

Aus dem Bereich Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Signaltransduktion des TRPM3-Kationenkanals: Ca²⁺-Ionen, Proteinkinasen und -phosphatasen und Transkriptionsfaktoren

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

2019

vorgelegt von

Sandra Rubil

geboren am 23.10.1988 in Slavonski Brod / Kroatien

Tag des Kolloquiums:

Dekan: Prof. Dr. Michael D. Menger

Vorsitzender:

Berichterstatter: Prof. Dr. Gerald Thiel
Prof. Dr. Frank Schmitz

Akad. Mitarbeiter:

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Inhaltsverzeichnis | 4 |
| Abkürzungsverzeichnis | 1 |
| Zusammenfassung | 4 |
| Summary | 6 |
| 1. Einleitung | 8 |
| 1.1. TRP-Kanäle | 8 |
| 1.2. TRPM3 | 9 |
| 1.3. Moduläre Struktur von TRPM3-Kanälen | 10 |
| 1.4. Pharmakologie von TRPM3-Kanälen | 11 |
| 1.5. Signaltransduktion via TRPM3 | 13 |
| 1.5.1. Calcium und Calmodulin | 13 |
| 1.5.2. Proteinkinasen und -phosphatasen | 14 |
| 1.5.3. Transkriptionsfaktoren | 15 |
| 1.6. Zielsetzung | 23 |
| 1.6.1. Analyse der transkriptionellen Aktivität von CIM0216 über TRPM3 | 23 |
| 1.6.2. Untersuchung der Signalkaskade, die aktivierte TRPM3-Kanäle mit erhöhter c-Fos-Expression verbindet | 23 |
| 1.6.3. Identifizierung von Signaltransduktoren der Signalkaskade, die aktivierte TRPM3-Kanäle mit Elk-1-Stimulation verbindet | 23 |
| 1.6.4. Analyse eines AP-1-Zielgens nach TRPM3-Stimulation | 24 |
| 2. Material und Methoden | 25 |
| 2.1. Material | 25 |
| 2.1.1. Geräte | 25 |
| 2.1.2. Verbrauchsmaterialien | 26 |
| 2.1.3. Chemikalien und Feinchemikalien | 26 |
| 2.1.4. Verwendete Vektoren und Plasmide | 28 |
| 2.2. Methoden | 32 |
| 2.2.1. Herstellung chemisch-kompetenter Bakterienzellen | 32 |
| 2.2.2. Transformation chemisch-kompetenter Zellen | 32 |
| 2.2.3. Aufreinigung von Plasmid-DNA (Maxi-Plasmidpräparation) | 32 |
| 2.2.4. DNA-Restriktion | 33 |
| 2.2.5. Zellkultur | 33 |
| 2.2.6. Manipulation eukaryontischer Zellen durch lentiviralen Gentransfer | 37 |

| | | |
|--------|---|----|
| 2.2.7. | Reporteranalysen | 40 |
| 2.2.8. | Proteinbiochemische Methoden | 42 |
| 2.2.9. | Statistische Auswertung | 46 |
| 3. | Ergebnisse | 47 |
| 3.1. | Aktivierung der Gentranskription durch CIM0216, einem synthetischen Liganden von TRPM3-Kanälen | 47 |
| 3.1.1. | AP-1-Aktivität in Pregnenolonsulfat- oder CIM0216-stimulierten HEK293-Zellen, die den TRPM3-Kanal exprimieren | 47 |
| 3.1.2. | Die Stimulation mit CIM0216 erhöht signifikant das Transkriptionsaktivierungspotential von c-Fos und c-Jun in TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen | 48 |
| 3.1.3. | Die Inkubation mit Mefenaminsäure reduziert die CIM0216-induzierte AP-1-Aktivierung in TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen | 50 |
| 3.2. | Die Stimulation der TRPM3-Kanäle erhöht die c-Fos-Promotoraktivität, die c-Fos-Expression und das Transkriptionsaktivierungspotential von c-Fos | 51 |
| 3.2.1. | Pregnenolonsulfat bewirkt eine Transkriptionserhöhung von c-Fos-Promotor/Luziferase-Reportergen | 51 |
| 3.2.2. | Die Proteinphosphatasen MKP-1 und MKP-5 vermindern die Pregnenolonsulfat-induzierte Aktivierung des c-Fos-Promotors sowie die c-Fos-Expression in TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen | 52 |
| 3.2.3. | Die TRPM3-induzierte Signalkaskade zielt auf das CRE-Element im c-Fos-Promotor ab | 54 |
| 3.2.4. | Die AP-1-Bindestelle und die CARG-Box sind Pregnenolonsulfat-responsive Elemente im murinen c-Fos-Promotor | 58 |
| 3.2.5. | Die Expression einer dominant-negativen Mutante des Transkriptionsfaktors Elk-1 reduziert die vom c-Fos-Promotor regulierte Reportertranskription sowie die c-Fos-Expression in TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen | 60 |
| 3.2.6. | Die Expression einer dominant-negativen Mutante des Transkriptionsfaktors c-Jun vermindert die vom c-Fos-Promotor regulierte Reportertranskription und die c-Fos-Expression via TRPM3 | 62 |
| 3.2.7. | Stimulation von TRPM3-Kanälen mit Pregnenolonsulfat erhöht das Transkriptionsaktivierungspotential von c-Fos | 64 |
| 3.3. | Stimulation von TRPM3-Kanälen erhöht das Transkriptionsaktivierungspotential von Elk-1 unter Beteiligung von zytosolischem Ca ²⁺ , der extrazellulär signalregulierten Proteinkinase (ERK) und Calcineurin | 65 |
| 3.3.1. | Die Pregnenolonsulfat-induzierte Hochregulation des transkriptionalen Aktivierungspotentials von Elk-1 in TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen erfordert den Einstrom von Ca ²⁺ -Ionen | 66 |
| 3.3.2. | Ein Anstieg der zytoplasmatischen Ca ²⁺ -Konzentration ist notwendig, um die Expression von Elk-1 nach Stimulation von TRPM3 zu aktivieren | 67 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 3.3.3. | Hemmung des ERK-Signalweges reduziert die Pregnenolonsulfat-induzierte Aktivierung von Elk-1 in HEK293-Zellen, die TRPM3 exprimieren | 69 |
| 3.3.4. | Calcineurin reduziert die Pregnenolonsulfat-induzierte Hochregulation des transkriptionalen Aktivierungspotentials von Elk-1 in HEK293-Zellen, die TRPM3-Kanäle exprimieren | 71 |
| 3.4. | Stimulation des TRPM3-Kanals aktiviert die Gentranskription von Interleukin-8 unter Beteiligung von AP-1/c-Jun und der Proteinkinase ERK | 72 |
| 3.4.1. | Die Stimulation von TRPM3-Kanälen mit Pregnenolonsulfat aktiviert den Interleukin-8-Promotor | 72 |
| 3.4.2. | Die AP-1-Bindestelle des IL-8-Promotors stellt ein Pregnenolonsulfat-responsives Element dar | 74 |
| 3.4.3. | Die Transkriptionsfaktoren c-Jun und ATF2 sind notwendig, um die IL-8-Promotoraktivität nach TRPM3-Stimulation zu erhöhen | 76 |
| 3.4.4. | TCFs sind an einer erhöhten IL-8-Promotoraktivität via TRPM3 beteiligt | 78 |
| 3.4.5. | Die Protein-Phosphatase MKP-1 vermindert die Pregnenolonsulfat-induzierte Stimulation des IL-8-Promotors in TRPM3-exprimierenden HEK293 Zellen | 79 |
| 3.4.6. | Die MAP-Kinase ERK1/2 wirkt als Signaltransduktor zwischen aktivierten TRPM3-Kanälen und dem IL-8-Gen | 80 |
| 4. | Diskussion | 83 |
| 4.1. | CIM2016 reguliert die Gentranskription in TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen | 83 |
| 4.2. | c-Fos ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor in der PregS-induzierten TRPM3-Signalkaskade | 84 |
| 4.3. | Rolle von Elk-1 in der TRPM3-vermittelten Signaltransduktion | 89 |
| 4.4. | Das Interleukin-8-Gen ist ein Zielgen der TRPM3-vermittelten Signalkaskade | 90 |
| 5. | Ausblick | 94 |
| 6. | Literaturverzeichnis | 95 |
| 7. | Publikationen und Poster | 111 |
| 8. | Danksagung | 112 |
| 9. | Lebenslauf | |

Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| (v/v) | Verhältnis von Volumen zu Volumen |
| (w/v) | Verhältnis von Gewicht zu Volumen |
| °C | Grad Celsius |
| 4-OHT | 4-Hydroxytamoxifen |
| A | Ampère |
| A. dest. | <i>Aqua destillatum</i> |
| Abb. | Abbildung |
| Ach | Acetylcholin |
| AP-1 | Aktivator-Protein-1 |
| APS | Ammoniumperoxiddisulfat |
| ATF | <i>activating transcription factor</i> |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| Bp | Basenpaare |
| BSA | <i>bovine serum albumin</i> |
| bZIP | <i>basic leucin zipper protein</i> |
| C-Terminus | Carboxyl-Terminus einer Desoxyribonukleinsäure |
| Ca ²⁺ | Calcium-Ion |
| cDNA | komplementäre Desoxyribonukleinsäure |
| CMV | Cytomegalo-Virus |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| CoA | Coenzym A |
| coll | Kollagenase |
| CRE | <i>cAMP-response-element</i> |
| CREB | <i>cAMP-response-element-binding protein</i> |
| DMEM | „Dulbecco`s Modified Eagle Medium“ |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DTT | Dithiothreitol |
| E. coli | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGF | <i>epidermal growth factor</i> |
| Egr-1 | <i>early growth response factor 1</i> |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| ERK | <i>extracellular signal-regulated protein kinase</i> |
| EtOH | Ethanol |
| FCS | <i>fetal calf serum</i> |
| FLAP | <i>HIV-flap element</i> |
| g | Gramm |
| G-Protein | heterotrimeres, GTP-bindendes Protein |
| h | Stunde |
| H ₂ O | Wasser |
| HBSS | Hank`s balanced salt solution |
| HDAC | Histondeacetylase |
| HEPES | [4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinmethan]-sulfonsäure |
| HIV | <i>Human Immunodeficiency Virus</i> |
| IP ₃ | Inositol-1,4,5,-triphosphat |
| JNK | <i>Jun-N-terminal kinase</i> |
| kb | Kilobase |
| KCl | Kaliumchlorid |
| kDa | Kilodalton |
| LB-Medium | <i>lysogeny broth-Medium</i> |
| LTR | long terminal repeat |
| LU | Lightunits |
| luc | Luziferase |
| M | Molar |
| NES | <i>nuclear export signal</i> |
| NLS | <i>nuclear localisation signal</i> |
| PKA/C | Proteinkinase A/C |
| RT | Raumtemperatur |
| rtTA | reverser Tet-gesteuerter Transaktivator |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| sec | Sekunde |
| SRE | <i>serum response element</i> |
| SV | Similian Virus |
| TBS | <i>Tris-buffered saline</i> |
| TBS-T | <i>Tris-buffered saline + Tween</i> |
| TCF | <i>ternary complex factors</i> |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethyldiamin |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------|---|
| TetO | <i>Tet Operator Sequenz</i> |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| TPA | 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat |
| TRE | TPA responsible element |
| TRP | <i>transient receptor potential</i> |
| U | Unit |
| URE | <i>upstream regulator element</i> |
| UV | Ultraviolet |
| V | Volt |
| Vol. | Volumen |
| VSV | Vesicular Stomatitis Virus |
| WPRE | Woodchuck hepatitis virus Posttranscriptional Regulatory Element |
| x g | x Erdbeschleunigung |
| µg | Mikrogramm 10 ⁻³ Milligramm |
| µl | Mikroliter 10 ⁻³ Milliliter |
| µM | Mikromolar 10 ⁻⁶ Molar |
| µm | Mikrometer 10 ⁻⁶ Meter |

Zusammenfassung

Der TRPM3-Ionenkanal gehört zur Familie der TRP-Kationenkanäle (TRP = "transient receptor potential"), die in einer Vielzahl von Geweben und Zelltypen exprimiert werden. Obwohl gewebsspezifische Liganden des TRPM3-Kanals derzeit unbekannt sind, kann dieser Ionenkanal durch das Neurosteroid Pregnenolonsulfat, den synthetischen Liganden CIM0216 und durch Temperaturen, die zu einer Verletzung des Gewebes führen können, aktiviert werden. In dieser Arbeit wurde ein HEK293-Zell-System verwendet, das es ermöglichte, die Expression des TRPM3-Ionenkanals selektiv durch die Gabe von Tetrazyklin zu induzieren. Durch die Verwendung dieses Systems wurde die durch die Agonisten Pregnenolonsulfat (PregS) und CIM0216 ausgelöste Signalkaskade und die darauffolgende Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren umfangreich charakterisiert.

Die Stimulation von TRPM3 durch Pregnenolonsulfat steigerte die Aktivität der Transkriptionsfaktoren AP-1, CREB und Elk-1. In meiner Arbeit habe ich den Signalweg untersucht, der einen Ca^{2+} -Einstrom nach der Aktivierung des TRPM3-Kanals mit einer erhöhten Expression des bZIP-Transkriptionsfaktors c-Fos, einem Zielgen von Elk-1, verbindet. Meine Analyse des Signalwegs zwischen aktiviertem TRPM3 und erhöhter c-Fos-Expression zeigte, dass sowohl MAP-Kinasen (ERK-Signalweg) als auch die Transkriptionsfaktoren CREB, SRF, AP-1, sowie Elk-1 Signalmoleküle sind, die an der Stimulus-induzierten Regulation der c-Fos-Gentranskription beteiligt sind.

CIM0216, ein synthetischer Ligand des TRPM3-Ionenkanals, aktivierte den dimeren Transkriptionsfaktor AP-1 und stimulierte die transkriptionalen Aktivierungspotentiale von c-Jun und c-Fos. Es hatte jedoch ein geringeres Potenzial als PregS, die TRPM3-vermittelte Gentranskription zu aktivieren.

Der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Zellen ist von grundlegender Bedeutung für die Aktivierung von Elk-1 nach Stimulation von TRPM3. Ich konnte mithilfe von Calcium-bindenden Proteinen mit Zellkernlokalisationssequenz zeigen, dass ein Anstieg cytoplasmatischer Ca^{2+} -Ionen für die Erhöhung des Transkriptionsaktivierungspotentials von Elk-1 entscheidend war, während die Pufferung von Ca^{2+} im Zellkern keine Wirkung auf die Transkriptionsaktivität von Elk-1 hatte. Die Untersuchungen ergaben weiter, dass die Stimulation der TRPM3-Kanäle zur Aktivierung der MAP-Kinase ERK (extrazelluläre signalregulierte Proteinkinase) führte, die wiederum eine wichtige Rolle bei der Stimulation der Transaktivierungsaktivität von Elk-1 führt. Weiterhin konnte

ich herausfinden, dass die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinphosphatase Calcineurin als ein negativer Rückkopplungsmechanismus der durch TRPM3 vermittelten Ca^{2+} -abhängigen Stimulation von Elk-1 diene, da die Expression einer konstitutiv aktiven Calcineurin-Mutante im Zellkern zu einer verminderten Elk-1-Expression führte.

Ein weiteres Ziel meiner Arbeit war es, durch den Transkriptionsfaktor AP-1 regulierte Zielgene in Folge der Stimulation des TRPM3-Ionenkanals zu finden. Dies führte zur Identifizierung des Interleukin-8 Gens (IL-8). Die Stimulation von TRPM3-Kanälen führte zu einer gesteigerten Aktivität des IL-8-Promoters. Eine eingehende Analyse des IL-8-Promoters mit verschiedenen Promotor-Mutanten ergab, dass die AP-1-Bindestelle des IL-8-Promoters eine entscheidende Rolle spielt. Zudem sind die basische Leucin-Zipper-Proteine c-Jun und ATF2 sowie der ternäre Komplexfaktor Elk-1 und die extrazelluläre signalregulierte Proteinkinase (ERK1/2) essentiell für eine verstärkte Transkription des IL-8-Gens nach TRPM3-Stimulation.

Summary

The TRPM3 ion channel belongs to the family of transient receptor potential (TRP) cation channels, which are expressed in a variety of tissues and cell types. Although tissue-specific ligands of the TRPM3 channel are currently unknown, this ion channel can be activated by the neurosteroid pregnenolone sulfate, the synthetic ligand CIM0216, and by noxious heat. In my thesis, a HEK293 cell system was used, which allowed to induce the expression of the TRPM3 ion channel selectively by the administration of tetracycline. By using this system, the signaling cascade triggered by the agonists pregnenolone sulfate (PregS) and CIM0216 and the subsequent activation of various transcription factors were extensively characterized.

The stimulation of TRPM3 by pregnenolone sulfate increased the activity of the transcription factors AP-1, CREB and Elk-1. Here, I investigated the signaling pathway that links Ca^{2+} influx following activation of the TRPM3 channel with increased expression of the bZIP transcription factor c-Fos, a target gene of Elk-1. My analysis of the signaling pathway between activated TRPM3 and increased c-Fos expression showed that both MAP kinases (ERK signaling pathway) and the transcription factors CREB, SRF, AP-1, as well as Elk-1 are signaling molecules that are involved in the stimulus induced regulation of c-Fos gene transcription.

