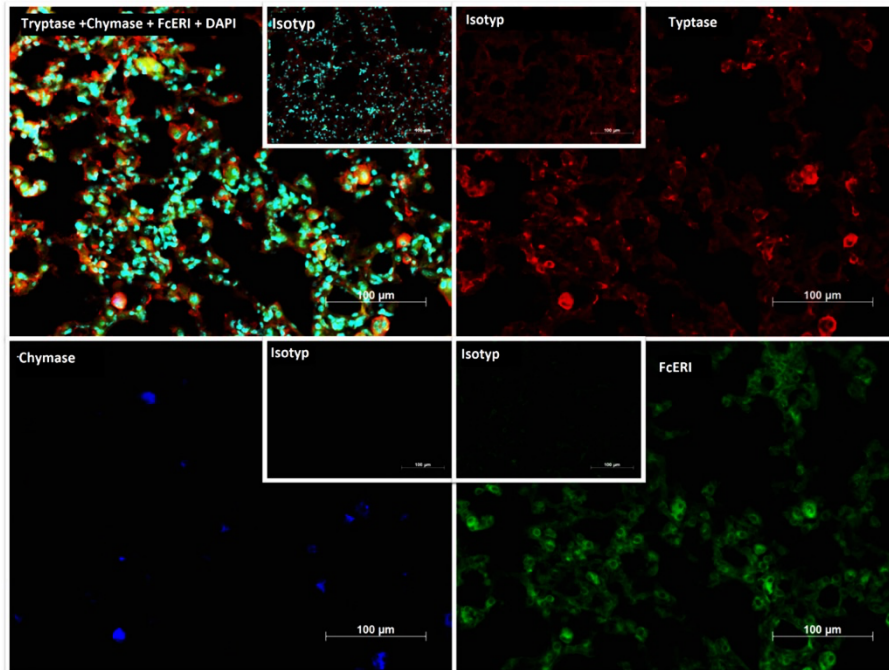
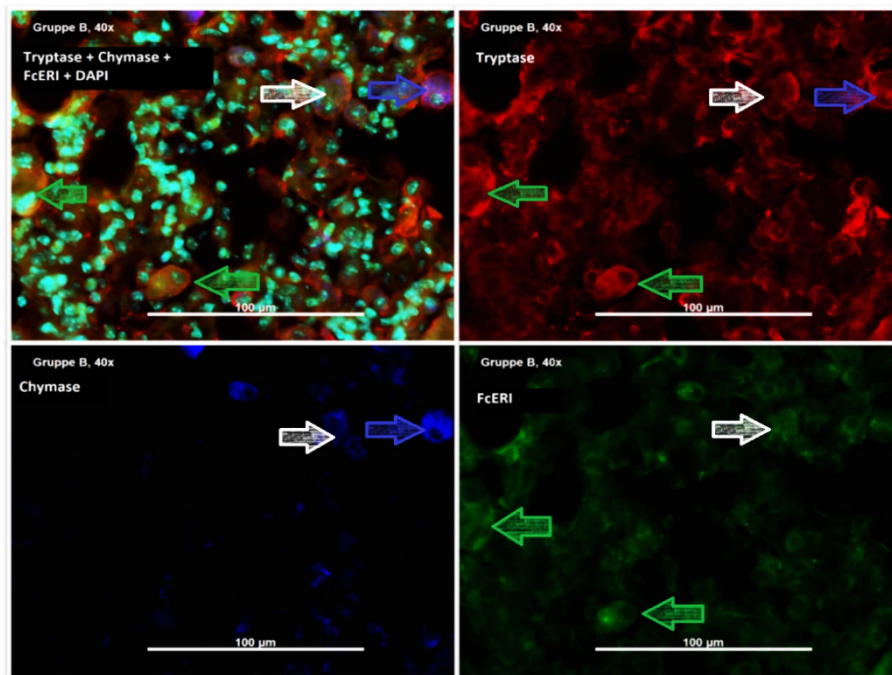


Abbildung 24 zeigt Bilder in 20x Vergrößerung der Färbung der Gruppe D. Rot leuchten die Tryptase-positiven Zellen, also Mastzellen, blau angefärbt wurde das Mastzellenchymase und grün der FcεRI-Rezeptor.

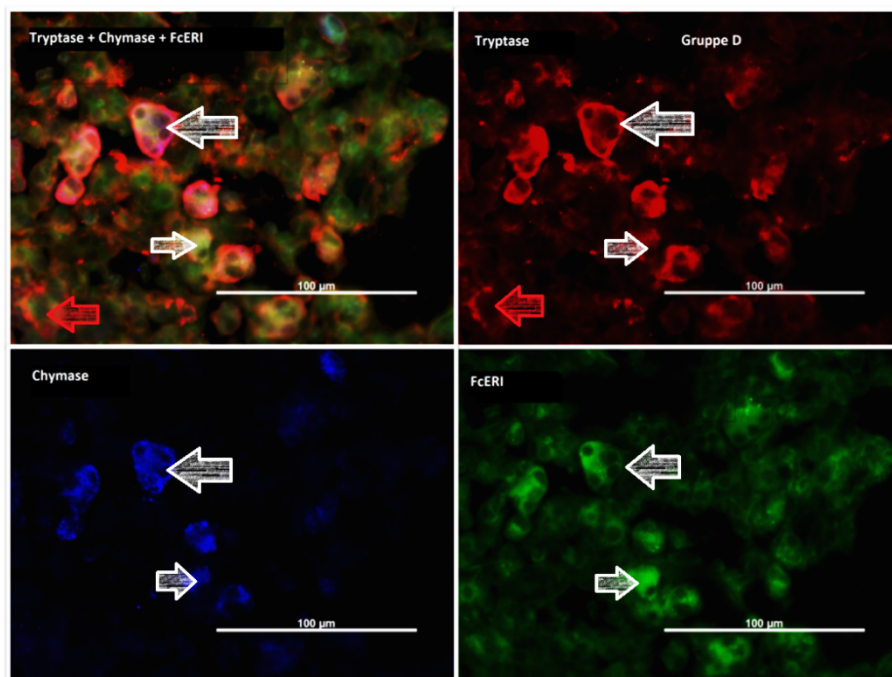
Dargestellt wurden sowohl jeder Kanal einzeln als auch alle miteinander und mit der Kernfärbung DAPI kombiniert.

Man beachte, dass auf den Bildern der Gruppen D viele Zellen als positiv zu identifizieren sind, während dies bei der Isotypenkontrolle nicht der Fall ist, was ein Qualitätskriterium für die Färbung darstellt.

Abbildungung 26 C57BL6/J / HDM Tryptase + Chymase + FcεRI



Abbildungung 27 C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> / HDM Tryptase + Chymase + FcεRI



Abbildungen 26 und 27 zeigen Bilder der gleichen Färbung in 40x Vergrößerung. Mit Pfeilen wurden beispielhaft jeweils einzelne Mastzellen markiert. (weiß = positiv für Tryptase, Chymase und FcεRI; blau = positiv nur für Tryptase und Chymase; grün = positiv nur für Tryptase und FcεRI; rot = Chymase- und FcεRI-negative Mastzelle)



Diagramm 20 Übersicht Tryptase + Chymase + FcεRI

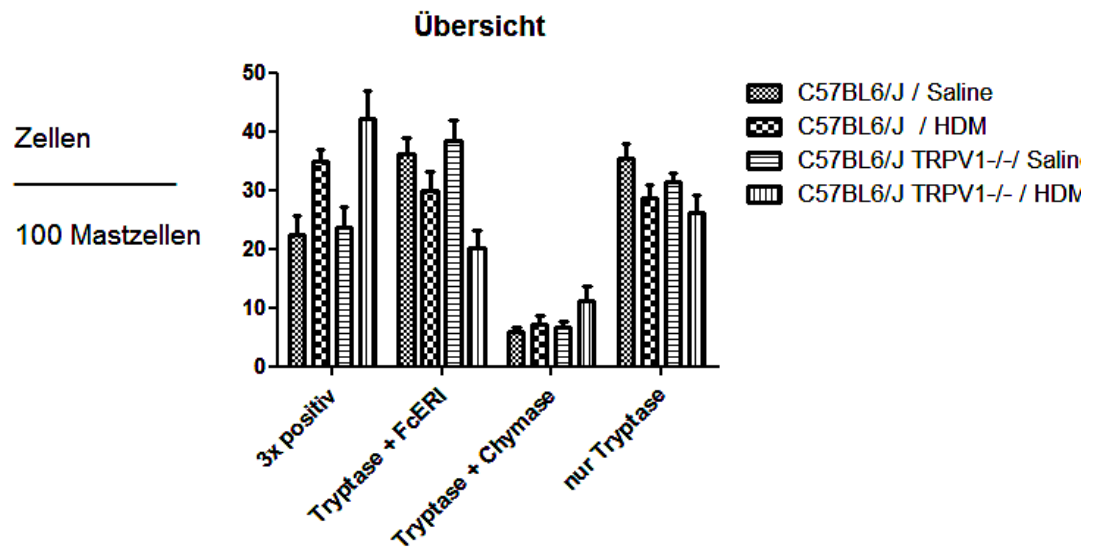


Diagramm 20 zeigt alle 4 Gruppen (A = C57BL6/J, mit Salinen behandelt; B = C57BL6/J mit HDM behandelt, C = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit Salinen behandelt, D = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit HDM behandelt), aufgeteilt nach jeweils exprimierten Proteinen (nur Tryptase, Tryptase + Chymase, Tryptase + FcεRI, alle 3) aufgetragen nach Zellen / 100 Mastzellen.

Im Anschluss folgt die getrennte Darstellung zur besseren Übersichtlichkeit.

Diagramm 21 Prozentsatz FcεRI-positiver Mastzellen

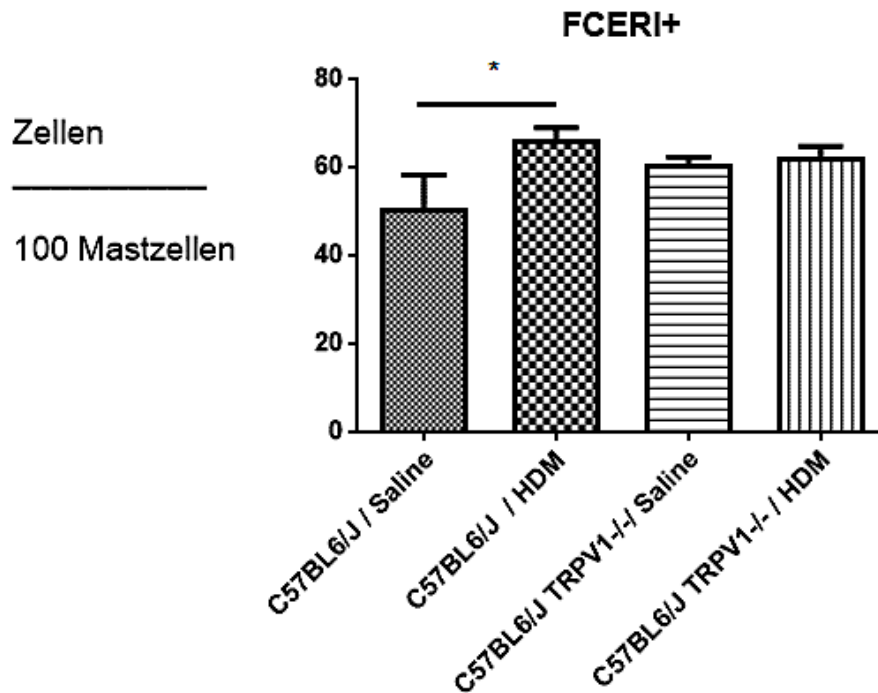


Diagramm 21 zeigt die 4 FcεRI-positiven Gruppen (A = C57BL6/J mit Salinen behandelt, B = C57BL6/J mit HDM behandelt, C = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit Salinen behandelt, D = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit HDM behandelt). Es wurden alle FcεRI-markierbaren Mastzellen aufgetragen nach Zellen / 100 Mastzellen.

Bezüglich der Gesamtzahl der exprimierten FcεRI-Rezeptoren zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen Gruppe A und B. (\*)

(A: 50,61 ± 21,54 %; B: 66,29 ± 6,93 %; C: 60,73 ± 4,21 %; D: 62,42 ± 5,55 %)



Diagramm 22 Vergleich der Mastzellpopulationen bezüglich FcεRI

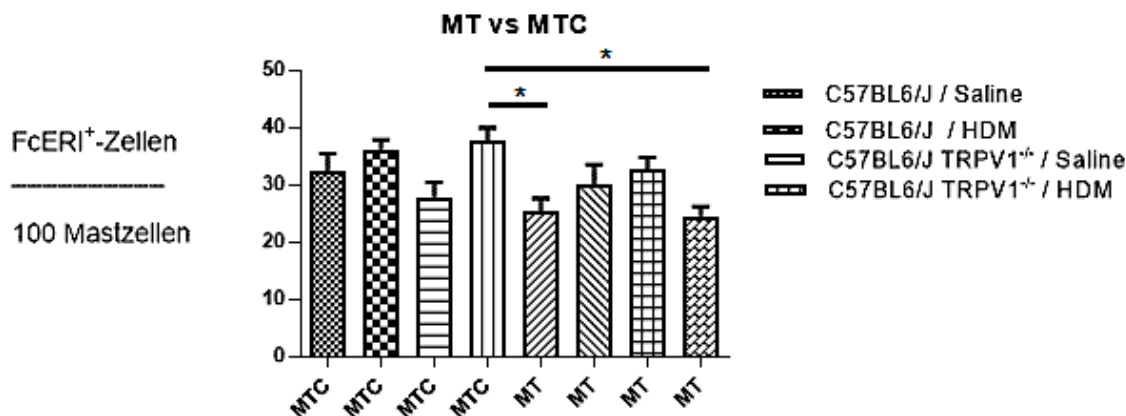


Diagramm 22 zeigt alle 4 Versuchsgruppen (A = C57BL6/J mit Salinen behandelt, B = C57BL6/J mit HDM behandelt, C = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit Salinen behandelt, D = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit HDM behandelt), aufgetragen nach FcεRI-positiven Mastzellen / 100 Mastzellen. Diese wurden weiter aufgeteilt in die beiden Populationen M<sub>TC</sub> (Tryptase + Chymase-positiv) und M<sub>T</sub> (nur Tryptase-positiv)

Innerhalb der beiden Populationen M<sub>T</sub> und M<sub>TC</sub> zeigt sich kein signifikanter Unterschied.

(M<sub>TC</sub>: A: 32,46 ± 8,16 %; B: 36,23 ± 4,5%; C: 27,97 ± 7,28 %; D: 37,77 ± 5,59 %)

(M<sub>T</sub>: A: 25,38 ± 6,09 %; B: 30,05 ± 9,49 %; C: 32,76 ± 6 %; D: 24,65 ± 3,92%)

Zwischen den beiden Populationen besteht ein signifikanter Unterschied bei Betrachtung der Gruppe D der Population M<sub>TC</sub> sowie den Gruppen A (\*) und D (\*) der Population M<sub>T</sub>.

### 5.6.7 Colokalisation von TRPV1 und FcεRI auf Mastzellen

Abbildung 28 Isotypenkontrolle : C57BL6/J / Saline Tryptase + TRPV1 + FcεRI

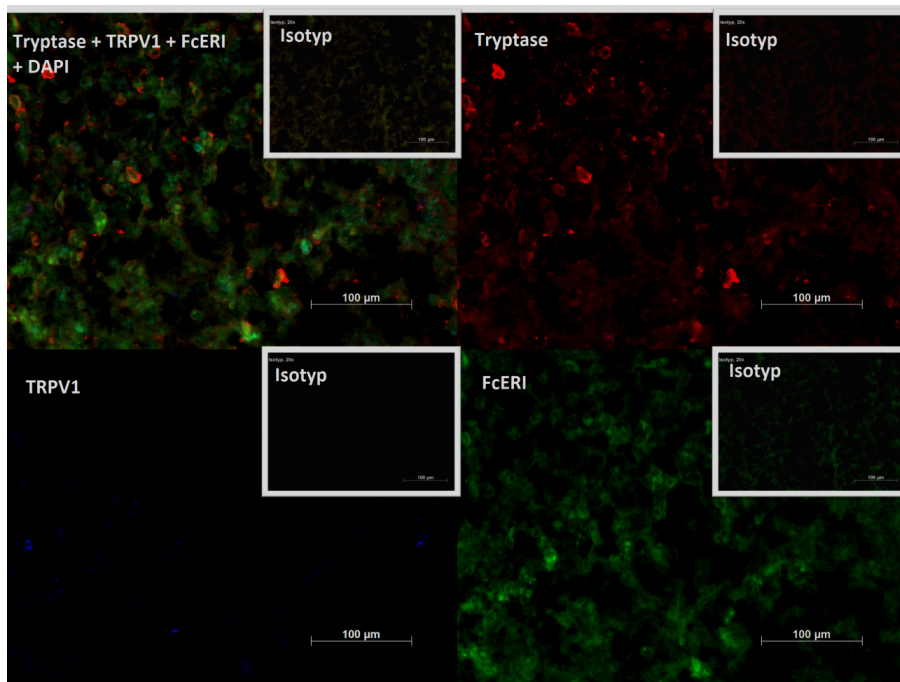


Abbildung 28 zeigt Bilder in 20x Vergrößerung der Färbung der Gruppe A. Rot leuchten die Tryptase-positiven Zellen, also Mastzellen, blau angefärbt wurde das Protein TRPV1 und grün der FcεRI-Rezeptor.

Dargestellt wurden sowohl jeder Kanal einzeln als auch alle miteinander und mit der Kernfärbung DAPI kombiniert.

Man beachte, dass auf den Bildern der Gruppe A viele Zellen als positiv zu identifizieren sind, während dies bei der Isotypenkontrolle nicht der Fall ist, was ein Qualitätskriterium für die Färbung ist.