CIM0216, a synthetic ligand of the TRPM3 ion channel, activated the dimeric transcription factor AP-1 and stimulated the transcriptional activation potentials of c-Jun and c-Fos. However, it had less potential than PregS to activate TRPM3-mediated gene transcription.

The influx of Ca^{2+} ions into the cells is of fundamental importance for the activation of Elk-1 after stimulation of TRPM3. Using calcium-binding proteins with a nucleus localization sequence I could show that an increase in cytoplasmic Ca^{2+} ions was crucial for increasing the transcriptional activation potential of Elk-1, whereas buffering of Ca^{2+} in the nucleus had no effect on the transcriptional activity of Elk-1. The investigations further revealed that stimulation of the TRPM3 channels resulted in an activation of MAP kinase ERK (extracellular signal-regulated protein kinase), which in turn plays an important role in stimulating the transactivational activity of Elk-1. Furthermore, I found that the Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin served as a negative feedback mechanism of TRPM3-mediated Ca^{2+} -dependent Elk-1 stimulation because expression of a constitutively active calcineurin mutant in the nucleus resulted in a decreased Elk-1 expression.

Summary

Another goal of my work was to find AP-1-regulated target genes following stimulation of the TRPM3 ion channel. This led to the identification of the interleukin-8 gene (IL-8). Stimulation of TRPM3 channels resulted in an increased activity of the IL-8 promoter. A detailed analysis of the IL-8 promoter with different promoter mutants revealed that the AP-1 binding site of the IL-8 promoter plays a crucial role. In addition, the basic leucine zipper proteins c-Jun and ATF2 as well as the ternary complex factor Elk-1 and the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK1 / 2) are essential for an enhanced transcription of the IL-8 gene following TRPM3 stimulation.

1. Einleitung

Die Organisation eines vielzelligen Organismus wird durch die Kommunikation einzelner Gewebe und Zellen untereinander koordiniert und reguliert. Im Laufe der Evolution haben sich dabei viele verschiedene Mechanismen der Übertragung von Signalen, der so genannten Signaltransduktion, entwickelt. Praktisch jede zelluläre Funktion innerhalb eines komplexen Organismus, wie z.B. die Regulation von Stoffwechsel und Genexpression, die Organisation des Zytoskeletts und sogar das Überleben der Zelle, ist abhängig von externen Signalmolekülen, wie beispielsweise Hormone, Zytokine, Ionen und Neurotransmitter, oder auch von sensorischen Signalen wie Wärme, Licht, elektrischen und mechanischen Reizen (Pawson and Scott, 2010). Intrazellulär erfolgt die Signalweiterleitung über Protein-Protein-Interaktionen, durch Phosphorylierung durch Kinasen bzw. Dephosphorylierung durch Phosphatasen oder durch sekundäre Botenstoffe, wie z.B. zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) oder ionisiertes Calcium (Ca^{2+}).

1.1. TRP-Kanäle

Transient Receptor Potential (TRP)-Kanäle stellen eine Familie von zellulären Kationenkanälen dar, die 28 homologe Proteine umfasst und die in sieben Klassen unterteilt werden können. Man unterscheidet TRPC-(Canonisch), TRPV-(Vanilloid), TRPM-(Melastatin), TRPML-(Mucolipin), TRPP-(Polycystin), TRPA-(Ankyrin) und TRPN-('NOMPC') Kanäle (Abbildung 1) (Pedersen et al., 2005).

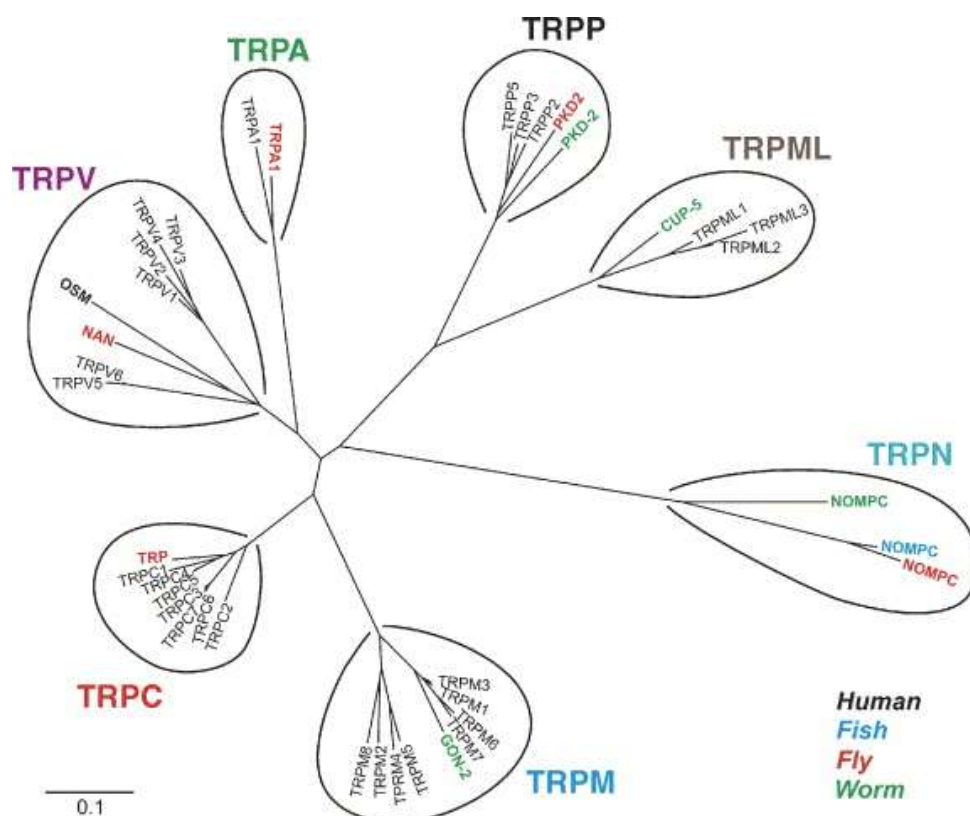


Abbildung 1 Stammbaum der TRP Ionenkanal-Familie.

Die Familie der TRP-Kanäle von Säugetieren besteht aus 28 Mitgliedern, die wiederum in sieben Klassen unterteilt sind (Pedersen et al., 2005).

TRP-Kanäle unterscheiden sich in ihrer Permeabilität bzw. Selektivität gegenüber Kationen sowie in ihren Aktivierungsmechanismen (Clapham et al., 2001). Sie werden in Geweben im gesamten Körper differentiell exprimiert und Störungen in ihrer Funktion sind mit zahlreichen Krankheiten wie z.B. Krebs, Glomerulosklerose und polyzystische Nierenerkrankung assoziiert.

Mehrere Mutationen, die in TRP-kodierenden Genen nachgewiesen wurden, wurden mit menschlichen Erkrankungen korreliert. Darüber hinaus werden TRP-Kanalproteine als Rezeptoren für Arzneimittel betrachtet. Zum Beispiel beeinflusst der Capsaicin-Rezeptor TRPV1 die Schmerzempfindung und ist zu einem Hauptziel für die Entwicklung von Analgetika geworden.

1.2. TRPM3

Die meisten TRP-Kanäle sind für Ca^{2+} durchlässig, wobei TRPM3 als relativ effizienter Ca^{2+} -Kanal klassifiziert wurde (Nilius and Flockerzi, 2014). Während in der Vergangenheit Liganden-aktivierte TRP-Kanäle wie TRPV1 oder der Menthol-aktivierte TRPM8-Kanal, intensiv untersucht wurden,

hat die Erforschung von TRPM3-Kanalsignalen und -funktionen erst kürzlich mit der Identifizierung von Pregnenolonsulfat als Ligand von TRPM3-Kanälen an Bedeutung gewonnen (Wagner et al., 2008). Dies ermöglichte die Durchführung von Experimenten hinsichtlich Signaltransduktion und biologischer Funktionen von aktivierten TRPM3-Kanälen.

1.3. Moduläre Struktur von TRPM3-Kanälen

TRPM3-Kanäle besitzen wie alle Mitglieder der TRP-Familie sechs Transmembrandomänen und eine ionenleitende Pore zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne (Abbildung 2). TRPM3-Kanäle haben außergewöhnlich lange N-terminale und C-terminale Domänen, die beide im Zytosol lokalisiert sind. Eine TRP-Domäne oder TRP-Box befindet sich auf der C-terminalen Seite der sechsten Transmembrandomäne, während zwei Calmodulin-Bindestellen innerhalb des N-terminalen zytosolischen Teils von TRPM3 kartiert wurden (Holakovska et al., 2012). Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat tritt mit den N-terminalen Calmodulin-Bindestellen in Wechselwirkung (Holendova et al., 2012).

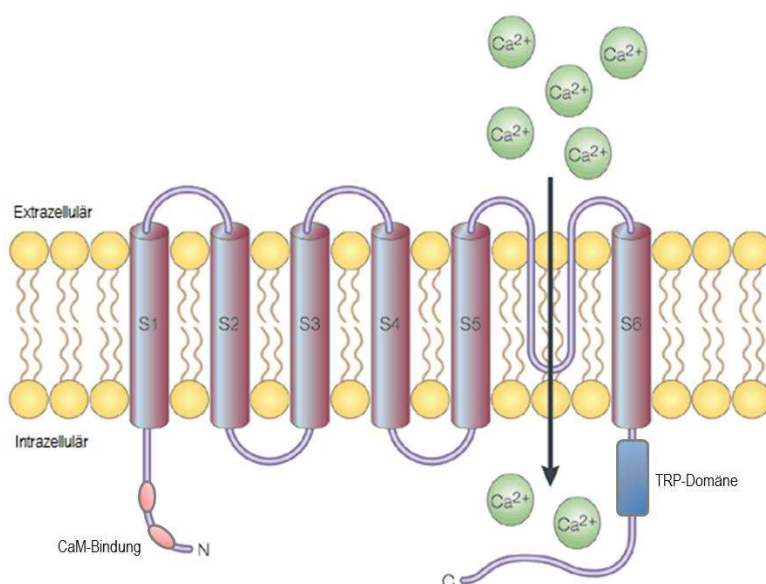


Abbildung 2 Schematische Darstellung des TRPM3-Kanals. TRPM3 besitzt sechs Transmembrandomänen mit einer porenbildenden Domäne zwischen den Transmembrandomänen 5 und 6. Sowohl N- als auch C-Terminus befinden sich im Zytosol. Der N-Terminus enthält zwei Calmodulin-Bindestellen, der C-Terminus enthält die TRP-Domäne auf der C-terminalen Seite der sechsten Transmembrandomäne (modifiziert nach Clapham et al., 2001).

Viele TRPM3-Isoformen werden durch alternatives Spleißen erzeugt, was auffällige Unterschiede in ihren Ca^{2+} -Permeabilitäten aufgrund von Änderungen in der Primärsequenz der Porenregion

des Kanals zeigt. Die TRPM3-Isoformen TRPM3 α 1 und TRPM3 α 2 unterscheiden sich beispielsweise innerhalb der Porenregion des Kanals, wobei TRPM3 α 1-Kanäle zusätzliche 12 Aminosäuren im Vergleich zu TRPM3 α 2 aufweisen. So sind TRPM3 α 1-Kanäle für zweiwertige Kationen schlecht durchlässig. Im Gegensatz dazu sind TRPM3 α 2-Kanäle mindestens 10-mal permeabler für Ca²⁺ und mindestens 100-mal permeabler für Mg²⁺ als TRPM3 α 1-Kanäle (Frühwald et al., 2012). Es wird darüber hinaus die Präsenz eines alternativen Wegs der Kanaldurchdringung diskutiert, der spezifisch durch Co-Stimulation von TRPM3-Kanälen mit Pregnenolonsulfat und Clotrimazol aktiviert werden kann (Vriens et al., 2014).

1.4. Pharmakologie von TRPM3-Kanälen

Die endogenen Liganden für TRPM3 wurden bisher noch nicht eindeutig identifiziert. Dennoch wurden mehrere Metabolite und synthetische Verbindungen als Liganden für TRPM3-Kanäle vorgeschlagen, einschließlich des Steroids Pregnenolonsulfat, des Lipids d-Erythro-Sphingosin und des Inhibitors L-Typ spannungsgesteuerter Ca²⁺-Kanäle, Nifedipin (Grimm et al., 2003; Wagner et al., 2008; Naylor et al., 2010).

Der Ca²⁺-Einstrom und der anschließende Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration wurde als Indikation für die Aktivierung von TRPM3-Kanälen bestimmt. Ein Einstrom von Ca²⁺-Ionen induziert jedoch nicht notwendigerweise eine intrazelluläre Signalkaskade. Obwohl ein Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration durch d-Erythro-Sphingosin und Nifedipin induziert wurde, war es für die Induktion einer intrazellulären Signalkaskade, die das Genexpressionsmuster der Zellen verändern könnte, unzureichend. Die Analyse TRPM3-defizienter sensorischer Neuronen bestätigte, dass Nifedipin kein Ligand für TRPM3 ist (Vriens et al., 2011), jedoch in der Lage ist TRPA1-Kanäle zu aktivieren.

In meiner Masterarbeit konnte ich mit Hilfe von Experimenten mit stimulus-responsiven Transkriptionsfaktoren als Maß für aktivierte TRPM3-Kanäle zeigen, dass Pregnenolonsulfat ein potenter Aktivator von TRPM3-Kanälen ist (Lesch et al, 2014).

Studien mit sensorischen Neuronen aus TRPM3-defizienten Mäusen bestätigten, dass TRPM3 der Hauptrezeptor für Pregnenolonsulfat ist, einem endogenen Steroid, das aus Pregnenolon synthetisiert wird. Es aktiviert TRPM3-Kanäle durch Bindung an die extrazelluläre Seite der Membran (Wagner et al., 2008). Es wird angenommen, dass es eine stereospezifische Bindestelle, die "Steroid-Modulationsdomäne", für Pregnenolonsulfat innerhalb des TRPM3-Moleküls gibt. Diese spezifische Bindestelle wurde jedoch bisher noch nicht identifiziert. Andere

Steroide, einschließlich Pregnenolon, Progesteron, 17β -Estradiol, 17β -Estradiolsulfat, Dihydrotestosteron, Aldosteron, Cortisol und den Vitaminen D2 und D3, stimulierten keinen Ca^{2+} -Einstrom über den TRPM3-Kanal (Majeed et al., 2010). Für die Stimulation von TRPM3-Kanälen sind mikromolare Konzentrationen von Pregnenolonsulfat erforderlich (Wagner et al., 2008), was darauf hinweist, dass Pregnenolonsulfat eher ein pharmakologischer Agonist und kein physiologischer Ligand von TRPM3-Kanälen ist.

Es ist außerdem zu betonen, dass Pregnenolonsulfat kein TRPM3-spezifischer Ligand ist. Es verändert auch die Aktivität anderer Ionenkanäle und Rezeptoren wie spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle, Kir2.3 K^+ -Kanäle, des N-Methyl-d-Aspartat (NMDA)-Rezeptors und des Gamma-Aminobuttersäure-A (GABA)-Rezeptors (Jang et al., 2004; Chen et al., 2010); (Kobayashi et al., 2009; Kostakis et al., 2011; Cameron et al., 2012).

Kürzlich beschrieben (Held et al., 2015a) eine synthetische Verbindung namens CIM0216 als potenten TRPM3-Agonisten, dessen Wirkung, im Hinblick auf den Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle, die von Pregnenolonsulfat weit übersteigen soll. Diese Verbindung hat die Eigenschaft, sowohl die Öffnung der zentralen Ca^{2+} -leitenden als auch die der alternativen Kationen-leitenden Pore des TRPM3-Kanals, zu induzieren, ohne dass es andere Kanalmodulatoren erfordert. CIM0216 verursacht zudem TRPM3-abhängig die Induktion von Schmerzen, die Freisetzung von Neuropeptiden aus sensorischen Nervenendigungen in der Haut und die von Insulin aus pankreatischen Inseln.

Nicht nur Agonisten von TRP-Kanälen stehen im Fokus der heutigen pharmakologischen Forschung, auch die Identifikation von Inhibitoren dieser Ionenkanäle stellt einen wichtigen Schritt auf dem Weg zur Aufklärung der strukturellen, physiologischen und molekularen Eigenschaften und Funktionen von Ionenkanälen, sowie ihren Aktivierungs- und Regulationsmechanismen dar. Mehrere Metaboliten, synthetische und aus Pflanzen stammende Verbindungen wurden als Inhibitoren der TRPM3 Kanalaktivierung vorgeschlagen, einschließlich Cholesterin, Progesteron, Mefenaminsäure, die antidiabetischen PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon und Troglitazon, und den aus Zitruspflanzen stammenden Flavanone wie Naringenin, Eriodictyol, Hesperetin, Liquiritigenin und Isosakuranetin (Naylor et al., 2010; Klose et al., 2011; Majeed et al., 2011; Majeed et al., 2012; Straub et al., 2013a; Straub et al., 2013b). Flavanone konnten vollständig die Pregnenolonsulfat-induzierte Ca^{2+} -Fluoreszenz in TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen hemmen (Straub et al., 2013a; Straub et al., 2013b). Ebenso konnte die Anwendung von Mefenaminsäure den Pregnenolonsulfat-induzierten Anstieg der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration auf Kontrollniveau reduzieren (Klose et al., 2011). In Bezug darauf konnte ich in

Experimenten meiner Masterarbeit zeigen, dass die Pregnenolonsulfat-vermittelte intrazelluläre Signaltransduktion und Aktivierung der Gentranskription durch Mefenaminsäure und in geringerem Maße durch Vorinkubation der Zellen mit Naringenin blockiert wurde (Lesch et al., 2014). Im Gegensatz dazu, obwohl Progesteron, Pregnenolon und Rosiglitazon einige Effekte auf die TRPM3-induzierte Genaktivierung zeigten, konnten die Effekte nicht verallgemeinert werden, was darauf hindeutet, dass diese Verbindungen nicht als TRPM3-spezifische Inhibitoren wirken (Lesch et al., 2014).