Abbildung 29 C57BL6/J / Saline Tryptase+TRPV1+ FcεRI

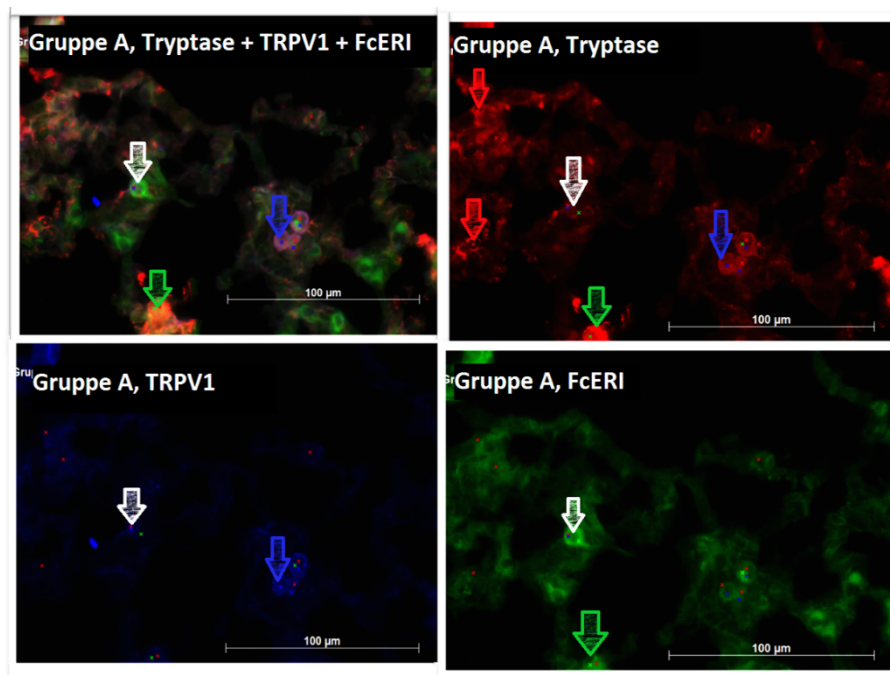
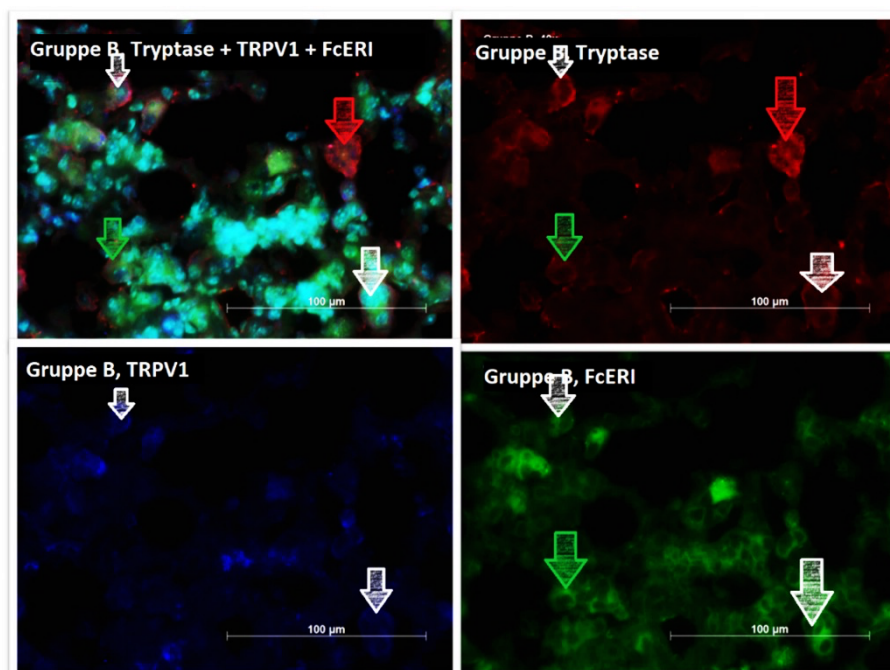


Abbildung 30 C57BL6/J / HDM Tryptase+TRPV1+ FcεRI



Abbildungen 29 und 30 zeigen Bilder der Färbung in 40x Vergrößerung. Mit Pfeilen wurden beispielhaft jeweils einzelne Mastzellen markiert (weiß = positiv für Tryptase, TRPV1 und FcεRI; blau = positiv nur für Tryptase und TRPV1; grün = positiv nur für Tryptase und FcεRI, rot = TRPV1- und FcεRI-negative Mastzelle).

Diagramm 23 Übersicht Tryptase + TRPV1 + FcεRI + DAPI

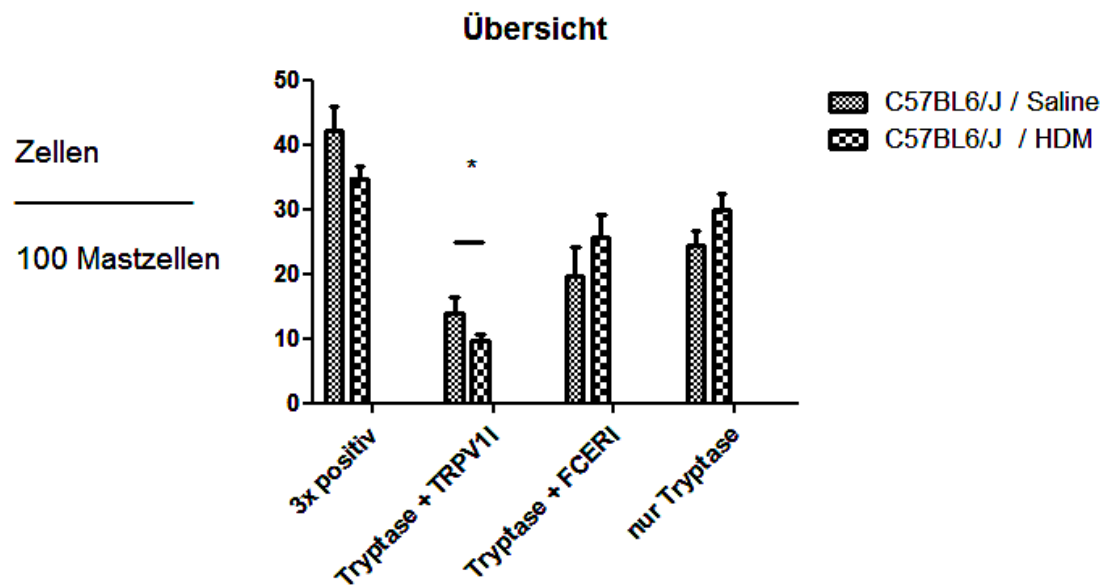


Diagramm 23 zeigt die 2 Wildtyp-Gruppen (A = C57BL6/J / NaCl, B = C57BL6/J mit HDM behandelt), aufgeteilt nach jeweils exprimierten Proteinen (nur Tryptase, Tryptase + FcεRI, Tryptase + TRPV1, alle 3) aufgetragen nach Zellen / 100 Mastzellen.

Im Anschluss folgt die getrennte Darstellung zur besseren Übersichtlichkeit.

Diagramm 24 Prozentsatz doppelt und einfach positiver Mastzellen für TRPV1 / FcεRI

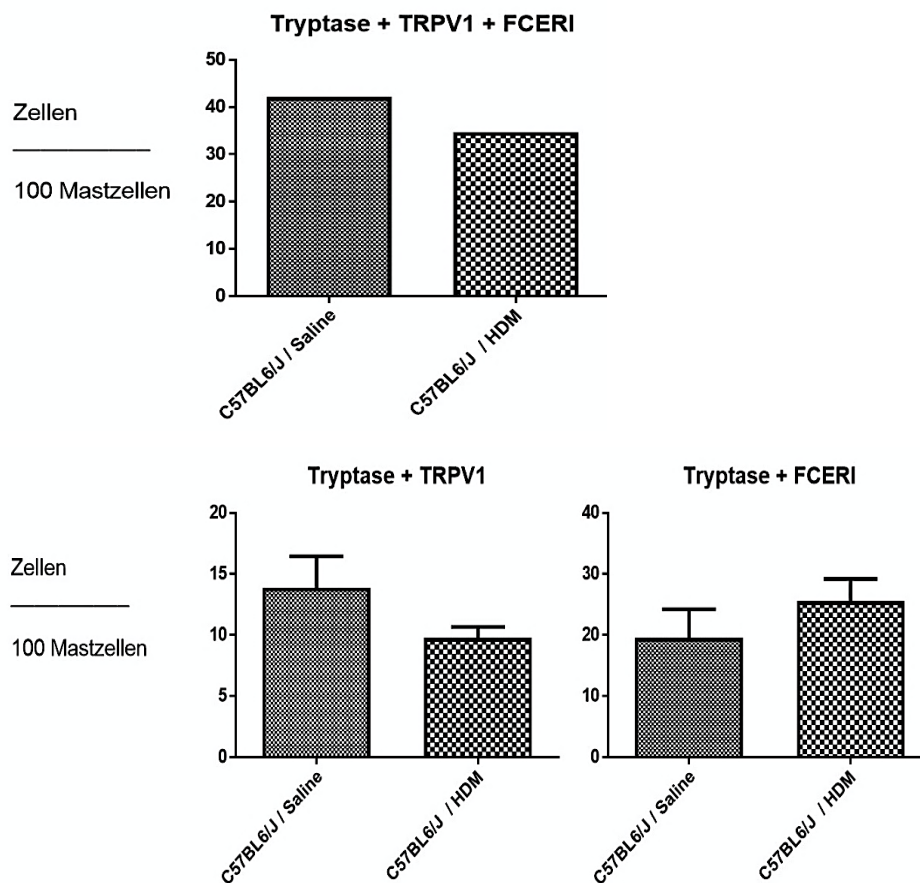


Diagramm 24 zeigt die 2 Wildtyp-Gruppen (A = C57BL6/J mit Salinen behandelt, B = C57BL6/J mit HDM behandelt). Im oberen Abschnitt wurden Zellen aufgetragen nach Zellen / 100 Mastzellen, welche beide Rezeptoren exprimierten. Im unteren Abschnitt wurden die Zellen aufgetragen nach Zellen / 100 Mastzellen, welche jeweils nur einen der beiden Rezeptoren exprimierten.

Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied ( $p=0,15$ ) zwischen den Gruppen bezüglich der Colokalisation der Rezeptoren. (A:  $42.16 \pm 10.94\%$  vs B:  $34.78 \pm 4.82\%$ )

Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied ( $p=0,21$ ) zwischen den Gruppen bezüglich der TRPV1-Expression. (A:  $13.88 \pm 7.25\%$  vs B:  $9.776 \pm 2.19\%$ ).

Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied ( $p=0,36$  für FcεRI) zwischen den Gruppen bezüglich der FcεRI-Expression. (A:  $19.56 \pm 13.26\%$  vs B:  $25.57 \pm 8.86\%$ ).

Diagramm 25 Prozentsatz TRPV1 / FcεRI - positiver Mastzellen

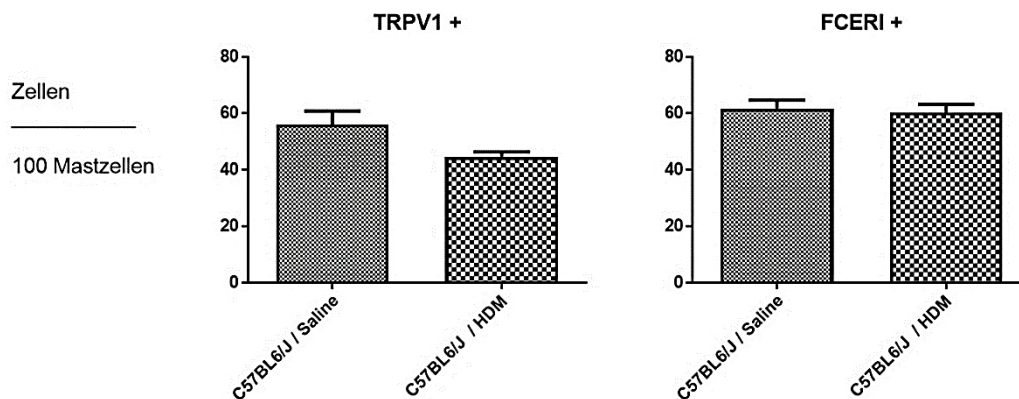


Diagramm 25 zeigt die 2 Wildtyp-Gruppen (A = C57BL6/J mit Salinen behandelt, B = C57BL6/J mit HDM behandelt). Aufgetragen ist jeweils die Gesamtzahl TRPV1-, bzw. FcεRI-exprimierender Mastzellen nach Zellen / 100 Mastzellen.

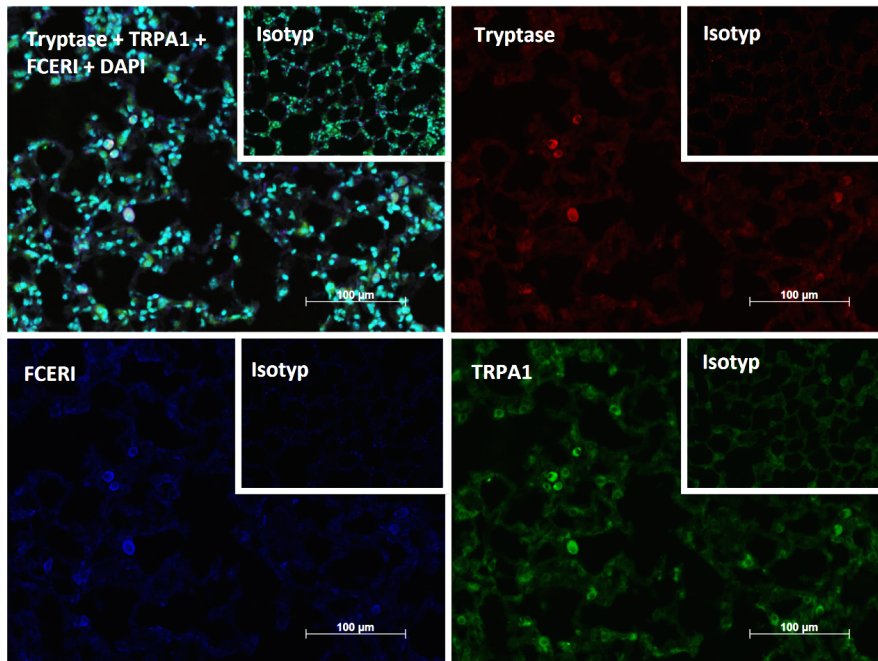
Auch in dieser Färbung zeigt sich kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,07$ ) zwischen den NaCl- und HDM-behandelten Tieren bezüglich der TRPV1-Expression. (A:  $56.03 \pm 13,49$  % vs B:  $44.55 \pm 4,42$  %)

Es besteht kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,75$ ) zwischen den NaCl- und HDM-behandelten Tieren bezüglich der Expression des FcεRI-Rezeptors.

(A:  $61.72 \pm 8,3$  % vs B:  $60,35 \pm 6,96$  %)

### 5.6.8 Colokalisation von TRPA1 und FcεRI auf Mastzellen

Abbildungung 31 Isotypenkontrolle : C57BL6/J / Saline Tryptase + FcεRI + TRPA1



Abbildungung 31 zeigt Bilder in 20x Vergrößerung der Färbung der Gruppe A. Rot leuchtend die Tryptase-positiven Zellen, also Mastzellen, blau angefärbt wurde der hochaffine Mastzellrezeptor FcεRI und grün der TRPA1-Rezeptor.

Dargestellt wurden sowohl jeder Kanal einzeln als auch alle miteinander und mit der Kernfärbung DAPI kombiniert.

Man beachte, dass auf den Bildern der Gruppen A viele Zellen als positiv zu identifizieren sind, während dies bei der Isotypenkontrolle nicht der Fall ist, was ein Qualitätskriterium für die Färbung darstellt.



Abbildung 32 C57BL6/J / Saline Tryptase + FcεRI + TRPA1

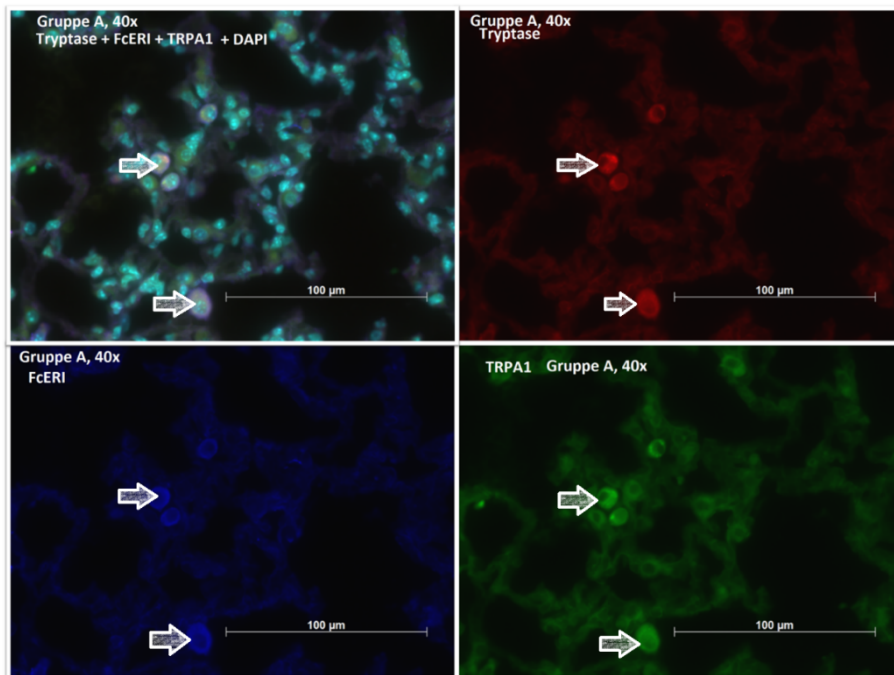
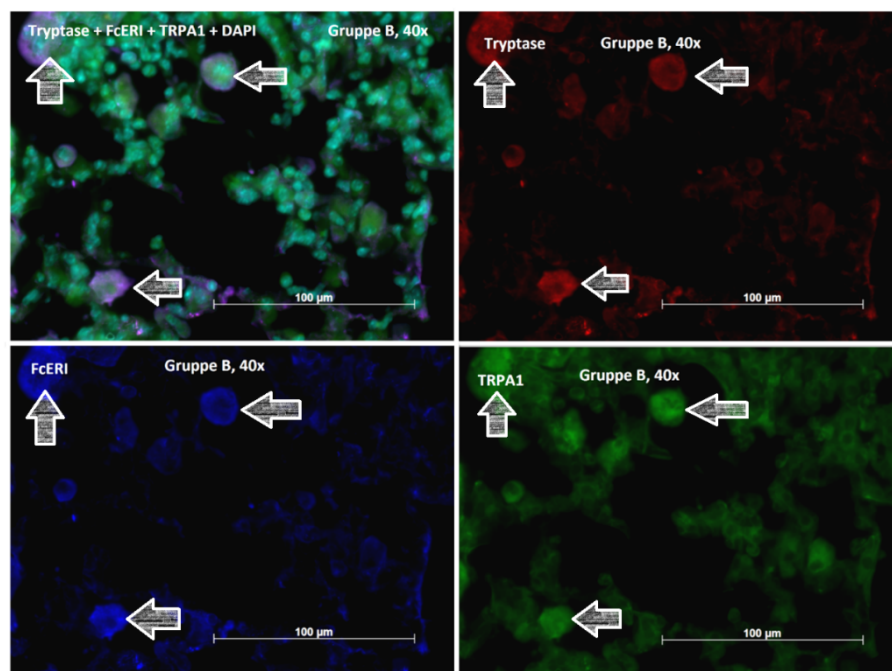
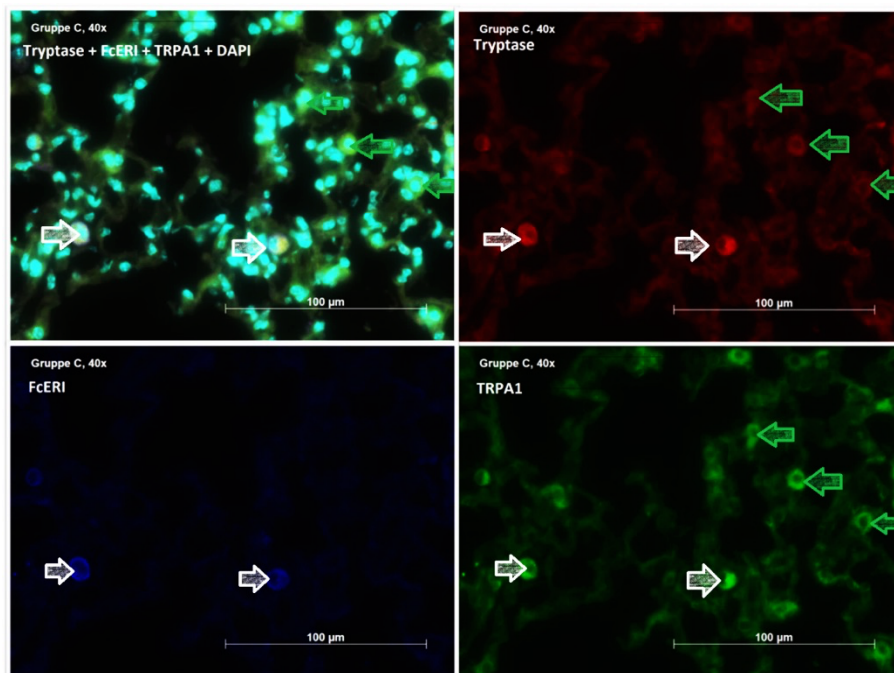
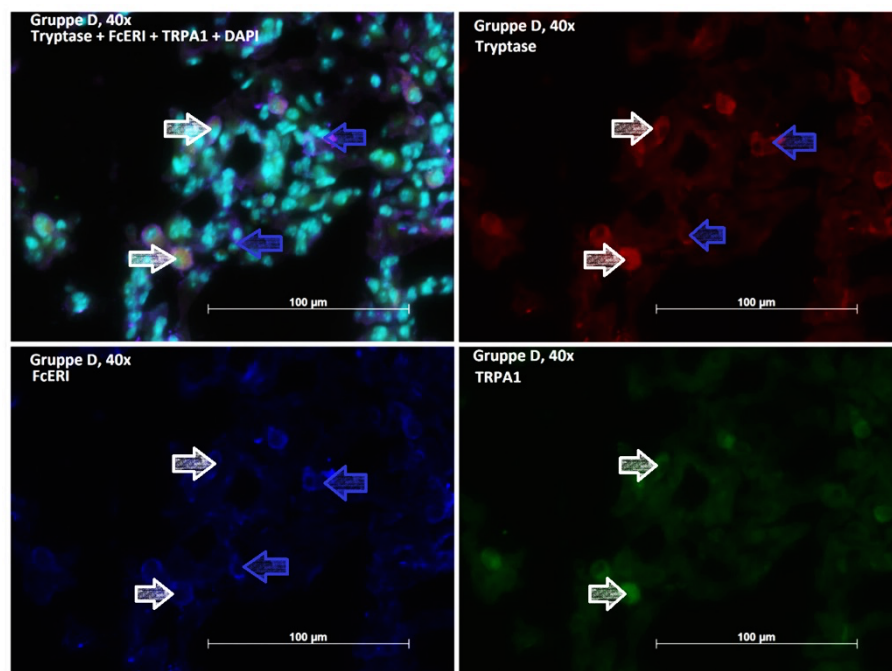