Im Zuge meiner Masterarbeit, die sich zusammenfassend mit dem Vergleich der Wirkung verschiedener TRPM3-Agonisten auf die Gentranskription befasste, konnte ich somit aufzeigen, dass Pregnenolonsulfat den effektivsten Agonisten, sowie Mefenaminsäure den wirkungsvollsten und selektivsten Antagonisten des TRPM3-vermittelten Ca^{2+} -Einstroms in die Zelle und der daran anschließenden Gentranskription darstellt, während alle anderen untersuchten Agonisten und Antagonisten dabei keinen oder nur TRPM3-unabhängige Effekte auf die Gentranskription zeigten. Sie bewirken zwar eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, diese ist jedoch nicht ausreichend, um eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang zu setzen, die sich im Anschluss auf das Genexpressionsmuster der Zellen auswirken würde.

1.5. Signaltransduktion via TRPM3

1.5.1. Calcium und Calmodulin

Ein rascher Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in pankreatische beta-Zellen, Neuronen, sensorische, retinale Ganglionzellen, vaskuläre glatte Muskelzellen oder synoviale Fibroblasten wurde durch Stimulation endogen exprimierter TRPM3-Kanäle mit Pregnenolonsulfat ausgelöst (Wagner et al., 2008; Ciurtin et al., 2010; Naylor et al., 2010; Islam, 2011; Vriens et al., 2011; Majeed et al., 2012; Brown et al., 2015; Held et al., 2015a; Sághy et al., 2015). Ebenso erhöhte sich die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration nach Stimulation TRPM3 exprimierender HEK293-Zellen mit Pregnenolonsulfat. Calcium-Bildgebungsexperimente mit isolierten Pankreasinseln zeigten, dass die Stimulation der Zellen mit Pregnenolonsulfat oder dem synthetischen Liganden CIM0216 einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration verursachte. Im Gegensatz dazu wurde kein Anstieg des intrazellulären Calciums in stimulierten Pankreasinseln nachgewiesen, die von TRPM3-Knockout-Mäusen stammten (Held et al., 2015b). Diese Daten zeigen, dass TRPM3-Kanäle für den Ca^{2+} -Einstrom in diese Zellen nach Stimulation essentiell sind. Die Tatsache, dass

TRPM3 als relativ effizienter Calciumkanal fungiert (Nilius and Flockerzi, 2014), ist die Grundlage für die Verwendung eines Ca^{2+} -Einstroms in die Zellen und eines Anstiegs der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration als Indikation für aktivierte TRPM3-Kanäle (Grimm et al., 2003; Lee et al., 2003; Wagner et al., 2008; Majeed et al., 2010; Naylor et al., 2010; Klose et al., 2011; Majeed et al., 2011; Frühwald et al., 2012; Majeed et al., 2012; Straub et al., 2013a; Held et al., 2015a; Sághy et al., 2015; Krügel et al., 2017). Es wurde gezeigt, dass TRPM3-induzierte intrazelluläre Signale einen Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Zellen und den anschließenden Anstieg von intrazellulärem Calcium erfordern (Lesch et al., 2015b).

Calmodulin, ein kleines Protein mit einer Größe von 16,5 kDa, das Ca^{2+} -Ionen über vier EF-Hand-Motive bindet, reguliert die Aktivität mehrerer TRP-Kanäle (Zhu, 2005). Zwei unabhängige Calmodulin-Bindestellen wurden am N-Terminus von TRPM3-Kanälen identifiziert (Holakovska et al., 2012), es wurden jedoch bisher noch keine funktionellen Experimente veröffentlicht, die eine Regulation der TRPM3-Kanalaktivität durch Calmodulin nachweisen (Przibilla et al., 2018).

1.5.2. Proteinkinasen und –phosphatasen

Ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, induziert durch die Aktivierung von $\text{G}\alpha_q$ -gekoppelten Rezeptoren oder spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen, führt zur Aktivierung der extrazellulären signalregulierten Proteinkinase (ERK1/2) (Arnette et al., 2003; Stefano et al., 2007b; Mayer and Thiel, 2009; Duan and Cobb, 2010; Kaufmann et al., 2013), höchstwahrscheinlich über die Aktivierung der Proteinkinasen PKC und Raf. Ebenso löste die Stimulation von TRPM3-Kanälen die Phosphorylierung und Aktivierung von ERK1/2 aus (Lesch et al., 2017). Die pharmakologische und genetische Hemmung von ERK1/2 oder der Proteinkinase Raf führte zu einer Abschwächung der Signalkaskade vom TRPM3-Kanal zum Kern (Mayer et al., 2011; Lesch et al., 2017). Diese Daten identifizierten Raf und ERK1/2 als zytoplasmatische Signaltransduktoren von aktivierten TRPM3-Kanälen.

Experimente, die sich der RNAi-Technologie bedienten, legten nahe, dass eine TRPM3-Stimulation auch die c-Jun-N-terminale Proteinkinase (JNK) aktiviert (Lesch et al., 2017). Darüber hinaus wurde der Signalweg, der eine TRPM3-Kanalstimulation mit nuklearen Ereignissen assoziiert, in Zellen abgeschwächt, die MAP-Kinase-Phosphatase-1 (MKP-1) exprimieren, eine nukleäre Phosphatase, die die MAP-Kinasen ERK1/2, JNK und die Proteinkinase p38 dephosphoryliert und inaktiviert (Shapiro and Ahn, 1998; Slack et al., 2001). Diese Daten zeigen, dass phosphorylierte, aktivierte nukleäre MAP-Kinasen innerhalb der TRPM3-induzierten Signalkaskade erforderlich sind. MKP-1 konnte einen negativen Feedback-Loop durch Induktion

von Dephosphorylierung und Inaktivierung nukleärer ERK1/2 und JNK etablieren, was zu einer Abschwächung des TRPM3-induzierten Signalings führte.

Außerdem aktivierte die Stimulation von TRPM3-Kanälen die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase-Kinase 2 (CaMKK2) (Hall et al., 2014), die wiederum Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinasen aktivierte. Der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, ausgelöst durch Stimulation der TRPM3-Kanäle, kann von der Aktivierung der Ca^{2+} -abhängigen Proteinphosphatase Calcineurin begleitet sein, wie zuvor bereits für die Stimulation von TRPC6- und TRPV1-Kanälen beschrieben wurde (Kuwahara et al., 2006; Soni and Adebisi, 2016). Experimente mit einer konstitutiv aktiven Calcineurin-Mutante zeigten, dass TRPM3-Kanalsignale durch Calcineurin gesteuert werden (Mayer et al., 2011; Lesch et al., 2017). Dies deutet darauf hin, dass Calcineurin - zusätzlich zu MKP-1 - Teil eines zweiten negativen Feedback-Loops innerhalb der TRPM3-getriggerten Signalkaskade sein könnte.

1.5.3. Transkriptionsfaktoren

Eukaryotische Zellen reagieren u.a. auf sich ändernde Umwelteinflüsse mit einer raschen Modulation des genetischen Programms. Dies umfasst zum einen die Erfassung solcher Veränderungen, die Umwandlung und Übermittlung eines Signals in die Zelle, über die Zellmembran hinweg, sowie die Modifikation von regulatorischen Proteinen, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, die daraufhin bestimmte Gene aktivieren oder hemmen können und so zur Änderung des genetischen Programms führen.

Eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, wie Aktivator-Protein-1 (AP-1), Egr-1 und ternäre Komplexfaktoren (TCFs) wie z.B. Elk-1, können durch extrazelluläre Signalmoleküle aktiviert werden und wurden mit der TRPM3-vermittelten Signaltransduktion in Verbindung gebracht (Mayer et al., 2011; Müller et al., 2011). Diese Proteine werden transient durch die Regulation ihrer Biosynthese und/oder durch Phosphorylierung aktiviert bzw. durch Abbau und/oder Dephosphorylierung im Anschluss wieder inaktiviert. Die stimulus-aktivierten Transkriptionsfaktoren binden an die regulatorische Region von nachgeschalteten Zielgenen und stimulieren die Transkription dieser Gene (Thiel and Rössler, 2017). Die Genprodukte dieser Zielgene sind letztlich verantwortlich für die biochemischen und physiologischen Veränderungen, als Ergebnis zellulärer Stimulation.

1.5.3.1. Basische Leucin-Zipper- (bZIP) Proteine

Basische Leucin-Zipper- (bZIP) Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die an sequenzspezifische doppelsträngige DNA als Homodimere oder Heterodimere binden, um entweder die Gentranskription zu aktivieren oder sie zu unterdrücken (Hurst, 1995). Das Aminosäure-Alignment von bZIP-Proteinen ermöglichte die Identifizierung des bZIP-Motivs, einer zweiteiligen α -Helix, die 60 bis 80 Aminosäuren lang ist (Vinson et al., 1989). Die basische Region oder DNA-Bindedomäne (DBD) von bZIP-Proteinen enthält positiv geladene Aminosäurereste, die für die Bindungsaktivität an der negativ geladenen DNA notwendig sind. Eine amphipathische Proteinsequenz, die als Leucin-Zipper-Domäne (LZD) bezeichnet wird und die sich unmittelbar stromabwärts von der DNA-Bindedomäne befindet, ist durch die periodische Wiederholung von Leucinresten an jeder siebten Aminosäure charakterisiert (Heptadenmuster). Das dadurch entstehende hydrophobe Rückgrat erleichtert die Dimerisierung von Proteinen über hydrophobe Wechselwirkung (Vinson et al., 2002); (Landschulz et al., 1988). Es gibt viele Arten von Leucin-Zipper-Proteinen, sie können jedoch nicht alle miteinander Heterodimere bilden. Ob ein bestimmtes Heterodimer gebildet werden kann oder nicht, hängt davon ab, wie gut die hydrophoben Oberflächen der beiden Leucin-Zipper α -Helices ineinandergreifen, was wiederum von den exakten Aminosäuresequenzen der beiden Zipper-Regionen abhängt. Somit kann jedes Leucin-Zipper-Protein in der Zelle mit nur wenigen Vertretern der anderen Leucin-Zipper-Proteine Dimere bilden. In den späten 1980er Jahren wurden mehrere bZIP-Proteine aus Säugern aufgereinigt und die cDNAs kloniert (Vinson et al., 2002). Zu den ersten identifizierten bZIP-Proteinen gehörten c-Fos und c-Jun, die zusammen das Aktivator-Protein-1- (AP-1) Heterodimer bilden (Bohmann et al., 1987), das CREB-Homodimer (Montminy and Bilezikjian, 1987) und das C/EBP-Homodimer (Johnson et al., 1987; Landschulz et al., 1988).

Aktivator-Protein 1 (AP-1)

Ein stimulus-responsiver Transkriptionsfaktor, der nach der Stimulation von TRPM3-Kanälen aktiviert wird, ist das Aktivator-Protein-1 (AP-1) (Mayer et al., 2011; Müller et al., 2011; Lesch et al., 2014; Lesch et al., 2015b). AP-1 besteht aus Homo- oder Heterodimeren der bZIP-Familien Jun (c-jun, JunB, JunD), Fos (c-Fos, FosB, Fra1, Fra2) und ATF2 (ATF2, ATF3/LRF1, BATF) (Angel and Karin, 1991; Karin, 1995; Karin et al., 1997). Jun/Jun- und Jun/Fos-Dimere binden mit hoher Affinität an die palindromische DNA-Sequenz 5'-TGAGTCA-3' (Abbildung 3), das auch als 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA)-responsives Element (TRE) bezeichnet wird, in den Promotor- und/oder Enhancer-Regionen einer Vielzahl von Genen, um ihre Transkription zu regulieren (Angel and Karin, 1991; Karin et al., 1997; Steinmüller et al., 2001). TPA ist ein starker

Tumorpromoter und aktiviert die Proteinkinase C (Nishizuka, 1984). Zusätzlich können AP-1-Proteine mit anderen bZIP-Proteinfamilien dimerisieren, wie zum Beispiel der ATF/CREB-Familie. Diese AP-1-Heterodimere binden vorzugsweise an die 8-bp-DNA-Sequenz 5-TGACGTCA-3, auch bekannt als cyclisches AMP-responsives Element (CRE) (Karin et al., 1997). Das CRE weist eine zusätzliche Baseninsertion in der AP-1-Konsensus-Erkennungssequenz TRE auf (Abbildung 3).

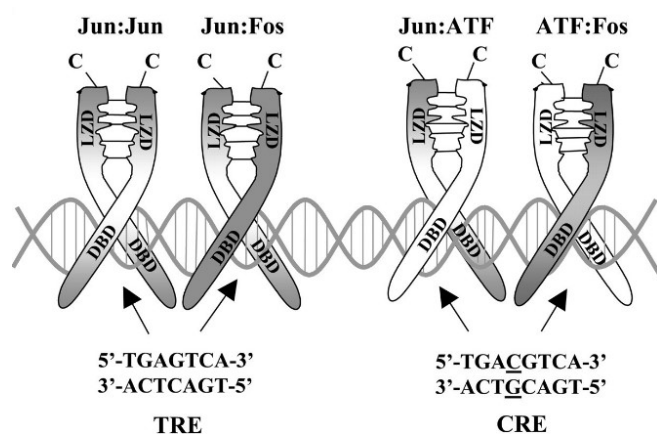


Abbildung 3 Schematische Darstellung der Dimerisierung und DNA-Bindeeigenschaften von Jun- und Fos-Proteinen. LZD=Leucin-Zipper-Domäne, vermittelt die Dimerisierung von Proteinen; DBD=DNA-bindende Domäne; TRE=12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA)-responsives Element; CRE, cAMP-responsives Element, besitzt eine zusätzliche Base (unterstrichen) im Vergleich zum TRE (Reddy and Mossman, 2002).

AP-1 ist das Ziel vieler intrazellulärer Signalkaskaden, die durch Wachstumsfaktoren, Zytokine, Neurotransmitter, Polypeptidhormone, Zell-Matrix-Wechselwirkungen, bakterielle und virale Infektionen und eine Vielzahl von Stressoren wie UV-Licht ausgelöst werden (Angel and Karin, 1991; Karin, 1995). Diese Stimuli aktivieren MAPK-Kaskaden, die die AP-1-Aktivität durch die Phosphorylierung bestimmter Substrate verstärken (Chang and Karin, 2001). Zudem ist bekannt, dass AP-1 die zelluläre Proliferation, Transformation, Differenzierung und Apoptose gewebespezifisch reguliert (Shaulian and Karin, 2002). Serum- und Wachstumsfaktoren, die AP-1 wirksam induzieren, tun dies durch Aktivierung der extrazellulären Signal-regulierten Kinase (ERK)-Untergruppe von MAPKs, deren Mitglieder in den Kern translozieren. Dort phosphorylieren sie ternäre Komplexfaktoren (TCFs) und potenzieren dadurch deren Transkriptionsaktivität (Hill et al., 1994).

Um die biologischen Funktionen von AP-1 zu verstehen, ist es sehr wichtig die Rolle der einzelnen bZIP-Proteine als Teil des AP-1-Komplexes aufzuklären.

c-Fos

Das c-Fos-Gen ist ein nukleares Phosphoprotein und kodiert für einen basischen Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktor, der zusammen mit Proteinen der c-Jun- und ATF-Familie von Transkriptionsfaktoren (bZIP), den AP-1-Transkriptionsfaktor-Komplex bildet. Diese bZIP-Proteine dimerisieren über ihre Leucin-Zipper-Domänen und binden an spezifische Kontrollelemente in den Promotoren von Genen, die Zelldifferenzierung und -proliferation regulieren (Whitmarsh and Davis, 1996). In den meisten Zelltypen sind c-Fos-mRNA und -Protein nur in geringen Mengen vorhanden, jedoch können sie durch eine Vielzahl von Stimuli in zahlreichen Situationen induziert werden (Morgan and Curran, 1991). C-Fos ist nicht in der Lage, Homodimere zu bilden. Die Vermittlung der Transkription durch c-Fos erfolgt beispielweise über Heterodimerisierung mit Jun-Familienmitgliedern und der Bindung an TRE/AP-1-Bindestellen (Rauscher et al., 1988); (McBride and Nemer, 1998).