Abbildung 33 C57BL6/J / HDM Tryptase + FcεRI + TRPA1





Abbildungung 34 C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> / Saline Tryptase + FcεRI + TRPA1Abbildungung 35 C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> / HDM Tryptase + FcεRI + TRPA1

Abbildungen 32-35 zeigen Bilder der gleichen Färbung in 40x Vergrößerung.

Diagramm 26 Übersicht Tryptase + TRPA1 + FcεRI + DAPI

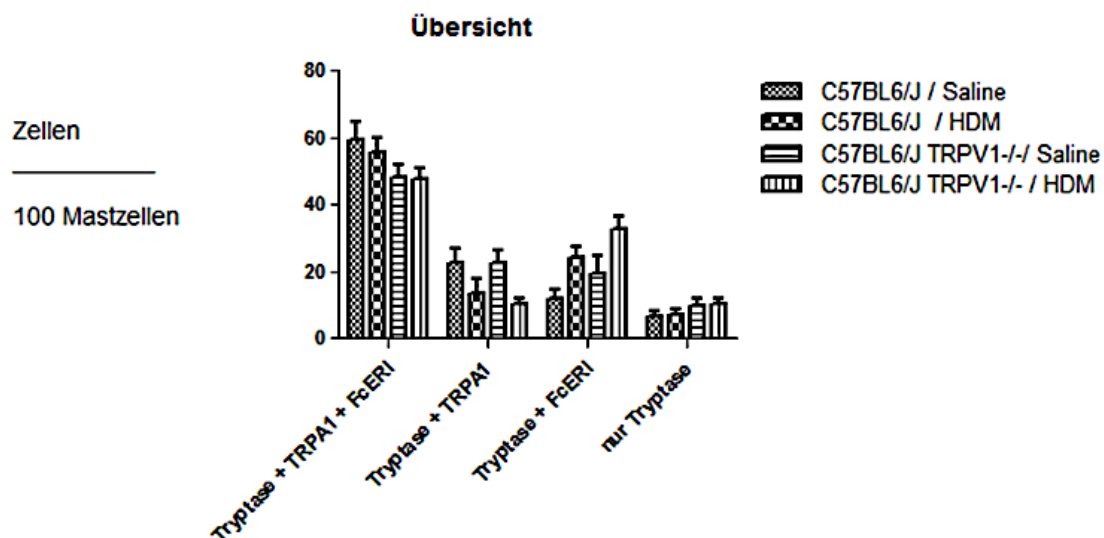


Diagramm 26 zeigt alle 4 Versuchsgruppen (A = C57BL6/J mit Salinen behandelt, B = C57BL6/J mit HDM behandelt, C = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit Salinen behandelt, D = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit HDM behandelt), aufgeteilt nach jeweils exprimierten Proteinen (nur Tryptase, Tryptase + TRPA1, Tryptase + FcεRI, alle 3) aufgetragen nach Zellen / 100 Mastzellen.

Im Anschluss folgt die getrennte Darstellung zur besseren Übersichtlichkeit.

Diagramm 27 Prozentsatz doppelt (für TRPA1 und FcεRI) positiver Mastzellen

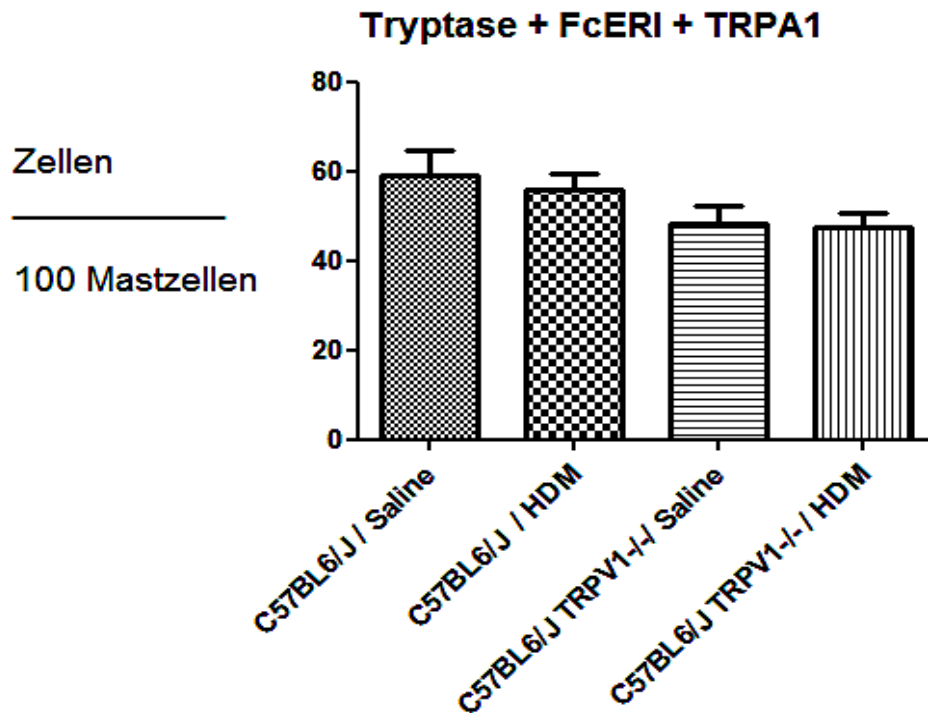


Diagramm 27 zeigt die 4 Gruppen (A = C57BL6/J mit Salinen behandelt, B = C57BL6/J mit HDM behandelt, C = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit Salinen behandelt, D = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit HDM behandelt). Es wurden alle Zellen aufgetragen nach Zellen / 100 Mastzellen, die beide Rezeptoren coexprimieren. Auf dem 5%-Niveau zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen.

(A: 59,21 ± 15,60 %; B: 55,69 ± 10,47 %; C: 48,35 ± 9,88 %; D: 47,32 ± 7,76 %)

Diagramm 28 Prozentsatz einfach positiver Mastzellen (entweder TRPA1 oder FcεRI)

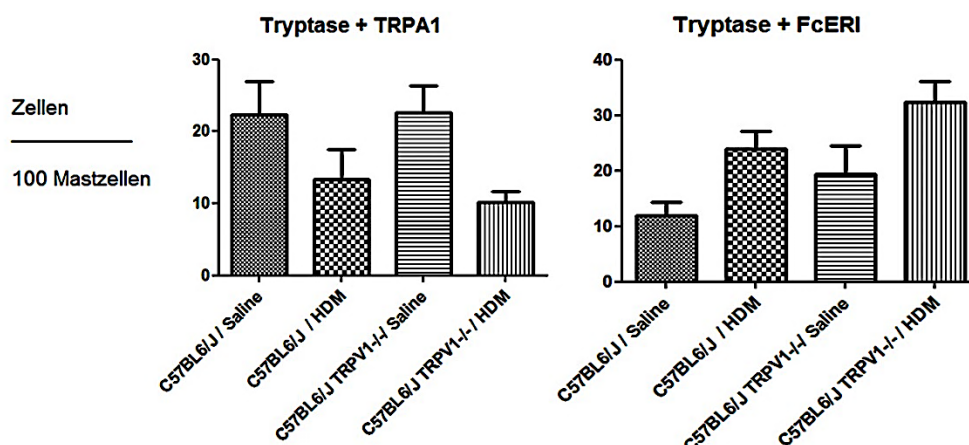


Diagramm 28 zeigt die 4 Versuchsgruppen (A = C57BL6/J mit Salinen behandelt, B = C57BL6/J mit HDM behandelt, C = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit Salinen behandelt, D = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit HDM behandelt). Es wurden alle Zellen aufgetragen nach Zellen / 100 Mastzellen, die jeweils nur einen der Rezeptoren TRPA1, bzw. FcεRI exprimieren. Auf dem 5%-Niveau zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

(A: 22,28 ± 13,4 %; B: 13,29 ± 11,27 %; C: 22,54 ± 9,92 %; D: 10,15 ± 3,19 % für TRPA1)

(A: 11,85 ± 7,29 %; B: 24,00 ± 8,31 %; C: 19,31 ± 13,63 %; D: 32,42 ± 8,51 % für FcεRI)

Diagramm 29 Prozentsatz doppelt (für TRPA1 und FcεRI) negativer Mastzellen

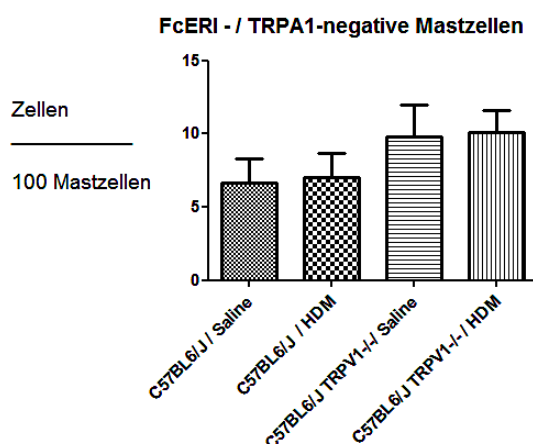


Diagramm 29 zeigt die 4 Gruppen (A = C57BL6/J mit Salinen behandelt, B = C57BL6/J mit HDM behandelt, C = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit Salinen behandelt, D = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit HDM behandelt). Es wurden alle Zellen aufgetragen nach Zellen / 100 Mastzellen, die weder TRPA1 noch FcεRI exprimieren. Auf dem 5%-Niveau zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen.

Diagramm 30 Prozentsatz TRPA1-positiver Mastzellen

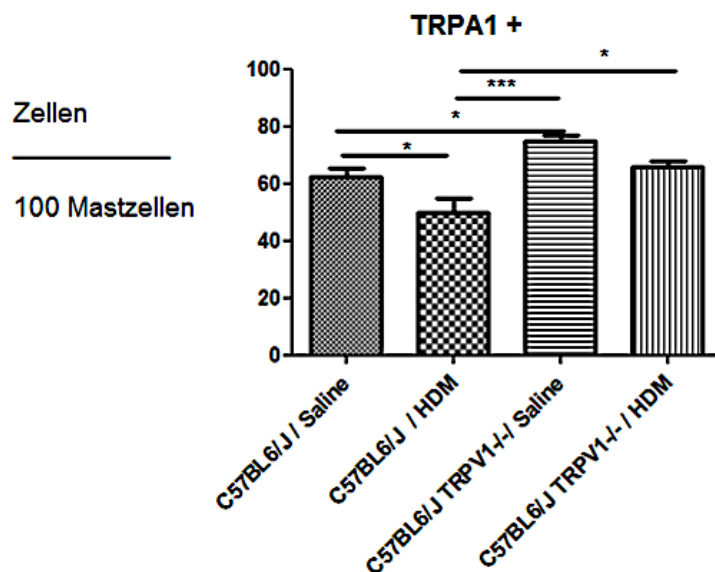


Diagramm 30 zeigt die 4 Gruppen (A = C57BL6/J mit Salinen behandelt, B = C57BL6/J mit HDM behandelt, C = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit Salinen behandelt, D = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit HDM behandelt). Es wurden alle Zellen aufgetragen nach Zellen / 100 Mastzellen, die TRPA1 exprimieren.

Bezüglich der Gesamtzahl der exprimierten TRPA1-Rezeptoren zeigt sich ein signifikanter Abfall bei den Wildtyp- und mit HDM behandelten Tieren im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe. (A:  $62,58 \pm 7,94$  vs B:  $49,95 \pm 11,7$ ; \*)

Dieser Abfall ist auch bei den TRPV1<sup>-/-</sup> Tieren zu verzeichnen, befindet sich aber nicht im statistisch signifikanten Bereich. (C vs D  $p > 0,05$ )

Ein signifikanter Anstieg zeigt sich bei den TRPV1<sup>-/-</sup> Tieren im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe. (A:  $62,58 \pm 7,94$ ; B:  $49,95 \pm 11,7$ ; C:  $74,61 \pm 6,03$ ; D:  $65,94 \pm 4,22$ ; A vs C \*, B vs C \*\*\*, B vs D\*)

Zwischen Gruppe A und Gruppe D lässt sich auf dem 5%-Niveau kein signifikanter Unterschied feststellen. (A:  $62,58 \pm 7,94$  vs D:  $65,94 \pm 4,22$ ,  $p > 0,05$ )

Diagramm 31 Prozentsatz FcεRI -positiver Mastzellen

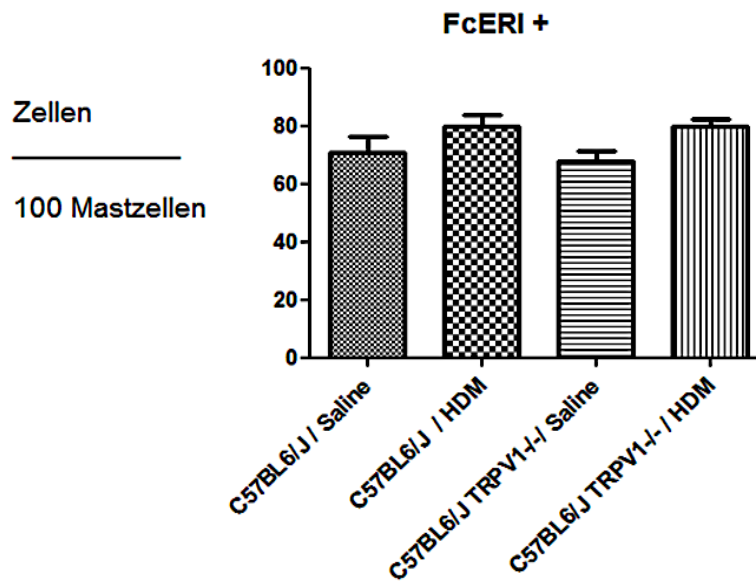


Diagramm 31 zeigt die 4 Gruppen (A = C57BL6/J mit Salinen behandelt, B = C57BL6/J mit HDM behandelt, C = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit Salinen behandelt, D = C57BL6/J TRPV1<sup>-/-</sup> mit HDM behandelt). Es wurden alle Zellen aufgetragen nach Zellen / 100 Mastzellen, die FcεRI exprimieren.

Auf dem 5%-Niveau zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen.

(A: 71,07 ± 14,96; B: 79,69 ± 11,50; C: 67,67 ± 10,33; D: 79,74 ± 5,89)

## 6 Diskussion

### 6.1 Kritische Betrachtung des Studiendesigns

Mit der Gattung C57BL6/J standen homozygote TRPV1-Knockout-Mäuse aus kongenitaler Inzucht und eine entsprechende Wildtyp-Kontrollgruppe zur Verfügung. [5,42,130] Die Wahl der Kontrollgruppe der gleichen Gattung diente unter anderem der Minimierung genetischer Variationen zwischen den einzelnen Gruppen auf die Studienergebnisse. C57BL6/J ist einer der am besten charakterisierten und meistbenutzten Stämme weltweit und insbesondere dafür bekannt, aggressiver und lärm- und geruchsempfindlicher zu sein, als beispielsweise die Artgenossen der Gattung BALB/c. [58,61,185]

Spontan entwickeln Mäuse kein Asthma, was bedeutet, dass man es bei ihnen auslösen muss, um verlässliche und auf den Menschen übertragbare Studien durchzuführen. [179] Dazu existieren verschiedene Substanzen und Protokolle, unter anderem das OVA-Modell. Hierbei wird den Mäusen ein Hühnereiprotein (Ovalbumin), oft im Abstand von 0, 7 und 14 Tagen, in die Bauchhöhle injiziert. An den Tagen 21- 23 wird das gleiche Protein intranasal appliziert. [222] Dies führt zu erhöhten IgE-Werten, einer lokalen Inflammation der Lungen und signifikanten Veränderungen der BAL. [222]

Das OVA-Protein wird üblicherweise mit Adjuvantien wie beispielsweise Aluminiumhydroxid (welches historisch auch als Adjuvans in Impfungen genutzt wurde) gemeinsam injiziert, um eine bessere T-Helferzell-2-Antwort zu erreichen, welche, wie in der Einleitung bereits ausgeführt, eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des Asthmas einnimmt. [37,193] Dabei scheint die induzierte Antwort aber nicht abhängig zu sein von Mastzellen oder Makrophagen. So konnte kein Unterschied gezeigt werden bezüglich der Induktion CD4- und CD8-positiver Zellen zwischen Wildtypmäusen und Mäusen, in welchen der Mastzell- bzw. Makrophagen-Signalweg ausgeschaltet wurde. [165]

Während die Vorteile des OVA-Modells die relativ kostengünstige Durchführung und seine in vielen Studien untermauerte Wirksamkeit sind, lässt insbesondere der von Mastzellen scheinbar unabhängige Wirkungsmechanismus dieses Modell für die Vorliegende Arbeit ungeeignet erscheinen. [63,66,102,265]

Im HDM-Mausmodell werden die Tiere ausschließlich intranasal mit Hausstaubmilben-Extrakt behandelt, was nicht nur weniger invasiv und für die Mäuse damit stressfreier ist, sondern auch dem menschlichen Asthma-Mechanismus näher zu kommen scheint. So enthält das Extrakt der Gattung *Dermatophagoides pteronyssinus* verschiedene Antigene, welche weltweit zu den häufigsten Auslösern allergischen Asthmas zählen. [67,179]

Insbesondere in Bezug auf die vorliegende Arbeit war weiterhin eine vermehrte Mastzellzahl in der Lunge nach Behandlung mit HDM-Extrakt relevant. [154,203] In mit HDM-Extrakt behandelten, Mastzell-defizienten Mäusen konnte zudem eine statistisch signifikant verringerte Anzahl an Entzündungszellen in der BAL im Vergleich zu Wildtypmäusen und normwertige IgE-Plasma-Level nachgewiesen werden. Dies spricht für eine wichtige Rolle der Mastzellen in der Pathogenese des HDM-induzierten Asthmas. [64]

Nichtsdestotrotz bleibt selbst das beste Modell nur das: ein Modell. Da sich aber entsprechende Experimente an menschlichen Probanden aus naheliegenden ethischen Gründen verbieten, soll in diesem Kapitel auf die wesentlichen Unterschiede zwischen dem Asthma der Maus und des Menschen eingegangen werden und mögliche Fehlerquellen bei der Übertragung von der Maus auf den Menschen beleuchtet werden.

Es konnte gezeigt werden, dass bei zeitlich eng gefassten Protokollen des OVA-Mausmodells das Airway-remodeling nicht in gleichem Ausmaß stattfindet wie bei Personen, die jahrelang unter ihrem Asthma leiden und nach Beendigung der Antigenexposition eines der Kardinalsymptome des Asthmas, die bronchiale Hyperreagibilität, wieder zurückgebildet wird. Ähnlich auch mit der eosinophilen Entzündung, welche merklich abnimmt, auch wenn sie nach wie vor über dem Ausgangsniveau liegt. [156,166]

Relativierend muss hierzu gesagt werden, dass in OVA-basierten Protokollen, in welchen die Mäuse über einen längeren Zeitpunkt sensibilisiert und ihrem Antigen exponiert wurden, eine Persistenz des Remodelings festgestellt werden konnte. Aber auch in diesen Modellen war eine abnehmende AHR und Inflammation ohne weitere Antigenexposition zu beobachten. [145,152,166] Dagegen scheint es im HDM-Mausmodell zu einer Persistenz der eosinophilen Entzündung und der AHR zu kommen. [193]

Darüber hinaus konnten in HDM-basierten Mausmodellen deutlich höhere IgE-Level des Blutes demonstriert werden. Außerdem verstärkt im Lungengewebe zu finden in diesem Modell sind verschiedene Interleukine (IL-6, 13, 17) sowie IFN- $\gamma$ , was insgesamt eine bessere Wirksamkeit des Protokolls wahrscheinlich erscheinen lässt. [32]

Weiterhin scheint die Inflammation in Menschenlungen hauptsächlich im Epithel lokalisiert, während das Epithel der Maus nicht in gleicher Weise betroffen zu sein scheint und ebenfalls das Lungenparenchym und die umliegenden Gefäße betrifft. [84,111,150,179,187]



## **6.2 Interpretation der Ergebnisse und Vergleich mit ähnlichen Studien**

### **6.2.1 Bronchoalveoläre Lavage (BAL)**

Der in dieser Arbeit beschriebene signifikante Anstieg der Mittelwerte der Gesamtzellzahlen im Vergleich zu den Kontrollgruppen A und C um ca. den Faktor 7 pro ml BAL in den mit HDM behandelten Gruppen (Gruppe B und D) wird durch verschiedene bereits veröffentlichte Studien bestätigt. [34,50,199] Eine Studie der Arbeitsgruppe Dinh beschreibt dagegen noch deutlich höhere Gesamtzellzahlen. [203]

Auch bezüglich der Mittelwerte der Eosinophilenzahlen pro ml BAL findet sich in den mit HDM behandelten Gruppen (Gruppe B und D) ein signifikanter Anstieg im Vergleich zu den Kontrollgruppen A und C um mindestens den Faktor 50, maximal um den Faktor 400.

Dies deckt sich mit den Beobachtungen der bereits zitierten Studien [34,199,203] und konnte ebenfalls an menschlichen, erwachsenen Patienten [210,245] und Kindern bestätigt werden. [83]

Botelho und Schmit konnten ebenfalls eine Vermehrung von Neutrophilen und Lymphozyten in der BAL feststellen. [34,203] Bezüglich der Makrophagen-, Neutrophilen- und Lymphozytenzahl konnte in dieser Arbeit kein signifikanter Unterschied beschrieben werden, wobei die beiden letzteren vermehrt erscheinen, dabei aber keine statistische Signifikanz erreichen. Dies war ebenfalls der Fall in einigen zuvor veröffentlichten Studien, in denen beinahe durchgehend die Ergebnisse bezüglich der Eosinophilen-Zahl bestätigt werden konnte, aber nur in wenigen Fällen für Neutrophile und Lymphozyten. [51,210] In OVA-Mausmodellen konnte bereits gezeigt werden, dass BALB/c-Mäuse wie in den oben genannten Studien von Schmit und Botelho benutzt, eine verstärkte AHR und höhere Mastzellzahlen im Lungengewebe demonstrieren, während bei der Gattung C57BL6/J der vorliegenden Arbeit höhere Eosinophilenzahlen- und Neutrophilenzahlen in der BAL nachweisbar sind. [101,115] Denkbar ist daher, dass die hohe Zahl an Eosinophilen in der Auszählung von 200 Zellen pro Tier zu einer Vernachlässigung kleinerer Zellpopulationen wie den Lymphozyten geführt haben könnte.

Insgesamt lassen diese Ergebnisse darauf schließen, dass das HDM-Modell seine Funktion erfüllt und bei den Gruppen B und D Asthma ausgelöst werden konnte, was die Grundlage der Interpretation aller folgenden Ergebnisse bildet.

Es existieren Studien, welche eine Reduktion der Gesamtzellzahl, Makrophagen und eosinophilen Granulozyten in der BAL durch TRPV1-Blocker in einem Ovalbumin-Modell

beschreiben. [51] In dieser Arbeit konnte zwischen den TRPV1<sup>-/-</sup>-Mäusen und den Wildtypmäusen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, was vereinbar ist mit dem Ergebnis von Caceres et al. von 2009, die in einem Ovalbumin-basierten Modell zum gleichen Ergebnis gelangen. [39] Auch in der Arbeit von Baker et al. aus dem Jahr 2016 wurde, obwohl eine Richtung zu erkennen war, keine statistische Signifikanz bei TRPV1<sup>-/-</sup> Mäusen in einem HDM-Modell in Bezug auf die Eosinophilenzahl erreicht. [14] Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz wäre, dass sich bei TRPV1<sup>-/-</sup> Mäusen alternative Inflammations-Mechanismen zum TRPV1-Pfad entwickeln. Möglicherweise geschieht dies sogar über TRPA1, der den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nach heraufreguliert wird bei TRPV1<sup>-/-</sup> Mäusen, was eine Erklärung für die normale Reaktion in oben genannten Modellen sein könnte. Bei kurzfristiger Blockade, beispielsweise durch Capsazepin, wäre dies nicht möglich und die Inflammation wäre in diesem Fall sehr wohl verringert durch Ausschalten des TRPV1-Rezeptors.

### **6.2.2 Gesamt-IgE-Level im Serum**

Die wichtige Rolle von IgE bei allergischen Geschehen, darunter auch dem atopischen Asthma und speziell im Hinblick auf Mastzellen, ist seit langem bekannt. [45]

In den mit HDM behandelten Gruppen zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Mittelwerte der Gesamt- IgE-Spiegel im Vergleich zu den beiden mit NaCl behandelten Gruppen mindestens um den Faktor 33. Im Vergleich zu weiteren Studien der Arbeitsgruppe Dinh mit dem gleichen HDM-Mausmodell an Mäusen der Gattung BALB/c ist dies ein außergewöhnlich hoher Anstieg [203], wobei die gattungsspezifischen Unterschiede bedacht werden müssen. So zeigen, wie weiter oben bereits ausgeführt, an Asthma erkrankte C57BL/6 unter anderem höhere Eosinophilenzahlen- und Neutrophilenzahlen in der BAL im Vergleich zu BALB/c.

In OVA-basierten Modellen konnten erhöhte OVA-IgE-Level bei BALB/c-Mäusen im Vergleich zu C57BL/6 demonstriert werden. [115] Andere Studien konnten dies nicht nachweisen. [101] Dieses Ergebnis könnte somit auf eine bessere Wirksamkeit des HDM-Protokolls in Bezug auf die Fähigkeit, allergisches Asthma bei C57BL/6 im Vergleich zu BALB/c auszulösen, hindeuten. In jedem Fall jedoch demonstrieren die Resultate das allergische Asthma der mit HDM behandelten Gruppen.

Zwischen den TRPV1<sup>-/-</sup>-Mäusen und den WT-Mäusen zeigt sich bei gleicher Behandlung jeweils kein signifikanter Unterschied der Serum-IgE-Spiegel. Die Studienlage hierzu ist noch uneinheitlich. In verschiedenen Studien konnten signifikant erniedrigte IgE-Level im Blut HDM- bzw. Ovalbumin-behandelter C57BL/6 TRPV1<sup>-/-</sup> im Vergleich zur Kontrollgruppe demonstriert werden. [14,201]

Andere Publikationen demonstrieren genau das Gegenteil, nämlich eine erhöhte IgE-Produktion bei TRPV1<sup>-/-</sup> C57BL/6, welche auf intranasalem Weg sensibilisiert wurden. Die gleiche Studie kann diesen Effekt aber nicht bei Mäusen, welche i.p. sensibilisiert wurden, feststellen, bei diesen blieb das Ergebnis unverändert. [173]

Caceres et al. untersuchten zwar nicht den TRPV1-Rezeptor, aber den strukturell verwandten TRPA1-Rezeptor und konnten bei den mit Ovalbumin behandelten TRPA1<sup>-/-</sup> C57BL/6 ebenfalls keine Veränderung der Serum-IgE-Spiegel im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen. [39]

Die bisher veröffentlichten Studien geben also zusammenfassend noch keine klare Richtung vor. Die vorliegende Arbeit trägt dazu bei, das Resultat weiter einzugrenzen, festzuhalten ist aber, dass weitere Publikationen zum gleichen Thema abzuwarten sind, ehe eine Aussage getroffen werden kann.

### 6.2.3 Lichtmikroskopie

In der HE-Färbung lässt sich eindeutig eine Ansammlung von Entzündungszellen in der Nähe der Bronchien und Bronchioli, sowie ein „Airway-Remodeling“ mit Dickenzunahme der Wände und Hypertrophie der glatten Muskulatur der mit HDM behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachten.

Die PAS-Färbung bestätigt die postulierte Becherzellhyperplasie mit in der Folge vermehrter Mukusansammlung in Lumen der Bronchioli. Auch das bronchiale Remodeling kann in dieser Färbung beobachtet werden.

Diese Effekte wurden bereits in verschiedenen Studien und sogar Lehrbüchern beschrieben und sind somit keine neuen Ergebnisse, bestätigen aber unser Modell. [81,110,152,199,203]

Mastzellen konnten in der Toluidinblaufärbung nachgewiesen werden und sind bevorzugt in der Nähe der Trachea, großer Bronchien und großer Gefäße zu finden. Auch dies wird gedeckt von bereits publizierten Studien, darunter auch Studien unserer Arbeitsgruppe. [57,203]

### 6.2.4 Gesamtmastzellzahl / mm<sup>2</sup>

In Bezug auf die Gesamtmastzellzahl differieren die Publikationen. Schmit et al. beschreibt 2017 in einer Publikation, die die Verteilung von Mastzellen innerhalb der Lungenkompartimente an Mäusungen untersucht, Mastzellzahlen, die von 5 / mm<sup>2</sup> im alveolären Gewebe über 20/mm<sup>2</sup> im Bereich von Gefäßen bis hin zu 25 / mm<sup>2</sup> in der Nähe

von Bronchien reicht. Dabei wurden die Mäuse der Gattung BALB/c nach dem gleichen Protokoll behandelt wie in der vorliegenden Arbeit. [203]

Andersson et al. beschreibt dagegen für gesunde menschliche Lungen Zahlen von  $150/\text{mm}^2$  in zentralen Luftwegen bis hin zu  $400/\text{mm}^2$  in den Alveolen. [8] Auch Balzar et al stützen dieses Ergebnis. [18]

Die Beobachtungen dieser Arbeit liegen dazwischen, nämlich bei  $40 - 80 \text{ Zellen}/\text{mm}^2$ , abhängig davon, ob es sich um Asthma-Lungen oder um gesunde Mäuselungen handelte.

Es ist zu erwähnen, dass in dieser Arbeit keine Aufteilung in einzelne Lungenkompartimente erfolgte, sondern ein Mittelwert über die gesamte Lunge gebildet wurde. Trotzdem bleibt eine große Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der 3 Studien.

Anzuführen ist, dass Andersson et al. mithilfe eines Rechen-Algorithmus die luminale Fläche ausschließen und somit nur die Septumoberfläche betrachten. [8] Auch artspezifische Unterschiede müssen bedacht werden zwischen Menschen- und Mäuselungen. Dabei scheinen größere Säugetiere, wie beispielsweise Hunde ( $25,7 \pm 3,3$ ) und Schweine ( $23,7 \pm 7,9$ ) oder entsprechend auch der Mensch eine größere Mastzellichte zu besitzen als beispielsweise Ratten und Mäuse. [8,18,118,236] In Kombination könnten diese beiden Tatsachen der Grund für die mehr als deutlichen Unterschiede der Studien sein.

Nach Betrachtung der Abweichung der Ergebnisse dieser Arbeit von der Arbeit von Schmit scheint es am wahrscheinlichsten, dass diese zurückzuführen sind auf eine unterschiedliche Auswahl der auszuzählenden Schnitte. [203] Während sich die vorliegende Arbeit von Anfang an vor allem auf die prozentuale Verteilung der Mastzellpopulationen sowie der Rezeptoren konzentriert hat und die Unterschiede zwischen WT / Asthma und WT / Knockout zum Ziel hatte, ging es in der Arbeit von Schmit vor allem um die verschiedenen Kompartimente der Lungen. Dies führte dazu, dass in dieser Arbeit in erster Linie Bereiche ausgewertet wurden, in denen möglichst viele Mastzellen vorkommen, während Schmit et al. systematischer vorgehen und dabei beispielsweise auch Bereiche der Lunge in die Auswertung mit einbezogen, in welchen überhaupt keine Mastzellen zu sehen waren.

Weiterhin wurden in allen 4 Arbeiten die Mastzellen nach immunhistochemischer Färbung manuell ausgezählt, sodass untersucherabhängige Alterationen der Resultate nahezu unmöglich zu vermeiden sind. Ohne Zweifel werden weitere Studien dazu beitragen, den wahren Wert weiter eingrenzen zu können.

Sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in der Publikation von Schmit et al., bzw. einer weiteren von Andersson et al., lässt sich eine deutliche Zunahme der Mastzell-dichte bei asthmatischen Patienten, bzw. Mäusen feststellen. [9,203]

Ob die zuvor beschriebenen erhöhten IgE-Spiegel im Vergleich zur Publikation von Schmit et al. ebenfalls im Zusammenhang mit den erhöhten Mastzellzahlen stehen, ist denkbar, in OVA-basierten Protokollen allerdings konnte eine erhöhte Mastzellzahl in Mäusungen der Gattung BALB/c gezeigt werden im Vergleich zu C57BL/6 der vorliegenden Arbeit. [101] Es erscheint jedoch gut möglich, dass die verschiedenen Gattungen auch unterschiedlich auf verschiedene Antigene reagieren.

### **6.2.5 Expression von TRPV1 bei Asthma und Vergleich zwischen $M_T$ / $M_{TC}$**

In einer Publikation aus dem Jahr 2004 von Ständer et al. konnte bei einem Anteil aller der Haut entstammenden Mastzellen immunhistochemisch und mithilfe von PCR der TRPV1-Rezeptor nachgewiesen werden. [216] Weiterhin bestätigten Untersuchungen an einer Mastzell-Leukämie-Reihe die Expression von TRPV1 und weiteren TRP-Kanälen in humanen Mastzellen. [263] Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde dieses Ergebnis bestätigt und es fand sich, dass 50-65% aller untersuchten Mastzellen in der Lunge positiv anfärbbar für TRPV1 sind.

In keinem Fall findet sich eine vermehrte Expression des Capsaicin-Rezeptors nach Behandlung mit Hausstaubmilbenextrakt im Vergleich zur Salin-Kontrollgruppe. Dagegen kann in allen 3 Färbungen eine Verringerung der Anzahl TRPV1-positiver Mastzellen beobachtet werden. Der Effekt ist nicht sehr stark ausgeprägt und erreicht nur in einer der Färbungen statistische Signifikanz, die Richtung ist aber klar erkennbar und auch bei den beiden nicht signifikanten Ergebnissen wird die Schwelle nur knapp verfehlt. ( $p=0,07$  und  $p=0,06$ )

Zum aktuellen Zeitpunkt finden sich nach sorgfältiger Literaturrecherche mit den Stichworten „TRPV1“ „asthma“ und „mast cell“ keine weiteren Publikationen bezüglich einer Herauf- oder Herabregulation des TRPV1-Rezeptors auf Mastzellen im Rahmen von allergischem Asthma. Dagegen existieren aber Publikationen aus dem Jahr 2017, welche eine vermehrte Expression von TRPV1 in den Epithelien der Luftwege asthmatischer Mäuse feststellen konnten. Da in der vorliegenden Arbeit aber Mastzellen untersucht wurden, sind beide Ergebnisse problemlos miteinander vereinbar. Es ist gut vorstellbar, dass TRPV1 zwar in den Luftwegen heraufreguliert wird, in Mastzellen dieser Effekt aber ausbleibt. [142]

Untersucht wurde ebenfalls die Expression des TRPV1-Rezeptors zwischen den beiden Mastzellpopulationen  $M_T$  und  $M_{TC}$ . Dabei konnte festgestellt werden, dass 15-20% aller

Mastzellen als TRPV1-positive  $M_T$  und 30-35% als TRPV1-positive  $M_{TC}$  klassifiziert werden können.  $M_{TC}$  sind klassischerweise eher verantwortlich für Fibrosen als für asthmatische Erkrankungen, inwiefern dieses Ergebnis also eine Rolle in Bezug auf Asthma spielt, bleibt abzuwarten. [54]

Diese Verteilung war auch im Vergleich zwischen Asthma- und Kontrolltieren stabil. Bisher wurden keine Studien publiziert, welche den gleichen Sachverhalt untersuchen, so dass zum aktuellen Zeitpunkt ein Vergleich dieses Ergebnisses nicht möglich ist.