Das c-Fos-Gen ist ein „immediate early gene“, dessen Genprodukt an der zellulären Differenzierung und Proliferation beteiligt ist und in vielen Arten von Tumoren überexprimiert wird. Es hat DNA-bindende Aktivität (Hashiramoto et al., 2006; Kazi and Soh, 2008) und kann auch durch zahlreiche proinflammatorische Zytokine, einschließlich Interleukin-1, oder durch Stimulierung von Wachstumsfaktoren induziert werden (Rivera et al., 1993; Schiller et al., 2006). Das c-Fos-Gen wird von zahlreichen extrazellulären Signalmolekülen aktiviert, wie Liganden von G α s- und G α q-gekoppelten Rezeptoren und Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, Phorbolestern, Zytokinen, Calciumionophoren und anderen. Seine Expression wird durch verschiedene Signaltransduktionswege einschließlich des Ras/Raf/ERK-Signalwegs moduliert (Hill and Treisman, 1995). Hierbei rekrutiert das GTP-gebundene G-Protein Ras die Proteinkinase Raf zur Plasmamembran, die wiederum MEK phosphoryliert, was zur ERK-Aktivierung führt. Die aktivierte ERK transloziert zum Kern und reguliert die Aktivität vieler Transkriptionsfaktoren. c-Fos stellt somit einen Konvergenzpunkt vieler intrazellulärer Signalkaskaden dar, Transkriptionsfaktoren wie CREB, STAT, AP-1, serum response factor (SRF) und TCFs miteingeschlossen. Viele dieser Transkriptionsfaktoren wurden über die Analyse der Regulation der c-Fos-Gentranskription charakterisiert.

Kürzlich wurde gezeigt, dass die Stimulation endogener TRPM3-Kanäle in Insulinomazellen die c-Fos-Promotoraktivität und -expression erhöht (Müller et al., 2011). Zudem konnte ich bereits im Zuge meiner Masterarbeit zeigen, dass die c-Fos-Expression in HEK293-Zellen, die TRPM3 nach Stimulation mit Pregnenolonsulfat exprimieren, erhöht ist (Lesch et al., 2014).

c-Jun

Auch der Transkriptionsfaktor c-Jun ist als bZIP-Protein eine zentrale Komponente des Transkriptionskomplexes AP-1. Wie alle Mitglieder der AP-1-Familie erkennt c-Jun entweder TPA-responsive Elemente (TREs) (5'-TGAGCTCA-3') oder cAMP-responsive Elemente (CREs) (5'-TGACGTCA-3') (Hirai and Yaniv, 1989); (Sassone-Corsi et al., 1990; Ryseck and Bravo, 1991). Studien zur c-Jun-Expression weisen darauf hin, dass das c-Jun-exprimierende Gen zur Klasse der „immediate early genes“ gehört, die in Reaktion auf mitogene Stimuli in ruhenden Zellen schnell transient induziert werden (Curran and Franza, 1988). Obwohl viele Zellen geringe Mengen an c-Jun enthalten, wird die Transkription des c-Jun-Gens sowohl durch Hormone (z.B. „Epidermal Growth Factor“, EGF) als auch durch Verbindungen, die die Aktivität von Proteinkinase C stimulieren (z. B. Phorbolester), stark aktiviert (Lamph et al., 1988; Dixit et al., 1989). c-Jun enthält an seinem C-Terminus eine bZIP-Domäne, die für die DNA-Bindung und -Dimerisierung verantwortlich ist, während sein N-Terminus eine Phosphorylierungs-abhängige Transkriptionsaktivierungsdomäne aufweist (Pulverer et al., 1991; Smeal et al., 1991). Die modulare Struktur von c-Jun ist in Abbildung 4 gezeigt.

Eine entscheidende Eigenschaft von c-Jun ist die Bildung funktioneller Heterodimere mit multiplen Transkriptionsfaktoren, die die Affinität von c-Jun für DNA-Bindestellen verändern und schließlich die nachgeschalteten, von c-Jun kontrollierten Zielgene bestimmen (Angel and Karin, 1991; Hai and Curran, 1991). Darüber hinaus sind c-Jun und seine Heterodimer-Partner Substrate für Protein-Kinasen, die mit spezifischen Signalwegen verbunden sind. Die c-Jun-N-terminalen Kinasen (JNK) phosphorylieren die Serinreste S63 und S73 innerhalb des N-Terminus von c-Jun. Dieser Prozess ermöglicht c-Jun den mRNA-Polymerasekomplex zu aktivieren, was zur Transkription von Effektorgenen führt (Dérijard et al., 1994; Gupta et al., 1995; Behrens et al., 1999). c-Jun ist ein wichtiger Regulator der Apoptose, der neuronalen Apoptose (Ham et al., 2000) und der Zellzykluskontrolle. Einige Karzinomaarten benötigen erhöhte Expressionslevel von c-Jun zur Entwicklung und Progression (Vogt, 2001). In Mäusen reguliert c-Jun die normale Entwicklung genauso wie die Entwicklung von Tumoren (Eferl and Wagner, 2003). Kürzlich veröffentlichte Daten von (Lesch et al., 2015b) zeigen eine Verbindung zwischen der TRPM3-induzierten Signalkaskade und der Transkription von Zielgenen, die von c-Jun kontrolliert werden.

ATF2

„Activating transcription factor 2“ (ATF2), auch bekannt als „cAMP response element-binding protein-1“ (CRE-BP-1) (Nomura et al., 1993), ist ein Mitglied der AP-1-Familie von bZIP-Proteinen. ATF2 bindet an eine kurze DNA-Konsensussequenz (5'-TGACGTCA-3'), cAMP-Response-Element (CRE) genannt (Thiel et al., 2005). Darüber hinaus wurde die verwandte DNA-

Zielsequenz 5'-TTGCGTAA-3' als hochaffine Konsensus-Bindestelle für ATF2-Homodimere beschrieben (Benbrook and Jones, 1994). ATF2 ist in der Lage, Homodimere und Heterodimere durch den Leucin-Zipper zu bilden, der bevorzugte Dimerisierungspartner ist c-Jun (Hai and Curran, 1991; van Dam et al., 1993) (Benbrook and Jones, 1994; Tsai et al., 1996). Es enthält an seinem N-Terminus eine Phosphorylierungs-abhängige Transkriptionsaktivierungsdomäne (Livingstone et al., 1995) und an seinem C-Terminus eine bZIP-Domäne, die für die DNA-Bindung und Dimerisierung verantwortlich ist. ATF2 wird ubiquitär exprimiert, wobei das höchste Expressionsniveau im Gehirn beobachtet wird (Takeda et al., 1991).

Es ist bekannt, dass ATF2 an der Regulation von AP-1 in HEK293-Zellen, die aktivierte TRPM3-Kanäle exprimieren, beteiligt ist (Lesch et al., 2015). Angesichts der Tatsache, dass die Aktivierung von TRPM3 einen Zustrom von Ca^{2+} -Ionen in die Zellen auslöst, implizieren diese Beobachtung, dass ATF2 zu den Ca^{2+} -responsiven Transkriptionsfaktoren gehört, zusammen mit c-Jun, c-Fos, CREB, Egr-1 und anderen (Sheng et al., 1991; Thiel et al., 2010); (Lesch et al., 2015b).

CREB

Namensgebend für den Transkriptionsfaktor CREB („cAMP response element-binding protein“) ist, dass er in Folge einer Erhöhung des cAMP-Spiegels in der Zelle aktiviert wird und an eine konservierte „cAMP response element“ (CRE)-Sequenz, welche in der 5'-Region vieler cAMP-responsiver Gene vorhanden ist, binden und so die Expression dieser Zielgene stimulieren kann (Montminy et al., 1986; Roesler et al., 1988); (Johannessen et al., 2004; Carlezon et al., 2005). CREB enthält eine bZIP-Domäne und zwei glutaminreiche Domänen, die durch die Kinase-induzierbare Domäne (KID) getrennt sind (Abbildung 4). Innerhalb der KID befindet sich die Phosphoakzeptorstelle Ser-133. Die Phosphorylierung von CREB an dieser Stelle fördert die Rekrutierung des Transkriptions-Coaktivators „CREB binding protein“ (CBP) und die Bindung von CBP an die KID (Chrivia et al., 1993; Kwok et al., 1994; Parker et al., 1996; Radhakrishnan et al., 1997). CREB ist im dephosphorylierten Zustand inaktiv und wird bei Phosphorylierung zu einem Aktivator. Das Schlüsselenzym, der CREB-Aktivierung ist die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA), CREB dient aber auch als Substrat für die Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase IV und die Mitogen- und Stress-aktivierten Proteinkinasen MSK1 und 2 (Sun et al., 1994); (Xing et al., 1996; Wiggin et al., 2002), was darauf hinweist, dass verschiedene Signalwege zu CREB konvergieren. Die Bedeutung von CREB für die Gehirnfunktion wurde durch genetische Targeting-Experimente dargelegt, die zeigen, dass die Störung der CREB-Funktion Neurodegeneration induziert (Mantamadiotis et al. 2002). Inhibition der CREB-Funktion in transgenen Mäusen durch eine nicht phosphorylierbare transdominant-negative CREB-Mutante verhinderte die Proliferation

von somatotrophen Zellen, was zu Hypophysenatrophie und Zwergwuchs führte (Struthers et al., 1991).