### **6.2.6 Expression von TRPA1 bei Asthma und Vergleich zwischen $M_T$ / $M_{TC}$ sowie TRPV1<sup>-/-</sup> und Wildtypmäusen**

Wie bereits in der Einleitung angedeutet, konnte in einer Studie aus dem Jahr 2012 von Hox et al. keine funktionelle Expression des TRPA1-Rezeptors auf Mastzellen festgestellt werden. [117] Bedenkt man allerdings, dass in ruhenden Mastzellen TRPA1 in erster Linie in intravesikulären Vesikeln gelagert wird, die mit Sekretogranin III interagieren und die Arbeitsgruppe um Hox isoliert die Aktivierung von Mastzellen durch Senföl als einzige Positivkontrolle betrachtete, ohne dabei eventuelle Kreuzreaktionen mit anderen Rezeptoren zu untersuchen, so ist dies kein Widerspruch. [88,190] Möglicherweise führt Senföl als einzelnes Molekül nicht zu einer Freisetzung von Mediatoren aus Mastzellen, TRPA1 kann aber trotzdem von diesen exprimiert werden und als Teil einer Signalkaskade (zum Beispiel über Bradykinin und Phospholipase C) eine wichtige Rolle in der Pathogenese des allergischen Asthma spielen. [22] Weiterhin wurde in der zuvor erwähnten Studie von Hox auf Mastzellen des Knochenmarks (BMMCs) zurückgegriffen. Es konnte demonstriert werden, dass Mastzellen das Knochenmark im Allgemeinen als multipotente Mastzell-Progenitorzellen verlassen und sich erst im Zielorgan unter dem komplexen Einfluss verschiedener Moleküle, darunter Interleukine, SCF und STAT5 (Signal transducer and activator of transcription 5) in ihre endgültige Form differenzieren. In Anbetracht dieser wichtigen Rolle, die die Umgebung bei der Entwicklung von Mastzellen spielt, ist es gut möglich, dass Knochenmarkstammzellen keine TRPA1 exprimieren, die in dieser Arbeit untersuchten Mastzellen der Lunge im Lauf ihrer Migration und Differenzierung jedoch auch begannen, diesen Rezeptor zu produzieren. [62]

Dies wird unterstützt von einer Arbeit an C57BL/6-Mäusen mit atopischer Dermatitis, in welcher in Knochenmarksmastzellen der TRPA1-Rezeptor nur in geringer Zahl nachgewiesen werden konnte, die Mastzellen diesen aber in vitro nach Inkubation mit Interleukin 13, Interferon gamma und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vermehrt zu exprimieren scheinen. Für Interleukin 4 konnte sogar der gegenteilige Effekt, nämlich eine Herabregulation, gezeigt werden. [182]

In dieser Arbeit konnte kein Unterschied gezeigt werden zwischen den einzelnen Mastzellpopulationen bezüglich der TRPA1-Expression. Es fand sich, dass 30-40% aller Mastzellen positiv sind für TRPA1 und ausschließlich Tryptase exprimieren, während ungefähr die gleiche Zahl (25-40%) an Mastzellen Tryptase, Chymase und TRPA1 parallel exprimieren. Aktuell finden sich in der Literatur (Stichworte „Tryptase“, „Chymase“ und „TRPA1“) keine weiteren Publikationen, welche ebenfalls die TRPA1-Expression in Bezug auf die verschiedenen Mastzellpopulationen untersuchen.

Eine Studie an Patienten mit atopischer Dermatitis konnte eine vermehrte TRPA1-Expression auf Mastzellen im Vergleich mit einer asymptomatischen Kontrollgruppe feststellen, was für eine Rolle in atopischen Krankheitsbildern, wie beispielsweise dem untersuchten allergischen Asthma bronchiale, spricht. [182]

Dies konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. In allen Färbungen sind durchgehend 60-80% der Mäuse-Mastzellen positiv für TRPA1 markierbar. Es findet sich reproduzierbar eine verminderte TRPA1-Expression bei mit HDM behandelten, somit an Asthma erkrankten Mäusen. Insofern sollte bedacht werden, dass Lungenmastzellen in Bezug auf TRPA1 anders reagieren könnten auf entzündliche Prozesse als Hautmastzellen oder Knochenmarkmastzellen oder, dass die dem allergischen Asthma zugrundeliegenden pathophysiologischen Prozesse sich unterscheiden in Bezug auf atopische Dermatitis. [117] Weiterhin ist es wahrscheinlich, dass ebenfalls die Tatsache von Bedeutung ist, dass Mäuse TRPA1 anders exprimieren als die in oben genannter Studie untersuchten menschlichen Patienten. Daher ist es sehr gut denkbar, dass TRPA1 in menschlichem allergischem Asthma auch auf Mastzellen eine Rolle spielt, selbst wenn dies aus den Ergebnissen der vorhandenen Untersuchungen nicht direkt geschlossen werden kann.

In einer Publikation von 2009 wurde ein wichtiger Effekt des TRPA1-Rezeptors auf Neuronen in der Pathogenese von Asthma in Mäusen im Rahmen eines Ovalbumin-Modell postuliert, was gut vereinbar ist mit den Ergebnissen dieser Studie. [39] Es ist sehr gut möglich, dass TRPA1, ähnlich wie TRPV1, über neuronale oder humorale Mechanismen Einfluss auf die Pathogenese allergischen Asthmas nimmt, ohne dabei vermehrt auf Mäuse-Lungenmastzellen nachgewiesen werden zu können.

Abschließend ist festzustellen, dass der TRPA1-Rezeptor eine Rolle auch in Bezug auf Mastzellen zu spielen scheint, die genaue Funktionsweise und die sich daraus ergebenden Konsequenzen bleiben allerdings Gegenstand weiterer Forschungen.

Ebenfalls findet sich ein signifikanter Anstieg bei TRPV1-Knockout-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp. Auch dieses Ergebnis konnte im Rahmen der Arbeit mehrfach bestätigt werden. Insofern scheint eine hemmende Funktion des TRPV1-Rezeptors in Bezug auf

den TRPA1-Rezeptor in Mastzellen denkbar. Dies wird im folgenden Kapitel weiter behandelt.

### **6.2.7 Colokalisation von TRPV1 mit TRPA1**

Obwohl der TRPV1-Rezeptor nach unseren ersten Ergebnissen quantitativ und qualitativ eher eine untergeordnete Rolle in der Pathogenese von Asthma zu spielen scheint, so scheint er doch eine Rolle zu spielen in Hinsicht auf den TRPA1-Rezeptor. Daher wurde untersucht, ob und inwiefern diese miteinander colokalisiert werden können und ob es bei Behandlung der Mäuse mit Hausstaubmilbenextrakt zu einer quantitativen und/oder qualitativen Änderung kommt.

Bei der Untersuchung der Mastzellen, welche nur TRPA1, nicht aber TRPV1 exprimieren, fand sich ein Anstieg bei den Asthmatisierten. Dieser Anstieg befand sich nicht auf einem statistisch signifikanten Niveau, aber weist bei einem  $p$  von 0,09, zusammen mit der statistisch signifikant verminderten Colokalisation von TRPA1 und TRPV1 bei mit HDM behandelten Mäusen in die Richtung unserer zuvor postulierten Hypothese der Hemmung der TRPA1-Expression durch den TRPV1-Rezeptor.

Studien zeigen, dass TRPV1 und TRPA1 nicht nur beide Angriffsorte gleicher Moleküle sind, namentlich Bradykinin, sondern ebenfalls miteinander reagieren und dies auch innerhalb einer Zelle und nicht nur über extrazelluläre Mechanismen. [19,52,217] Die Tatsache, dass TRPV1 und TRPA1 in der Lage sind sowohl Homo- als auch Heteromere zu bilden, stellt eine Interaktion beider Rezeptoren außer Frage. [49,112,135,140,218]

Es konnte ebenfalls bereits beschrieben werden, dass TRPA1 eine funktionelle Inhibition des TRPV1-Rezeptors bewirkt, dessen Sensitivität unter anderen Umständen aber auch erhöhen kann. [86,215,264] Möglich erscheint also auch, dass TRPA1 reziprok durch TRPV1 gehemmt wird und dies quantitative Auswirkungen auf die Rezeptorexpression in TRPV1<sup>-/-</sup>-Mastzellen hat. Eben diesen Effekt, nämlich die Inhibition von TRPA1 durch TRPV1, beschreiben Weng et al. 2015 in ihrer Publikation zu dem Protein Tmem100, das vermutlich die Assoziation von TRPA1 und TRPV1 zueinander lockert, damit zu einer Verstärkung der Funktion von TRPA1 führt. [250]

### **6.2.8 Expression von FcεRI bei Asthma und Vergleich zwischen M<sub>T</sub> / M<sub>TC</sub> sowie TRPV1<sup>-/-</sup> und Wildtypmäusen**

Ein Ergebnis der vorliegenden Arbeit lautet, dass 60-90 Prozent aller Mastzellen FcεRI-positiv sind. Eine quantitative, prozentuale Rolle bei Asthma scheint jedoch nicht zu bestehen. Dies widerspricht auf den ersten Blick den Beobachtungen der Publikation von Andersson et al (2011), welche in zentralen Luftwegen keinen Unterschied fand, in



alveolärem Gewebe aber einen sehr deutlichen. [9] Diese Diskrepanz in den beiden Studien könnte zurückzuführen sein darauf, dass in der vorliegenden Arbeit kein Unterschied gemacht wurde zwischen zentralen Luftwegen und alveolärem Gewebe.

Der in der Einleitung beschriebene Anteil von 100 Prozent FcεRI-positiver Mastzellen im Knochenmark, welcher in einer Studie aus dem Jahr 2005 beschrieben wurde, konnten weder Andersson noch die hier vorliegende Publikation für die Lunge bestätigen, sodass davon auszugehen ist, dass auf dem Weg vom Knochenmark zur Lunge im Rahmen der Ausreifung viele Mastzellen ihre FcεRI-Rezeptoren verlieren und erst wieder exprimieren, wenn es zu einem Stimulus (beispielsweise IgE im Rahmen von allergischem Asthma) kommt. Oder aber es liegt an dem Unterschied in den Untersuchungsmethoden, denn während diese Arbeit sowie die Arbeit von Andersson sich der Immunhistochemie bedienten, wurde in der Publikation von Kaur et al Durchflusszytometrie zur Quantifizierung FcεRI-exprimierender Mastzellen verwendet, welche deutlich sensitiver ist. [134]

In Bezug auf die FcεRI Expression in den Mastzellpopulationen zeigen sich einzelne auf einem niedrigen Niveau signifikante Ergebnisse, eine klare Richtung ist jedoch nicht zu erkennen. Die Publikation von Andersson et al. hat die gleiche Fragestellung untersucht, konnte diesen Effekt jedoch nicht feststellen. [9] Daher bleibt die Bedeutung bisher unklar, weitere Studien bleiben abzuwarten, ehe eine Aussage getroffen werden kann.

### **6.2.9 Colokalisation von TRPV1 mit FcεRI**

Es zeigt sich, dass ca. 40 Prozent aller Mastzellen FcεRI und TRPV1 colokalisiert exprimieren, dagegen aber nur 20 Prozent FcεRI isoliert, bzw 15 % TRPV1 isoliert exprimieren. Dies könnte, wenn man den größeren Anteil doppelt positiver Mastzellen bedenkt, auf eine Interaktion beider Rezeptoren hinweisen, daraus eine Schlussfolgerung zu postulieren, erscheint aber verfrüht.

Eine quantitative Beeinflussung der Expression von FcεRI durch TRPV1 ist in den Ergebnissen nicht zu erkennen, entsprechende Vergleichsstudien fehlen. Auch zwischen den Asthma- und den Kontrollgruppen zeigt sich kein signifikanter Unterschied.

Diese Ergebnisse unterstreichen die bisherigen Resultate, welche dem TRPV1-Rezeptor eine, zumindest in Bezug auf Mastzellen, untergeordnete Rolle zuordnen.

### **6.2.10 Colokalisation von TRPA1 mit FcεRI**

Eine Colokalisation von TRPA1 mit FcεRI ist in ca. 50 – 60 Prozent aller Mastzellen zu erkennen. Dabei exprimieren ca. 10-20 Prozent aller Mastzellen TRPA1 isoliert und 20-30 Prozent sind positiv für FcεRI, ohne dabei jedoch positiv für TRPA1 zu sein.

Auch hierbei erscheint, im Hinblick auf den erhöhten Anteil doppelt positiver Mastzellen, eine Interaktion beider Rezeptoren möglich. Ein endgültiges Fazit ist aber auch hierbei nicht zu ziehen.

Quantitativ besteht dabei kein signifikanter Unterschied zwischen Asthma- und Kontrollmäusen. Entsprechende Publikationen zum Vergleich dieser Zahlen fehlen.

## **6.3 Schlussfolgerungen**

Zusammenfassend lässt die vorliegende Arbeit auf eine Rolle der untersuchten Rezeptoren in der Funktionsweise der Lungenmastzellen schließen. So konnte demonstriert werden, dass die Anzahl der Lungenmastzellen nach der Allergiebehandlung zunimmt und ein großer Anteil der Lungenmastzellen TRPV1 (bis zu 65%), TRPA1 (bis zu 80%) und den hochaffinen Mastzellrezeptor FcεRI (bis zu 90%) exprimiert und dies jeweils überwiegend nicht isoliert, sondern in Kombination mit mindestens einem der beiden anderen Rezeptoren.

Die Ergebnisse lassen eine wichtige Rolle der Mastzellenpopulation mit Expression von TRPA1 und dem hochspezifischen IgE-Rezeptor bei allergischem Asthma bronchiale vermuten.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Adcock JJ (2009) TRPV1 receptors in sensitisation of cough and pain reflexes. *Pulm Pharmacol Ther* 22:65–70
2. Agopyan N, Head J, Yu S, Simon SA (2004) TRPV1 receptors mediate particulate matter-induced apoptosis. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 286:L563–L572
3. Akopian AN, Ruparel NB, Jeske NA, Hargreaves KM (2007) Transient receptor potential TRPA1 channel desensitization in sensory neurons is agonist dependent and regulated by TRPV1-directed internalization. *J Physiol* 583:175–193
4. Akopian AN, Ruparel NB, Patwardhan A, Hargreaves KM (2008) Cannabinoids desensitize capsaicin and mustard oil responses in sensory neurons via TRPA1 activation. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 28:1064–1075
5. Alter BJ, Gereau RW (2008) Hotheaded: TRPV1 as Mediator of Hippocampal Synaptic Plasticity. *Neuron* 57:629–631
6. Alvarez-Berdugo D, Rofes L, Farré R, Casamitjana JF, Enrique A, Chamizo J, Padrón A, Navarro X, Clavé P (2016) Localization and expression of TRPV1 and TRPA1 in the human oropharynx and larynx. *Neurogastroenterol Motil* 28:91–100
7. Amantini C, Mosca M, Nabissi M, Lucciarini R, Caprodossi S, Arcella A, Giangaspero F, Santoni G (2007) Capsaicin-induced apoptosis of glioma cells is mediated by TRPV1 vanilloid receptor and requires p38 MAPK activation. *J Neurochem* 102:977–990
8. Andersson CK, Mori M, Bjermer L, Löfdahl C-G, Erjefält JS (2009) Novel site-specific mast cell subpopulations in the human lung. *Thorax* 64:297–305
9. Andersson CK, Bergqvist A, Mori M, Mauad T, Bjermer L, Erjefält JS (2011) Mast cell-associated alveolar inflammation in patients with atopic uncontrolled asthma. *J Allergy Clin Immunol* 127:905-912.e7
10. André E, Campi B, Materazzi S, Trevisani M, Amadesi S, Massi D, Creminon C, Vaksman N, Nassini R, Civelli M, Baraldi PG, Poole DP, Bunnett NW, Geppetti P, Patacchini R (2008) Cigarette smoke-induced neurogenic inflammation is mediated by  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehydes and the TRPA1 receptor in rodents. *J Clin Invest* 118:2574–2582
11. Andrei SR, Sinharoy P, Bratz IN, Damron DS (2016) TRPA1 is functionally co-expressed with TRPV1 in cardiac muscle: Co-localization at z-discs, costameres and intercalated discs. *Channels* 10:395–409
12. Antoniazzi CTDD, Nassini R, Rigo FK, Milioli AM, Bellinaso F, Camponogara C, Silva CR, de Almeida AS, Rossato MF, De Logu F, Oliveira SM, Cunha TM, Geppetti P, Ferreira J, Trevisan G (2019) Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) plays a critical role in a mouse model of cancer pain. *Int J Cancer* 144:355–365
13. Athari SS (2019) Targeting cell signaling in allergic asthma. *Signal Transduct Target Ther* 4:
14. Baker K, Raemdonck K, Dekkak B, Snelgrove RJ, Ford J, Shala F, Belvisi MG, Birrell MA

(2016) Role of the ion channel, transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1), in allergic asthma. *Respir Res* 17:67

15. Balemans D, Aguilera-Lizarraga J, Florens MV, Jain P, Denadai-Souza A, Viola MF, Alpizar YA, Van Der Merwe S, Vanden Berghe P, Talavera K, Vanner S, Wouters MM, Boeckxstaens GE (2019) Histamine-mediated potentiation of transient receptor potential (TRP) ankyrin 1 and TRP vanilloid 4 signaling in submucosal neurons in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 316:G338–G349

16. Balestrini A, Joseph V, Dourado M, Reese RM, Shields SD, Rougé L, Bravo DD, Chernov-Rogan T, Austin CD, Chen H, Wang L, Villemure E, Shore DGM, Verma VA, Hu B, Chen Y, Leong L, Bjornson C, Hötzel K, Gogineni A, Lee WP, Suto E, Wu X, Liu J, Zhang J, Gandham V, Wang J, Payandeh J, Ciferri C, Estevez A, Arthur CP, Kortmann J, Wong RL, Heredia JE, Doerr J, Jung M, Vander Heiden JA, Roose-Girma M, Tam L, Barck KH, Carano RAD, Ding HT, Brillantes B, Tam C, Yang X, Gao SS, Ly JQ, Liu L, Chen L, Liederer BM, Lin JH, Magnuson S, Chen J, Hackos DH, Elstrott J, Rohou A, Safina BS, Volgraf M, Bauer RN, Riol-Blanco L (2021) A TRPA1 inhibitor suppresses neurogenic inflammation and airway contraction for asthma treatment. *J Exp Med* 218:

17. Balzar S, Chu HW, Strand M, Wenzel S (2005) Relationship of Small Airway Chymase-Positive Mast Cells and Lung Function in Severe Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 171:431–439

18. Balzar S, Chu HW, Strand M, Wenzel S (2005) Relationship of Small Airway Chymase-Positive Mast Cells and Lung Function in Severe Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 171:431–439

19. Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian A (2004) Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* 41:849–857

20. Barnes PJ (2001) Neurogenic inflammation in the airways. *Respir Physiol* 125:145–154

21. Barnes PJ (2009) Intrinsic asthma: not so different from allergic asthma but driven by superantigens? *Clin Exp Allergy* 39:1145–1151

22. Bautista DM, Jordt S-E, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, Yamoah EN, Basbaum AI, Julius D (2006) TRPA1 Mediates the Inflammatory Actions of Environmental Irritants and Proalgesic Agents. *Cell* 124:1269–1282

23. Bautista DM, Pellegrino M, Tsunozaki M (2013) TRPA1: A Gatekeeper for Inflammation. *Annu Rev Physiol* 75:181–200

24. Beck LA, Marcotte GV, MacGlashan D, Togias A, Saini S (2004) Omalizumab-induced reductions in mast cell FcεRI expression and function. *J Allergy Clin Immunol* 114:527–530

25. Benemei S, Fusi C, Trevisan G, Geppetti P (2014) The TRPA1 channel in migraine mechanism and treatment. *Br J Pharmacol* 171:2552–2567

26. Bernstein JE, Parish LC, Rapaport M, Rosenbaum MM, Roenigk HH (1986) Effects of topically applied capsaicin on moderate and severe psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 15:504–

507

27. Bernstein JE, Bickers DR, Dahl MV, Roshal JY (1987) Treatment of chronic postherpetic neuralgia with topical capsaicin. *J Am Acad Dermatol* 17:93–96
28. Bhattacharya MRC, Bautista DM, Wu K, Haeberle H, Lumpkin EA, Julius D (2008) Radial stretch reveals distinct populations of mechanosensitive mammalian somatosensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:20015–20020
29. Birder LA, Kanai AJ, de Groat WC, Kiss S, Nealen ML, Burke NE, Dineley KE, Watkins S, Reynolds IJ, Caterina MJ (2001) Vanilloid receptor expression suggests a sensory role for urinary bladder epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13396–13401
30. Birrell MA, Belvisi MG, Grace M, Sadofsky L, Faruqi S, Hele DJ, Maher SA, Freund-Michel V, Morice AH (2009) TRPA1 Agonists Evoke Coughing in Guinea Pig and Human Volunteers. *Am J Respir Crit Care Med* 180:1042–1047
31. Bíró T, Maurer M, Modarres S, Lewin NE, Brodie C, Ács G, Ács P, Paus R, Blumberg PM (1998) Characterization of Functional Vanilloid Receptors Expressed by Mast Cells. *Blood* 91:1332–1340
32. Blacqui re MJ, Hylkema MN, Postma DS, Geerlings M, Timens W, Melgert BN (2010) Airway Inflammation and Remodeling in Two Mouse Models of Asthma: Comparison of Males and Females. *Int Arch Allergy Immunol* 153:173–181
33. Bonvini SJ, Belvisi MG (2017) Cough and airway disease: The role of ion channels. *Pulm Pharmacol Ther* 47:21–28
34. Botelho FM, Llop-Guevara A, Trimble NJ, Nikota JK, Bauer CMT, Lambert KN, Kianpour S, Jordana M, St mpfli MR (2011) Cigarette Smoke Differentially Affects Eosinophilia and Remodeling in a Model of House Dust Mite Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45:753–760
35. Boulet L-P (2018) Airway remodeling in asthma: update on mechanisms and therapeutic approaches. *Curr Opin Pulm Med* 24:56–62
36. Bradley BL, Azzawi M, Jacobson M, Assoufi B, Collins JV, Irani AA, Schwartz LB, Durham SR, Jeffery PK, Kay AB (1991) Eosinophils, T-lymphocytes, mast cells, neutrophils, and macrophages in bronchial biopsy specimens from atopic subjects with asthma: Comparison with biopsy specimens from atopic subjects without asthma and normal control subjects and relationship to bronchial hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 88:661–674
37. Brewer JM, Conacher M, Hunter CA, Mohrs M, Brombacher F, Alexander J (1999) Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling. *J Immunol Baltim Md* 163:6448–6454
38. Buhl R, Bals R, Baur X, Berdel D, Cri e C-P, Gappa M, Gillissen A, Greulich T, Haidl P, Hamelmann E, Kardos P, Kenn K, Klimek L, Korn S, Lommatzsch M, Magnussen H, Nicolai T, Nowak D, Pfaar O, Rabe KF, Riedler J, Ritz T, Schultz K, Schuster A, Spindler T, Taube C, Taube K, Vogelmeier C, Leupoldt A von, Wantke F, Weise S, Wildhaber J, Worth H, Zacharasiewicz A (2017) S2k-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit Asthma. *Pneumologie* 71:849–919

39. Caceres AI, Brackmann M, Elia MD, Bessac BF, Camino D del, D'Amours M, Witek JS, Fanger CM, Chong JA, Hayward NJ, Homer RJ, Cohn L, Huang X, Moran MM, Jordt S-E (2009) A sensory neuronal ion channel essential for airway inflammation and hyperreactivity in asthma. *Proc Natl Acad Sci* 106:9099–9104
40. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816–824
41. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816–824
42. Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D (2000) Impaired Nociception and Pain Sensation in Mice Lacking the Capsaicin Receptor. *Science* 288:306–313
43. Caterina MJ, Julius D (2001) The Vanilloid Receptor: A Molecular Gateway to the Pain Pathway. *Annu Rev Neurosci* 24:487–517
44. Chabra R, Gupta M (2020) Allergic And Environmental Induced Asthma. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526018/>
45. Charles A Janeway J, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ (2001) Effector mechanisms in allergic reactions.
46. Chen H, Terrett JA (2020) Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) antagonists: a patent review (2015-2019). *Expert Opin Ther Pat* 30:643–657
47. Chen J, Kang D, Xu J, Lake M, Hogan JO, Sun C, Walter K, Yao B, Kim D (2013) Species differences and molecular determinant of TRPA1 cold sensitivity. *Nat Commun* 4:2501
48. Chen J, Hackos DH (2015) TRPA1 as a drug target--promise and challenges. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 388:451–463
49. Cheng W, Yang F, Liu S, Colton CK, Wang C, Cui Y, Cao X, Zhu MX, Sun C, Wang K, Zheng J (2012) Heteromeric heat-sensitive transient receptor potential channels exhibit distinct temperature and chemical response. *J Biol Chem* 287:7279–7288
50. Chetty A, Sharda A, Warburton R, Chen T, Xue C, Castellot J, Haydon PG, Nielsen HC (2016) Effect of a Purinergic P2Y6 Receptor Agonist on Airway Remodeling and Responsiveness in a Mouse Model of Asthma. *American Thoracic Society* URL: [https://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm-conference.2016.193.1\\_MeetingAbstracts.A2173](https://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm-conference.2016.193.1_MeetingAbstracts.A2173)
51. Choi JY, Lee HY, Hur J, Kim KH, Kang JY, Rhee CK, Lee SY (2018) TRPV1 Blocking Alleviates Airway Inflammation and Remodeling in a Chronic Asthma Murine Model. *Allergy Asthma Immunol Res* 10:216–224
52. Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI, Chao MV, Julius D (2001) Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition. *Nature* 411:957–962
53. Church MK, Levi-Schaffer F (1997) The human mast cell. *J Allergy Clin Immunol* 99:155–160

54. Church MK, Levi-Schaffer F (1997) THE JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, VOLUME 99 NUMBER 2.
55. Clapham DE (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426:517–524
56. Clapham DE, Julius D, Montell C, Schultz G (2005) International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Transient Receptor Potential Channels. *Pharmacol Rev* 57:427–450
57. Collington SJ, Williams TJ, Weller CL (2011) Mechanisms underlying the localisation of mast cells in tissues. *Trends Immunol* 32:478–485
58. Connor AB *Aurora's Guide to Mouse Colony Management*. 13
59. Cordero-Morales JF, Gracheva EO, Julius D (2011) Cytoplasmic ankyrin repeats of transient receptor potential A1 (TRPA1) dictate sensitivity to thermal and chemical stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:E1184–1191
60. Corey DP, García-Añoveros J, Holt JR, Kwan KY, Lin S-Y, Vollrath MA, Amalfitano A, Cheung EL-M, Derfler BH, Duggan A, Géléoc GSG, Gray PA, Hoffman MP, Rehm HL, Tamasauskas D, Zhang D-S (2004) TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature* 432:723–730
61. Crawley JN, Belknap JK, Collins A, Crabbe JC, Frankel W, Henderson N, Hitzemann RJ, Maxson SC, Miner LL, Silva AJ, Wehner JM, Wynshaw-Boris A, Paylor R (1997) Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology (Berl)* 132:107–124
62. Dahlin JS, Hallgren J (2015) Mast cell progenitors: Origin, development and migration to tissues. *Mol Immunol* 63:9–17
63. Daubeuf F, Frossard N (2013) Acute Asthma Models to Ovalbumin in the Mouse. *Curr Protoc Mouse Biol* 3:31–37
64. de Boer JD, Yang J, van den Boogaard FE, Hoogendijk AJ, de Beer R, van der Zee JS, Roelofs JJTH, van 't Veer C, de Vos AF, van der Poll T (2014) Mast cell-deficient kit mice develop house dust mite-induced lung inflammation despite impaired eosinophil recruitment. *J Innate Immun* 6:219–226
65. De Logu F, Patacchini R, Fontana G, Geppetti P (2016) TRP functions in the broncho-pulmonary system. *Semin Immunopathol* 38:321–329
66. Debeuf N, Haspeslagh E, Helden M van, Hammad H, Lambrecht BN (2016) Mouse Models of Asthma. *Curr Protoc Mouse Biol* 6:169–184
67. Debeuf N, Haspeslagh E, Helden M van, Hammad H, Lambrecht BN (2016) Mouse Models of Asthma. *Curr Protoc Mouse Biol* 6:169–184
68. Delescluse I, Mace H, Adcock J (2012) Inhibition of airway hyper-responsiveness by TRPV1 antagonists (SB-705498 and PF-04065463) in the unanaesthetized, ovalbumin-sensitized guinea pig. *Br J Pharmacol* 166:1822–1832
69. Dell'Italia LJ, Collawn JF, Ferrario CM (2018) Multifunctional Role of Chymase in Acute

and Chronic Tissue Injury and Remodeling. *Circ Res* 122:319–336

70. Deutsche Gesellschaft für Arbeitsmedizin und Umweltmedizin e.V., Deutsche Gesellschaft für Rehabilitationswissenschaften e.V., und Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V.; Buhl R, Bals R, Baur X, Berdel D, Criée C-P, Gappa M, Gillissen A, Greulich T, Haidl P, Hamelmann E, Kardos P, Kenn K, Klimek L, Korn S, Lommatzsch M, Magnussen H, Nicolai T, Nowak D, Pfaar O, Rabe KF, Riedler J, Ritz T, Schultz K, Schuster A, Spindler T, Taube C, Taube K, Vogelmeier C, von Leupoldt A, Wantke F, Weise S, Wildhaber J, Worth H, Zacharasiewicz A (2017) [Guideline for the Diagnosis and Treatment of Asthma - Guideline of the German Respiratory Society and the German Atemwegsliga in Cooperation with the Paediatric Respiratory Society and the Austrian Society of Pneumology]. *Pneumol Stuttg Ger* 71:849–919

71. Dharmage SC, Perret JL, Custovic A (2019) Epidemiology of Asthma in Children and Adults. *Front Pediatr* 7:

72. Dinis P, Charrua A, Avelino A, Yaqoob M, Bevan S, Nagy I, Cruz F (2004) Anandamide-Evoked Activation of Vanilloid Receptor 1 Contributes to the Development of Bladder Hyperreflexia and Nociceptive Transmission to Spinal Dorsal Horn Neurons in Cystitis. *J Neurosci* 24:11253–11263

73. Domocos D, Follansbee T, Nguyen A, Nguyen T, Carstens MI, Carstens E (2020) Cinnamaldehyde elicits itch behavior via TRPV1 and TRPV4 but not TRPA1. *Itch* 5:e36

74. Dong R, Zhang T, Wei W, Zhang M, Chen Q, Xu X, Yu L, Qiu Z (2020) A Cold Environment Aggravates Cough Hyperreactivity in Guinea Pigs With Cough by Activating the TRPA1 Signaling Pathway in Skin. *Front Physiol* 0:

75. Drazen JM, Arm JP, Austen KF (1996) Sorting out the cytokines of asthma. *J Exp Med* 183:1–5

76. Dryer SE, Roshanravan H, Kim EY (2019) TRPC channels: Regulation, dysregulation and contributions to chronic kidney disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1865:1041–1066

77. Earley S, Gonzales AL, Crnich R (2009) Endothelium-Dependent Cerebral Artery Dilation Mediated by TRPA1 and Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channels. *Circ Res* 104:987–994

78. Earley S (2012) TRPA1 channels in the vasculature. *Br J Pharmacol* 167:13–22

79. El Karim IA, Linden GJ, Curtis TM, About I, McGahon MK, Irwin CR, Lundy FT (2011) Human odontoblasts express functional thermo-sensitive TRP channels: implications for dentin sensitivity. *Pain* 152:2211–2223

80. El Karim IA, Linden GJ, Curtis TM, About I, McGahon MK, Irwin CR, Killough SA, Lundy FT (2011) Human dental pulp fibroblasts express the „cold-sensing“ transient receptor potential channels TRPA1 and TRPM8. *J Endod* 37:473–478

81. Elias JA, Zhu Z, Chupp G, Homer RJ (1999) Airway remodeling in asthma. *J Clin Invest* 104:1001–1006

82. Elieh Ali Komi D, Bjermer L (2019) Mast Cell-Mediated Orchestration of the Immune Responses in Human Allergic Asthma: Current Insights. *Clin Rev Allergy Immunol* 56:234–247



83. Erkman J, Vaynblat A, Thomas K, Segal LN, Levine J, Moy L, Greifer M, Giusti R, Shah R, Kazachkov M (2018) Airway and esophageal eosinophils in children with severe uncontrolled asthma. *Pediatr Pulmonol* 53:1598–1603
84. Fahy JV (2001) Remodeling of the airway epithelium in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 164:S46-51
85. Fang Z, Yi F, Peng Y, Zhang J (Jim), Zhang L, Deng Z, Chen F, Li C, He Y, Huang C, Zhang Q, Lai K, Xie J (2021) Inhibition of TRPA1 reduces airway inflammation and hyperresponsiveness in mice with allergic rhinitis. *FASEB J* 35:
86. Fischer MJM, Balasuriya D, Jeggle P, Goetze TA, McNaughton PA, Reeh PW, Edwardson JM (2014) Direct evidence for functional TRPV1/TRPA1 heteromers. *Pflüg Arch - Eur J Physiol* 466:2229–2241
87. Fischer MJM, Balasuriya D, Jeggle P, Goetze TA, McNaughton PA, Reeh PW, Edwardson JM (2014) Direct evidence for functional TRPV1/TRPA1 heteromers. *Pflüg Arch - Eur J Physiol* 466:2229–2241
88. Freichel M, Almering J, Tsvilovskyy V (2012) The Role of TRP Proteins in Mast Cells. *Front Immunol* 3:
89. Galli SJ (1997) Complexity and Redundancy in the Pathogenesis of Asthma: Reassessing the Roles of Mast Cells and T Cells. *J Exp Med* 186:343–347
90. Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimaldeston MA, Piliponsky AM, Williams CMM, Tsai M (2005) MAST CELLS AS “TUNABLE” EFFECTOR AND IMMUNOREGULATORY CELLS: Recent Advances. *Annu Rev Immunol* 23:749–786
91. Gavva NR, Treanor JJS, Garami A, Fang L, Surapaneni S, Akrami A, Alvarez F, Bak A, Darling M, Gore A, Jang GR, Kesslak JP, Ni L, Norman MH, Palluconi G, Rose MJ, Salfi M, Tan E, Romanovsky AA, Banfield C, Davar G (2008) Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans. *Pain* 136:202–210
92. Gazzieri D, Trevisani M, Springer J, Harrison S, Cottrell GS, Andre E, Nicoletti P, Massi D, Zecchi S, Nosi D, Santucci M, Gerard NP, Lucattelli M, Lungarella G, Fischer A, Grady EF, Bunnett NW, Geppetti P (2007) Substance P released by TRPV1-expressing neurons produces reactive oxygen species that mediate ethanol-induced gastric injury. *Free Radic Biol Med* 43:581–589
93. Genentech, Inc. (2019) A Phase I, Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Single Centre, 3-Part, Study Designed to Evaluate the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Pharmacodynamic Effects of Single and Multiple Ascending Doses of GDC-0334 and the Effect of Food on the Pharmacokinetics of GDC-0334 in Healthy Adult Subjects. *clinicaltrials.gov* URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03381144>
94. Geppetti P, Patacchini R, Nassini R, Materazzi S (2010) Cough: The Emerging Role of the TRPA1 Channel. *Lung* 188:63–68
95. Geraghty DP, Mazzone SB, Carter C, Kunde DA (2011) Effects of systemic capsaicin treatment on TRPV1 and Tachykinin NK(1) receptor distribution and function in the nucleus of the

solitary tract of the adult rat. *Pharmacology* 87:214–223

96. Giorgi S, Nikolaeva-Koleva M, Alarcón-Alarcón D, Butrón L, González-Rodríguez S (2019) Is TRPA1 Burning Down TRPV1 as Druggable Target for the Treatment of Chronic Pain? *Int J Mol Sci* 20:

97. Glenmark Pharmaceuticals Ltd. India (2014) A Phase II, 4-Week Randomised, Double-Blind, Parallel Group, Placebo Controlled Proof of Concept Study to Evaluate Efficacy, Safety and Tolerability of GRC 17536 in Patients With Painful Diabetic Peripheral Neuropathy. *clinicaltrials.gov* URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01726413>

98. Gould HJ, Sutton BJ (2008) IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol* 8:205–217

99. Gratzke C, Weinhold P, Reich O, Seitz M, Schlenker B, Stief CG, Andersson K-E, Hedlund P (2010) Transient receptor potential A1 and cannabinoid receptor activity in human normal and hyperplastic prostate: relation to nerves and interstitial cells. *Eur Urol* 57:902–910

100. Gu Q, Kwong K, Lee L-Y (2003)  $\text{Ca}^{2+}$  Transient Evoked by Chemical Stimulation Is Enhanced by  $\text{PGE}_2$  in Vagal Sensory Neurons: Role of cAMP/PKA Signaling Pathway. *J Neurophysiol* 89:1985–1993

101. Gueders MM, Paulissen G, Crahay C, Quesada-Calvo F, Hacha J, Van Hove C, Tournoy K, Louis R, Foidart J-M, Noël A, Cataldo DD (2009) Mouse models of asthma: a comparison between C57BL/6 and BALB/c strains regarding bronchial responsiveness, inflammation, and cytokine production. *Inflamm Res* 58:845

102. Haczku A, Moqbel R, Elwood W, Sun J, Kay AB, Barnes PJ, Chung KF (1994) Effects of prolonged repeated exposure to ovalbumin in sensitized brown Norway rats. *Am J Respir Crit Care Med* 150:23–27

103. Hall G, Wang L, Spurney RF (2019) TRPC Channels in Proteinuric Kidney Diseases. *Cells* 9:

104. Han J, Koh YJ, Moon HR, Ryoo HG, Cho C-H, Kim I, Koh GY (2010) Adipose tissue is an extramedullary reservoir for functional hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 115:957–964

105. Hardie RC (2011) A brief history of trp: commentary and personal perspective. *Pflugers Arch* 461:493–498

106. Harford TJ, Grove L, Rezaee F, Scheraga R, Olman MA, Piedimonte G (2021) RSV infection potentiates TRPV1-mediated calcium transport in bronchial epithelium of asthmatic children. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol* 320:L1074–L1084

107. Hathaway TJ, Higenbottam TW, Morrison JF, Clelland CA, Wallwork J (1993) Effects of inhaled capsaicin in heart-lung transplant patients and asthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis* 148:1233–1237

108. Hayman M, Kam PCA (2008) Capsaicin: A review of its pharmacology and clinical applications. *Curr Anaesth Crit Care* 19:338–343

109. Hellmich UA, Gaudet R (2014) Structural Biology of TRP Channels. *Handb Exp*

Pharmacol 223:963–990

110. Herold G (2016) Innere Medizin 2017. Herold, Gerd, Köln
111. Hessel EM, Van Oosterhout AJM, Hofstra CL, De Bie JJ, Garssen J, Van Loveren H, Verheyen AKCP, Savelkoul HFJ, Nijkamp FP (1995) Bronchoconstriction and airway hyper-responsiveness after ovalbumin inhalation in sensitized mice. *Eur J Pharmacol Environ Toxicol Pharmacol* 293:401–412
112. Hoenderop JGJ, Voets T, Hoefs S, Weidema F, Prenen J, Nilius B, Bindels RJM (2003) Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial  $\text{Ca}^{2+}$  channels TRPV5 and TRPV6. *EMBO J* 22:776–785
113. Hoffmann T, Kistner K, Miermeister F, Winkelmann R, Wittmann J, Fischer MJM, Weidner C, Reeh PW (2013) TRPA1 and TRPV1 are differentially involved in heat nociception of mice. *Eur J Pain* 17:1472–1482
114. Holzer P (1991) Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev* 43:143–201
115. Hove CLV, Maes T, Cataldo DD, Guéders MM, Palmans E, Joos GF, Tournoy KG (2009) Comparison of Acute Inflammatory and Chronic Structural Asthma-Like Responses between C57BL/6 and BALB/c Mice. *Int Arch Allergy Immunol* 149:195–207
116. Howarter JA, Youngblood JP (2006) Optimization of Silica Silanization by 3-Aminopropyltriethoxysilane. *Langmuir* 22:11142–11147
117. Hox V, Vanoirbeek J, Alpizar Y, Voedisch S, Callebaut I, Bobic S, Sharify A, De Vooght V, Van Gerven L, Devos F, Liston A, Voets T, Vennekens R, Bullens D, de Vries A, Hoet P, Braun A, Ceuppens J, Talavera Perez K, Hellings P (2012) Crucial Role of TRPA1 and Mast Cells in Induction of Non-Allergic Airway Hyperreactivity in Mice. *Am J Respir Crit Care Med* 187:
118. Hu Y, Jin Y, Han D, Zhang G, Cao S, Xie J, Xue J, Li Y, Meng D, Fan X, Sun L-Q, Wang M (2012) Mast Cell-Induced Lung Injury in Mice Infected with H5N1 Influenza Virus. *J Virol* 86:3347–3356
119. Hunt JF, Fang K, Malik R, Snyder A, Malhotra N, Platts-Mills T a. E, Gaston B (2000) Endogenous Airway Acidification. *Am J Respir Crit Care Med* 161:694–699
120. Inoue K, Koizumi S, Fuziwara S, Denda S, Inoue K, Denda M (2002) Functional Vanilloid Receptors in Cultured Normal Human Epidermal Keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 291:124–129
121. Ioi H, Kido MA, Zhang J-Q, Yamaza T, Nakata S, Nakasima A, Tanaka T (2006) Capsaicin receptor expression in the rat temporomandibular joint. *Cell Tissue Res* 325:47–54
122. Irani AM, Bradford TR, Kepley CL, Schechter NM, Schwartz LB (1989) Detection of MCT and MCTC types of human mast cells by immunohistochemistry using new monoclonal anti-tryptase and anti-chymase antibodies. *J Histochem Cytochem* 37:1509–1515
123. Izzo AA, Capasso R, Aviello G, Borrelli F, Romano B, Piscitelli F, Gallo L, Capasso F,

Orlando P, Di Marzo V (2012) Inhibitory effect of cannabichromene, a major non-psychotropic cannabinoid extracted from *Cannabis sativa*, on inflammation-induced hypermotility in mice. *Br J Pharmacol* 166:1444–1460

124. Jacobsen EA, Ochkur SI, Lee NA, Lee JJ (2007) Eosinophils and asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 7:18–26

125. Jain P, Materazzi S, De Logu F, Rossi Degl’Innocenti D, Fusi C, Li Puma S, Marone IM, Coppi E, Holzer P, Geppetti P, Nassini R (2020) Transient receptor potential ankyrin 1 contributes to somatic pain hypersensitivity in experimental colitis. *Sci Rep* 10:8632

126. Jaquemar D, Schenker T, Trueb B (1999) An Ankyrin-like Protein with Transmembrane Domains Is Specifically Lost after Oncogenic Transformation of Human Fibroblasts. *J Biol Chem* 274:7325–7333

127. Jeffery PK, Wardlaw AJ, Nelson FC, Collins JV, Kay AB (1989) Bronchial Biopsies in Asthma: An Ultrastructural, Quantitative Study and Correlation with Hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 140:1745–1753

128. Jha A, Sharma P, Anaparti V, Ryu MH, Halayko AJ (2015) A role for transient receptor potential ankyrin 1 cation channel (TRPA1) in airway hyper-responsiveness? *Can J Physiol Pharmacol* 93:171–176

129. Jordt S-E, Bautista DM, Chuang H-H, McKemy DD, Zygmunt PM, Högestätt ED, Meng ID, Julius D (2004) Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 427:260–265

130. Julius D (2021) The Jackson Laboratory - B6.129X1-Trpv1 J.pdf.

131. Karai L, Brown DC, Mannes AJ, Connelly ST, Brown J, Gandal M, Wellisch OM, Neubert JK, Olah Z, Iadarola MJ (2004) Deletion of vanilloid receptor 1-expressing primary afferent neurons for pain control. *J Clin Invest* 113:1344–1352

132. Karashima Y, Talavera K, Everaerts W, Janssens A, Kwan KY, Vennekens R, Nilius B, Voets T (2009) TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:1273–1278

133. Karmouty-Quintana H, Cannet C, Sugar R, Fozard JR, Page CP, Beckmann N (2007) Capsaicin-induced mucus secretion in rat airways assessed in vivo and non-invasively by magnetic resonance imaging. *Br J Pharmacol* 150:1022–1030

134. Kaur D, Berger P, Duffy SM, Brightling CE, Bradding P (2005) Co-cultivation of mast cells and Fc epsilon RI alpha+ dendritic-like cells from human hip bone marrow. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol* 35:226–233

135. Kedei N, Szabo T, Lile JD, Treanor JJ, Olah Z, Iadarola MJ, Blumberg PM (2001) Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem*

136. Keown MB, Henry AJ, Ghirlando R, Sutton BJ, Gould HJ (1998) Thermodynamics of the Interaction of Human Immunoglobulin E with Its High-Affinity Receptor FcεRI. *Biochemistry* 37:8863–8869

137. Kitch BT, Levy BD, Fanta CH (2000) Late onset asthma: epidemiology, diagnosis and treatment. *Drugs Aging* 17:385–397
138. Knowlton WM, Bifolck-Fisher A, Bautista DM, McKemy DD (2010) TRPM8, but not TRPA1, is required for neural and behavioral responses to acute noxious cold temperatures and cold-mimetics in vivo. *Pain* 150:340–350
139. Kobayashi K, Fukuoka T, Obata K, Yamanaka H, Dai Y, Tokunaga A, Noguchi K (2005) Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with adelta/c-fibers and colocalization with trk receptors. *J Comp Neurol* 493:596–606
140. Kobori T, Smith GD, Sandford R, Edwardson JM (2009) The transient receptor potential channels TRPP2 and TRPC1 form a heterotetramer with a 2:2 stoichiometry and an alternating subunit arrangement. *J Biol Chem* 284:35507–35513
141. Kochukov MY, McNearney TA, Fu Y, Westlund KN (2006) Thermosensitive TRP ion channels mediate cytosolic calcium response in human synoviocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 291:C424–432
142. Kotova O, Naumov D, Prihodko A, Perelman J, Kolosov V (2017) TRPV1 and TRPV2 are up-regulated in the airways of asthma patients with osmotic airway hyperresponsiveness. *Eur Respir J* 50:PA1820
143. Kraft S, Kinet J-P (2007) New developments in FcεRI regulation, function and inhibition. *Nat Rev Immunol* 7:365–378
144. Kremeyer B, Lopera F, Cox JJ, Momin A, Rugiero F, Marsh S, Woods CG, Jones NG, Paterson KJ, Fricker FR, Villegas A, Acosta N, Pineda-Trujillo NG, Ramírez JD, Zea J, Burley M-W, Bedoya G, Bennett DLH, Wood JN, Ruiz-Linares A (2010) A gain-of-function mutation in TRPA1 causes familial episodic pain syndrome. *Neuron* 66:671–680
145. Kumar RK, Herbert C, Kasper M (2004) Reversibility of airway inflammation and remodelling following cessation of antigenic challenge in a model of chronic asthma. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol* 34:1796–1802
146. Kwan KY, Allchorne AJ, Vollrath MA, Christensen AP, Zhang D-S, Woolf CJ, Corey DP (2006) TRPA1 Contributes to Cold, Mechanical, and Chemical Nociception but Is Not Essential for Hair-Cell Transduction. *Neuron* 50:277–289
147. Kwan KY, Glazer JM, Corey DP, Rice FL, Stucky CL (2009) TRPA1 Modulates Mechanotransduction in Cutaneous Sensory Neurons. *J Neurosci* 29:4808–4819
148. La JH, Schwartz ES, Gebhart GF (2011) Differences in the expression of transient receptor potential channel V1, transient receptor potential channel A1 and mechanosensitive two pore-domain K<sup>+</sup> channels between the lumbar splanchnic and pelvic nerve innervations of mouse urinary bladder and colon. *Neuroscience* 186:179–187
149. Le DD, Rochlitz S, Fischer A, Heck S, Tschernig T, Sester M, Bals R, Welte T, Braun A, Dinh QT (2014) Allergic airway inflammation induces the migration of dendritic cells into airway sensory ganglia. *Respir Res* 15:73

150. Lefort J, Bachelet C-M, Leduc D, B. BV (1996) Effect of antigen provocation of IL-5 transgenic mice on eosinophil mobilization and bronchial hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 97:788–799
151. Lehto SG, Tamir R, Deng H, Klionsky L, Kuang R, Le A, Lee D, Louis J-C, Magal E, Manning BH, Rubino J, Surapaneni S, Tamayo N, Wang T, Wang J, Wang J, Wang W, Youngblood B, Zhang M, Zhu D, Norman MH, Gavva NR (2008) Antihyperalgesic effects of (R,E)-N-(2-hydroxy-2,3-dihydro-1H-inden-4-yl)-3-(2-(piperidin-1-yl)-4-(trifluoromethyl)phenyl)-acrylamide (AMG8562), a novel transient receptor potential vanilloid type 1 modulator that does not cause hyperthermia in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 326:218–229
152. Leigh R, Ellis R, Wattie J, Southam DS, de Hoogh M, Gauldie J, O’Byrne PM, Inman MD (2002) Dysfunction and Remodeling of the Mouse Airway Persist after Resolution of Acute Allergen-Induced Airway Inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27:526–535
153. Li H (2017) TRP Channel Classification. *Adv Exp Med Biol* 976:1–8
154. Li S, Aliyeva M, Daphtary N, Martin RA, Poynter ME, Kostin SF, van der Velden JL, Hyman AM, Stevenson CS, Phillips JE, Lundblad LKA (2014) Antigen-induced mast cell expansion and bronchoconstriction in a mouse model of asthma. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol* 306:L196–L206
155. Liu Z, Wang P, Lu S, Guo R, Gao W, Tong H, Yin Y, Han X, Liu T, Chen X, Zhu MX, Yang Z (2020) Liquiritin, a novel inhibitor of TRPV1 and TRPA1, protects against LPS-induced acute lung injury. *Cell Calcium* 88:102198
156. Lloyd CM (2007) Building Better Mouse Models of Asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 7:231–236
157. Long L, Yao H, Tian J, Luo W, Yu X, Yi F, Chen Q, Xie J, Zhong N, Chung KF, Lai K (2019) Heterogeneity of cough hypersensitivity mediated by TRPV1 and TRPA1 in patients with chronic refractory cough. *Respir Res* 20:112
158. Lötvall J, Akdis CA, Bacharier LB, Björner L, Casale TB, Custovic A, Lemanske RF, Wardlaw AJ, Wenzel SE, Greenberger PA (2011) Asthma endotypes: A new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 127:355–360
159. Macglashan D (2005) IgE and Fc $\epsilon$ RI regulation. *Ann N Y Acad Sci* 1050:73–88
160. MacGlashan D (2017) Fc $\epsilon$ RI density and spontaneous secretion from human basophils. *PLoS ONE* 12:
161. Maglie R, Souza Monteiro de Araujo D, Antiga E, Geppetti P, Nassini R, De Logu F (2021) The Role of TRPA1 in Skin Physiology and Pathology. *Int J Mol Sci* 22:3065
162. Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley R, Global Initiative for Asthma (GINA) Program (2004) The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee Report. *Allergy* 59:469–478
163. Matsuda K, Arkwright PD, Mori Y, Oikawa M, Muko R, Tanaka A, Matsuda H (2020) A Rapid Shift from Chronic Hyperoxia to Normoxia Induces Systemic Anaphylaxis via Transient

Receptor Potential Ankyrin 1 Channels on Mast Cells. *J Immunol* 205:2959–2967

164. Maurer D, Fiebiger S, Ebner C, Reininger B, Fischer GF, Wichlas S, Jouvin MH, Schmitt-Egenolf M, Kraft D, Kinet JP, Stingl G (1996) Peripheral blood dendritic cells express Fc epsilon RI as a complex composed of Fc epsilon RI alpha- and Fc epsilon RI gamma-chains and can use this receptor for IgE-mediated allergen presentation. *J Immunol Baltim Md 1950* 157:607–616

165. McKee AS, Munks MW, MacLeod MKL, Fleenor CJ, Van Rooijen N, Kappler JW, Marrack P (2009) Alum induces innate immune responses through macrophage and mast cell sensors, but these sensors are not required for alum to act as an adjuvant for specific immunity. *J Immunol Baltim Md 1950* 183:4403–4414

166. McMillan SJ, Lloyd CM (2004) Prolonged allergen challenge in mice leads to persistent airway remodelling. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol* 34:497–507

167. Méndez-Enríquez E, Hallgren J (2019) Mast Cells and Their Progenitors in Allergic Asthma. *Front Immunol* 10:821

168. Mezey E, Tóth ZE, Cortright DN, Arzubi MK, Krause JE, Elde R, Guo A, Blumberg PM, Szallasi A (2000) Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3655–3660

169. Mitchell JE, Campbell AP, New NE, Sadofsky LR, Kastelik JA, Mulrennan SA, Compton SJ, Morice AH (2005) Expression and Characterization of the Intracellular Vanilloid Receptor (trpv1) in Bronchi from Patients with Chronic Cough. *Exp Lung Res* 31:295–306

170. Miyake T, Nakamura S, Zhao M, So K, Inoue K, Numata T, Takahashi N, Shirakawa H, Mori Y, Nakagawa T, Kaneko S (2016) Cold sensitivity of TRPA1 is unveiled by the prolyl hydroxylation blockade-induced sensitization to ROS. *Nat Commun* 7:ncomms12840

171. Montell C, Jones K, Hafen E, Rubin G (1985) Rescue of the *Drosophila* phototransduction mutation *trp* by germline transformation. *Science* 230:1040–1043

172. Montell C, Rubin GM (1989) Molecular characterization of the *drosophila* *trp* locus: A putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2:1313–1323

173. Mori T, Saito K, Ohki Y, Arakawa H, Tominaga M, Tokuyama K (2011) Lack of transient receptor potential vanilloid-1 enhances Th2-biased immune response of the airways in mice receiving intranasal, but not intraperitoneal, sensitization. *Int Arch Allergy Immunol* 156:305–312

174. Mukai K, Tsai M, Saito H, Galli SJ (2018) Mast cells as sources of cytokines, chemokines, and growth factors. *Immunol Rev* 282:121–150

175. Nadel JA (1992) Biologic Effects of Mast Cell Enzymes. *Am Rev Respir Dis* 145:S37–S41

176. Nassenstein C, Kwong K, Taylor-Clark T, Kollarik M, MacGlashan DM, Braun A, Undem BJ (2008) Expression and function of the ion channel TRPA1 in vagal afferent nerves innervating mouse lungs. *J Physiol* 586:1595–1604

177. Nassini R, Pedretti P, Moretto N, Fusi C, Carnini C, Facchinetti F, Viscomi AR, Pisano

AR, Stokesberry S, Brunmark C, Svitacheva N, McGarvey L, Patacchini R, Damholt AB, Geppetti P, Materazzi S (2012) Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Channel Localized to Non-Neuronal Airway Cells Promotes Non-Neurogenic Inflammation. *PLoS ONE* 7:

178. Naveed S-U-N, Clements D, Jackson DJ, Philp C, Billington CK, Soomro I, Reynolds C, Harrison TW, Johnston SL, Shaw DE, Johnson SR (2017) Matrix Metalloproteinase-1 Activation Contributes to Airway Smooth Muscle Growth and Asthma Severity. *Am J Respir Crit Care Med* 195:1000–1009

179. Nials AT, Uddin S (2008) Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. *Dis Model Mech* 1:213–220

180. Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA (2007) Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev* 87:165–217

181. Nozawa K, Kawabata-Shoda E, Doihara H, Kojima R, Okada H, Mochizuki S, Sano Y, Inamura K, Matsushime H, Koizumi T, Yokoyama T, Ito H (2009) TRPA1 regulates gastrointestinal motility through serotonin release from enterochromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:3408–3413

182. Oh M-H, OH SY, Lu J, Lou H, Myers A, Zhu Z, Zheng T (2013) TRPA1-Dependent Pruritus in IL-13-Induced Chronic Atopic Dermatitis. *J Immunol Baltim Md* 191:5371–5382

183. Olah Z, Szabo T, Karai L, Hough C, Fields RD, Caudle RM, Blumberg PM, Iadarola MJ (2001) Ligand-induced Dynamic Membrane Changes and Cell Deletion Conferred by Vanilloid Receptor 1. *J Biol Chem* 276:11021–11030

184. Orion Corporation, Orion Pharma (2017) Safety, Tolerability, Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Effects of Single and Multiple Escalating Doses of ODM-108: A Single Centre Study in Healthy Male Volunteers. *clinicaltrials.gov* URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02432664>

185. Owen EH, Logue SF, Rasmussen DL, J. M. Wehner (1997) Assessment of learning by the Morris water task and fear conditioning in inbred mouse strains and F1 hybrids: implications of genetic background for single gene mutations and quantitative trait loci analyses. *Neuroscience* 80:1087–1099

186. Paredi P, Kharitonov SA, Barnes PJ (2002) Faster rise of exhaled breath temperature in asthma: a novel marker of airway inflammation? *Am J Respir Crit Care Med* 165:181–184

187. Persson CGA, Erjefält JS, Korsgren M, Sundler F (1997) The mouse trap. *Trends Pharmacol Sci* 18:465–467

188. Petrus M, Peier AM, Bandell M, Hwang SW, Huynh T, Olney N, Jegla T, Patapoutian A (2007) A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. *Mol Pain* 3:40

189. Platzer B, Ruiter F, van der Mee J, Fiebiger E (2011) Soluble IgE receptors – elements of the IgE network. *Immunol Lett* 141:36–44



190. Prasad P, Yanagihara AA, Small-Howard AL, Turner H, Stokes AJ (2008) Secretogranin III Directs Secretory Vesicle Biogenesis in Mast Cells in a Manner Dependent upon Interaction with Chromogranin A. *J Immunol* 181:5024–5034
191. Premkumar LS, Ahern GP (2000) Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature* 408:985–990
192. Prussin C, Metcalfe DD (2006) 5. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 117:S450–S456
193. Raemdonck K, Baker K, Dale N, Dubuis E, Shala F, Belvisi MG, Birrell MA (2016) CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells play a central role in a HDM driven model of allergic asthma. *Respir Res* 17:45
194. Rayner HC, Atkins RC, Westerman RA (1989) Relief of local stump pain by capsaicin cream. *Lancet Lond Engl* 2:1276–1277
195. Rosen JM, Yaggie RE, Woida PJ, Miller RJ, Schaeffer AJ, Klumpp DJ (2018) TRPV1 and the MCP-1/CCR2 Axis Modulate Post-UTI Chronic Pain. *Sci Rep* 8:7188
196. Ross DR, Varipapa RJ (1989) Treatment of painful diabetic neuropathy with topical capsaicin. *N Engl J Med* 321:474–475
197. Rothe T (2018) A century of “intrinsic asthma”. *Allergo J* 27:19–23
198. Rotto DM, Kaufman MP (1988) Effect of metabolic products of muscular contraction on discharge of group III and IV afferents. *J Appl Physiol* 64:2306–2313
199. Saglani S, Mathie SA, Gregory LG, Bell MJ, Bush A, Lloyd CM (2009) Pathophysiological Features of Asthma Develop in Parallel in House Dust Mite–Exposed Neonatal Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 41:281–289
200. Samanta A, Hughes TET, Moiseenkova-Bell VY (2018) Transient Receptor Potential (TRP) Channels. *Subcell Biochem* 87:141–165
201. Samivel R, Kim DW, Son HR, Rhee Y-H, Kim EH, Kim JH, Bae J-S, Chung Y-J, Chung P-S, Raz E, Mo J-H (2015) The role of TRPV1 in the CD4<sup>+</sup> T cell-mediated inflammatory response of allergic rhinitis. *Oncotarget* 7:148–160
202. Sanders KM, Nattkemper LA, Rosen JD, Andersen HH, Hsiang J, Romanelli P, Bernigaud C, Guillot J, Chosidow O, Yosipovitch G (2019) Non-Histaminergic Itch Mediators Elevated in the Skin of a Porcine Model of Scabies and of Human Scabies Patients. *J Invest Dermatol* 139:971–973
203. Schmit D, Le DD, Heck S, Bischoff M, Tschernig T, Herr C, Beisswenger C, Kobelt P, Lepper PM, Chung KF, Bals R, Dinh QT (2017) Allergic airway inflammation induces migration of mast cell populations into the mouse airway. *Cell Tissue Res* 1–10
204. Schwartz LB (2006) Diagnostic Value of Tryptase in Anaphylaxis and Mastocytosis. *Immunol Allergy Clin North Am* 26:451–463
205. Shaik Y, Caraffa A, Ronconi G, Lessiani G, Conti P (2018) Impact of polyphenols on mast cells with special emphasis on the effect of quercetin and luteolin. *Cent-Eur J Immunol*

43:476–481

206. Shigetomi E, Tong X, Kwan KY, Corey DP, Khakh BS (2012) TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. *Nat Neurosci* 15:70–80
207. Shirakawa H, Yamaoka T, Sanpei K, Sasaoka H, Nakagawa T, Kaneko S (2008) TRPV1 stimulation triggers apoptotic cell death of rat cortical neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 377:1211–1215
208. Sicuteri F, Fusco BM, Marabini S, Campagnolo V, Maggi CA, Geppetti P, Fanciullacci M (1989) Beneficial effect of capsaicin application to the nasal mucosa in cluster headache. *Clin J Pain* 5:49–53
209. Sinica V, Zimova L, Barvikova K, Macikova L, Barvik I, Vlachova V (2019) Human and Mouse TRPA1 Are Heat and Cold Sensors Differentially Tuned by Voltage. *Cells* 9:
210. Smith H (1992) Asthma, inflammation, eosinophils and bronchial hyperresponsiveness. *Clin Exp Allergy* 22:187–197
211. Smith MP, Beacham D, Ensor E, Koltzenburg M (2004) Cold-sensitive, menthol-insensitive neurons in the murine sympathetic nervous system. *NeuroReport* 15:1399–1403
212. So K, Tei Y, Zhao M, Miyake T, Hiyama H, Shirakawa H, Imai S, Mori Y, Nakagawa T, Matsubara K, Kaneko S (2016) Hypoxia-induced sensitisation of TRPA1 in painful dysesthesia evoked by transient hindlimb ischemia/reperfusion in mice. *Sci Rep* 6:
213. So K (2020) [Roles of TRPA1 in Painful Dysesthesia]. *Yakugaku Zasshi* 140:1–6
214. Souza Monteiro de Araujo D, Nassini R, Geppetti P, De Logu F (2020) TRPA1 as a therapeutic target for nociceptive pain. *Expert Opin Ther Targets* 24:997–1008
215. Spahn V, Stein C, Zöllner C (2014) Modulation of Transient Receptor Vanilloid 1 Activity by Transient Receptor Potential Ankyrin 1. *Mol Pharmacol* 85:335–344
216. Ständer S, Moormann C, Schumacher M, Buddenkotte J, Artuc M, Shpacovitch V, Brzoska T, Lippert U, Henz BM, Luger TA, Metze D, Steinhoff M (2004) Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures. *Exp Dermatol* 13:129–139
217. Staruschenko A, Jeske NA, Akopian AN (2010) Contribution of TRPV1-TRPA1 interaction to the single channel properties of the TRPA1 channel. *J Biol Chem* 285:15167–15177
218. Stewart AP, Smith GD, Sandford RN, Edwardson JM (2010) Atomic force microscopy reveals the alternating subunit arrangement of the TRPP2-TRPV4 heterotetramer. *Biophys J* 99:790–797
219. Storti B, Bizzarri R, Cardarelli F, Beltram F (2012) Intact microtubules preserve transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) functionality through receptor binding. *J Biol Chem* 287:7803–7811
220. Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A (2003) ANKTM1,

a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112:819–829

221. Stueber T, Eberhardt MJ, Caspi Y, Lev S, Binshtok A, Leffler A (2017) Differential cytotoxicity and intracellular calcium-signalling following activation of the calcium-permeable ion channels TRPV1 and TRPA1. *Cell Calcium* 68:34–44

222. Sun L-Z, Elsayed S, Aasen TB, Van Do T, Aardal NP, Florvaag E, Vaali K (2010) Comparison between Ovalbumin and Ovalbumin Peptide 323-339 Responses in Allergic Mice: Humoral and Cellular Aspects. *Scand J Immunol* 71:329–335

223. Sun Y, Liu M, Fan X, Zhou L, Li M, Hu F, Yue Q, Zhang Y (2021) Effects of cigarette smoke on the aggravation of ovalbumin-induced asthma and the expressions of TRPA1 and tight junctions in mice. *Mol Immunol* 135:62–72

224. Symanowicz PT, Gianutsos G, Morris JB (2004) Lack of role for the vanilloid receptor in response to several inspired irritant air pollutants in the C57Bl/6J mouse. *Neurosci Lett* 362:150–153

225. Takahashi N, Kuwaki T, Kiyonaka S, Numata T, Kozai D, Mizuno Y, Yamamoto S, Naito S, Knevels E, Carmeliet P, Oga T, Kaneko S, Suga S, Nokami T, Yoshida J, Mori Y (2011) TRPA1 underlies a sensing mechanism for O<sub>2</sub>. *Nat Chem Biol* 7:701–711

226. Takemura M, Quarcio D, Niimi A, Dinh QT, Geppetti P, Fischer A, Chung KF, Groneberg DA (2008) Is TRPV1 a useful target in respiratory diseases? *Pulm Pharmacol Ther* 21:833–839

227. Talavera K, Gees M, Karashima Y, Meseguer VM, Vanoirbeek JAJ, Damann N, Everaerts W, Benoit M, Janssens A, Vennekens R, Viana F, Nemery B, Nilius B, Voets T (2009) Nicotine activates the chemosensory cation channel TRPA1. *Nat Neurosci* 12:1293–1299

228. Task Force on Taxonomy (1994) Classification of chronic pain.

229. Taylor-Clark TE, Kollarik M, MacGlashan DW, Undem BJ (2005) Nasal sensory nerve populations responding to histamine and capsaicin. *J Allergy Clin Immunol* 116:1282–1288

230. Taylor-Clark TE, Nassenstein C, McAlexander MA, Undem BJ (2009) TRPA1: A potential target for anti-tussive therapy. *Pulm Pharmacol Ther* 22:71–74

231. Thomas KC, Sabnis AS, Johansen ME, Lanza DL, Moos PJ, Yost GS, Reilly CA (2007) Transient receptor potential vanilloid 1 agonists cause endoplasmic reticulum stress and cell death in human lung cells. *J Pharmacol Exp Ther* 321:830–838

232. Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D (1998) The Cloned Capsaicin Receptor Integrates Multiple Pain-Producing Stimuli. *Neuron* 21:531–543

233. Tominaga M, Tominaga T (2005) Structure and function of TRPV1. *Pflugers Arch* 451:143–150

234. Trevisani M, Smart D, Gunthorpe MJ, Tognetto M, Barbieri M, Campi B, Amadesi S, Gray J, Jerman JC, Brough SJ, Owen D, Smith GD, Randall AD, Harrison S, Bianchi A, Davis

JB, Geppetti P (2002) Ethanol elicits and potentiates nociceptor responses via the vanilloid receptor-1. *Nat Neurosci* 5:546–551

235. Tzagareli MG, Nozadze I, Tsiklauri N, Gurtskaia G (2019) TRPA1 Channel is Involved in SLIGRL-Evoked Thermal and Mechanical Hyperalgesia in Mice. *Med Sci Basel Switz* 7:

236. Tucker A, McMurtry IF, Alexander AF, Reeves JT, Grover RF (1977) Lung mast cell density and distribution in chronically hypoxic animals. *J Appl Physiol* 42:174–178

237. Turner H, Kinet JP (1999) Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI. *Nature* 402:B24-30

238. van den Berg MPM, Nijboer-Brinksma S, Bos IST, van den Berge M, Lamb D, van Faassen M, Kema IP, Gosens R, Kistemaker LEM (2021) The novel TRPA1 antagonist BI01305834 inhibits ovalbumin-induced bronchoconstriction in guinea pigs. *Respir Res* 22:48

239. Vandewauw I, De Clercq K, Mulier M, Held K, Pinto S, Van Ranst N, Segal A, Voet T, Vennekens R, Zimmermann K, Vriens J, Voets T (2018) A TRP channel trio mediates acute noxious heat sensing. *Nature* 555:662–666

240. Vellani V, Mapplebeck S, Moriondo A, Davis JB, McNaughton PA (2001) Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *J Physiol* 534:813–825

241. Vellani V, Kinsey AM, Prandini M, Hechtfisher SC, Reeh P, Magherini PC, Giacomoni C, McNaughton PA (2010) Protease activated receptors 1 and 4 sensitize TRPV1 in nociceptive neurones. *Mol Pain* 6:61

242. Viswanath V, Story GM, Peier AM, Petrus MJ, Lee VM, Hwang SW, Patapoutian A, Jegla T (2003) Opposite thermosensor in fruitfly and mouse. *Nature* 423:822–823

243. Vitte J (2015) Human mast cell tryptase in biology and medicine. *Mol Immunol* 63:18–24

244. Wang S, Brigoli B, Lim J, Karley A, Chung M-K (2018) Roles of TRPV1 and TRPA1 in Spontaneous Pain from Inflamed Masseter Muscle. *Neuroscience* 384:290–299

245. Wardlaw AJ, Dunnette S, Gleich GJ, Collins JV, Kay AB (1988) Eosinophils and Mast Cells in Bronchoalveolar Lavage in Subjects with Mild Asthma: Relationship to Bronchial Hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 137:62–69

246. Wasserman K, Whipp BJ, Casaburi R, Beaver WL (1977) Carbon Dioxide Flow and Exercise Hyperpnea. *Am Rev Respir Dis* 115:225–237

247. Watanabe N, Horie S, Michael GJ, Spina D, Page CP, Priestley JV (2005) Immunohistochemical localization of vanilloid receptor subtype 1 (TRPV1) in the guinea pig respiratory system. *Pulm Pharmacol Ther* 18:187–197

248. Watanabe N, Horie S, Michael GJ, Keir S, Spina D, Page CP, Priestley JV (2006) Immunohistochemical co-localization of transient receptor potential vanilloid (TRPV)1 and sensory neuropeptides in the guinea-pig respiratory system. *Neuroscience* 141:1533–1543

249. Watson CP, Evans RJ, Watt VR (1989) The post-mastectomy pain syndrome and the

effect of topical capsaicin. *Pain* 38:177–186

250. Weng H-J, Patel KN, Jeske NA, Bierbower SM, Zou W, Tiwari V, Zheng Q, Tang Z, Mo GCH, Wang Y, Geng Y, Zhang J, Guan Y, Akopian AN, Dong X (2015) Tmem100 Is a Regulator of TRPA1-TRPV1 Complex and Contributes to Persistent Pain. *Neuron* 85:833–846

251. Williams CMM, Galli SJ (2000) Mast Cells Can Amplify Airway Reactivity and Features of Chronic Inflammation in an Asthma Model in Mice. *J Exp Med* 192:455–462

252. Wilson SR, Gerhold KA, Bifolck-Fisher A, Liu Q, Patel KN, Dong X, Bautista DM (2011) TRPA1 is required for histamine-independent, Mas-related G protein-coupled receptor-mediated itch. *Nat Neurosci* 14:595–602

253. Winter Z, Gruschwitz P, Eger S, Touska F, Zimmermann K (2017) Cold Temperature Encoding by Cutaneous TRPA1 and TRPM8-Carrying Fibers in the Mouse. *Front Mol Neurosci* 10:209

254. Woodbury CJ, Zwick M, Wang S, Lawson JJ, Caterina MJ, Koltzenburg M, Albers KM, Koerber HR, Davis BM (2004) Nociceptors Lacking TRPV1 and TRPV2 Have Normal Heat Responses. *J Neurosci* 24:6410–6415

255. Wu LC (2011) Immunoglobulin E Receptor Signaling and Asthma. *J Biol Chem* 286:32891–32897

256. Xu M, Zhang Y, Wang M, Zhang H, Chen Y, Adcock IM, Chung KF, Mo J, Zhang Y, Li F (2019) TRPV1 and TRPA1 in Lung Inflammation and Airway Hyperresponsiveness Induced by Fine Particulate Matter (PM<sub>2.5</sub>). *Oxid Med Cell Longev* 2019:7450151

257. Yang H, Li S (2016) Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) Channel and Neurogenic Inflammation in Pathogenesis of Asthma. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res* 22:2917–2923

258. Yang YS, Cho SI, Choi MG, Choi YH, Kwak IS, Park CW, Kim HO (2015) Increased expression of three types of transient receptor potential channels (TRPA1, TRPV4 and TRPV3) in burn scars with post-burn pruritus. *Acta Derm Venereol* 95:20–24

259. Yarmolinsky DA, Peng Y, Pogorzala LA, Rutlin M, Hoon MA, Zuker CS (2016) Coding and Plasticity in the Mammalian Thermosensory System. *Neuron* 92:1079–1092

260. Youssef LA, Schuyler M, Wilson BS, Oliver JM (2010) Roles for the High Affinity IgE Receptor, FcεRI, of Human Basophils in the Pathogenesis and Therapy of Allergic Asthma: Disease Promotion, Protection or Both? *Open Allergy J* 3:91–101

261. Zeng D, Chen C, Zhou W, Ma X, Pu X, Zeng Y, Lv F, Zhou W (2020) TRPA1 deficiency reduces skin inflammation in 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis animal model. PreprintsURL: <https://www.authorea.com/users/320808/articles/450206-trpa1-deficiency-reduces-skin-inflammation-in-2-4-dinitrochlorobenzene-induced-atopic-dermatitis-animal-model?commit=f3b248d794c7f0e83dfc3fa4374f4d344e4ac59d>

262. Zeng D, Chen C, Zhou W, Ma X, Pu X, Zeng Y, Zhou W, Lv F (2021) TRPA1 deficiency alleviates inflammation of atopic dermatitis by reducing macrophage infiltration. *Life Sci*

266:118906

263. Zhang D, Spielmann A, Wang L, Ding G, Huang F, Gu Q, Schwarz W (2012) Mast-cell degranulation induced by physical stimuli involves the activation of transient-receptor-potential channel TRPV2. *Physiol Res* 61:113–124
264. Zhang H, Wickley PJ, Sinha S, Bratz IN, Damron DS (2011) Propofol Restores Transient Receptor Potential Vanilloid Receptor Subtype-1 Sensitivity via Activation of Transient Receptor Potential Ankyrin Receptor Subtype-1 in Sensory Neurons. *Anesthesiology* 114:1169–1179
265. Zhou E, Fu Y, Wei Z, Yang Z (2014) Inhibition of allergic airway inflammation through the blockage of NF- $\kappa$ B activation by ellagic acid in an ovalbumin-induced mouse asthma model. *Food Funct* 5:2106–2112
266. Zhou Y, Suzuki Y, Uchida K, Tominaga M (2013) Identification of a splice variant of mouse TRPA1 that regulates TRPA1 activity. *Nat Commun* 4:2399
267. Zhou Y, Han D, Follansbee T, Wu X, Yu S, Wang B, Shi Z, Domocos DT, Carstens M, Carstens E, Hwang ST (2019) Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) positively regulates imiquimod-induced, psoriasiform dermal inflammation in mice. *J Cell Mol Med* 23:4819–4828
268. Zurborg S, Yurgionas B, Jira JA, Caspani O, Heppenstall PA (2007) Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca<sup>2+</sup>. *Nat Neurosci* 10:277–279

## 8 Danksagung

Ohne eine ganze Reihe von Personen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Zualererst gilt mein besonderer Dank natürlich meinem Doktorvater Prof. Dr. Quoc Thai Dinh danken, welcher mir überhaupt erst die Möglichkeit zur Mitarbeit in seiner Arbeitsgruppe und zur Dissertation gab, mir bei der Themensuche und bei allen sonstigen Fragen, inklusive der Korrekturlesung, half.

Weiterhin danke ich den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Dinh: Dr. Duc Dung Le, welcher mir insbesondere bei der Einarbeitung im Labor half, Dr. rer. nat. Sebastian Heck und Frau Janine Schlicker für ihre Hilfe bei der Behandlung der Mäuse und den immunhistochemischen Färbungen, sowie Frau Shaza Harfoush für ihren Rat und ihre Hilfe beim ELISA-Verfahren.

Abschließend möchte ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung und ihren Zuspruch danken.

## **9 Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.



Tag der Promotion: 11.März.2022

Dekan: Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter:

1) Prof. Dr. med. Quoc Thai Dinh

2) Prof. Dr. med. Thomas Vogt