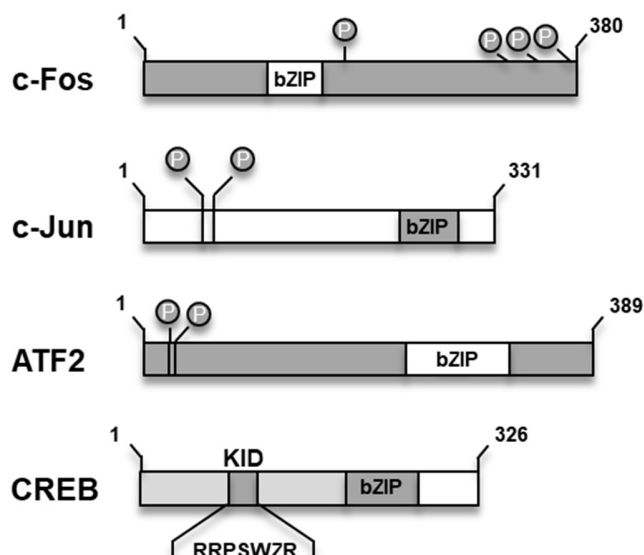


Abbildung 4 Moduläre Strukturen der bZIP-Proteine c-Fos, c-Jun, ATF2 und CREB

1.5.3.2. „Ternärer Komplex Faktor“ (TCF) Elk-1

Der Elk-1 Transkriptionsfaktor (E twenty-six (ETS)-like transcription factor 1) gehört zur Gruppe der „ternary complex factors“ (TCF). Elk-1 bindet an ein DNA-Motiv mit der Kernsequenz GGAA/T und an ein Dimer des „serum response factors“ (SRF), das mit der Konsensus-DNA-Sequenz CC[A/T]6GG (auch bekannt als CArG-Box) interagiert, wodurch ein ternärer Komplex erzeugt wird. Dieser Komplex wird benötigt, um die Gentranskription jener Gene zu stimulieren, die Serum-Response-Elemente in ihren regulatorischen Regionen enthalten (Sharrocks, 2001; Shaw and Saxton, 2003). Intrazelluläre Signalkaskaden, die die Aktivierung von MAP-Kinasen beinhalten, zielen auf die Transkriptionsaktivierungsdomäne von Elk-1 über die Phosphorylierung der Serinreste S383 und S389 ab (Abbildung 5).

In meiner Masterarbeit habe ich gezeigt, dass die Stimulation des TRPM3-Kanals mit Pregnenolonsulfat (PregS) eine Erhöhung des transkriptionellen Aktivierungspotenzials von Elk-1 bewirkt (Lesch et al., 2014). Das deutet darauf hin, dass die Stimulierung von TRPM3-Kanälen über die Aktivierung von MAP-Kinasen zur Elk-1-Phosphorylierung führt.

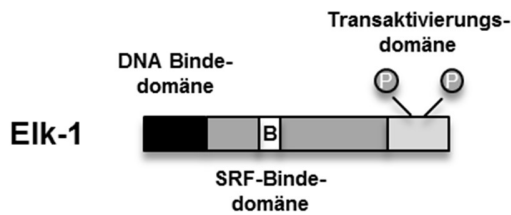


Abbildung 5 Modulare Struktur von Elk-1. Das Elk-1 Protein besitzt eine N-terminale DNA-Bindedomäne und eine C-terminale Transaktivierungsdomäne, sowie eine serum response factor (SRF)-Bindedomäne (B).

Abbildung 6 zeigt die Bindung von Elk-1 an dem SRE-Element eines Zielgen-Promotors, infolgedessen eine SRE-abhängige Gentranskription induziert wird (Besnard et al., 2011).

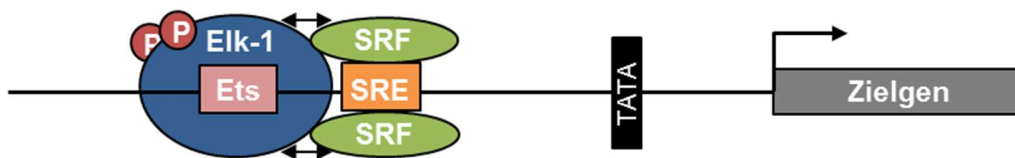


Abbildung 6 Schematische Darstellung des ternären Komplexes aus Elk-1 und SRF. Elk-1 bindet an die Ets-DNA-Sequenz und aktiviert im Komplex mit den SRF das SRE-Element, wodurch die Gentranskription eines Zielgens induziert wird.

Das am besten charakterisierte Elk-1-Zielgen ist das Proto-Onkogen c-fos (Hipskind and Nordheim, 1991); (Gille et al., 1992; Hill et al., 1993). Sein Promotor wird schnell und transient durch Mitogene über das SRE reguliert (Treisman et al., 1992), das den ternären Komplex bindet, der durch zwei SRFs und dem TCF Elk-1 gebildet wird (Hill et al., 1993). Die Rekrutierung von Elk-1 zum SRE erfolgt durch eine Kombination von Protein-Protein- und Protein-DNA-Interaktion über die Ets-Domäne der DNA und die B-Domäne von Elk-1. Die bestimmenden Aminosäurereste in der SRF-Elk1-Wechselwirkung sind Tyrosin 153, Tyrosin 159 und Phenylalanin 162 (Ling et al., 1998). Diese Reste stellen einen großen Anteil der Oberflächenwechselwirkung von Elk-1 mit SRF dar und erhöhen die intrinsische Bindungsaktivität von Elk-1 gegenüber SRE-Bindestellen.

C-Fos bildet in Verbindung mit c-Jun den AP-1-Komplex. Somit stellt Elk-1 einen Regulator der AP-1-Aktivität dar, indem es die c-Fos-Expression kontrolliert (Müller et al., 2010; Müller et al., 2011; Thiel et al., 2012) (Kaufmann et al., 2013). Elk-1 wird durch die Protein-Kinasen „extracellular-signal regulated kinase“ (ERK), p38 und „c-Jun N-terminal protein kinase“ (JNK) reguliert (Whitmarsh et al., 1997; Yang et al., 1998) und verbindet daher intrazelluläre Signalkaskaden mit SRE- und AP-1-vermittelter Gentranskription.

1.6. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die molekularen Mechanismen der Signaltransduktion über aktivierte TRPM3-Kanäle zu beschreiben. Das daraus resultierende Genexpressionsmuster sowie die beteiligten Transkriptionsfaktoren und potentiellen Zielgene sollten hierbei näher untersucht werden.

Dadurch ergeben sich für die vorliegende Arbeit folgende vier Aufgabenfelder:

1.6.1. Analyse der transkriptionellen Aktivität von CIM0216 über TRPM3

Bisher sind noch keine natürlichen Liganden von TRPM3-Kanälen bekannt, jedoch wurden bereits mehrere Verbindungen als TRPM3-spezifische Agonisten beschrieben. Die Wirksamkeit einer neu beschriebenen synthetischen Verbindung mit der Bezeichnung CIM0216 bei der Erzeugung eines Ca^{2+} -Einstroms über TRPM3-Kanäle überstieg die von Pregnenolonsulfat deutlich (Held et al., 2015a). In dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob CIM0216 durch die Stimulation von TRPM3-Kanälen auch ein potenter Aktivator der Gentranskription ist.

1.6.2. Untersuchung der Signalkaskade, die aktivierte TRPM3-Kanäle mit erhöhter c-Fos-Expression verbindet

Das c-Fos-Gen ist das bekannteste Gen für Stimulus-aktivierte Transkription. Man weiß, dass eine Aktivierung des TRPM3-Ionenkanals den c-Fos-Promoter stimuliert. Dazu sind unterschiedliche Signaltransduktoren und Transkriptionsfaktoren erforderlich. In diesem Zusammenhang war es ein Ziel meiner Arbeit herauszufinden, welche Transkriptionsfaktoren den c-Fos-Promoter nach Stimulation von TRPM3 aktivieren.

1.6.3. Identifizierung von Signaltransduktoren der Signalkaskade, die aktivierte TRPM3-Kanäle mit Elk-1-Stimulation verbindet

Die Stimulation von TRPM3-Kanälen erhöht das Transkriptionsaktivierungspotential des ternären Komplexfaktors Elk-1 (Lesch et al., 2014). Mein Ziel war es, intrazelluläre Signaltransduktoren der

Signalkaskade zu identifizieren, die aktivierte TRPM3-Kanäle mit der Stimulation des ternären Komplexfaktors Elk-1 verbinden.

1.6.4. Analyse eines AP-1-Zielgens nach TRPM3-Stimulation

Die Stimulation von TRPM3-Kanälen aktiviert den Transkriptionsfaktor AP-1, welcher an die regulatorischen Regionen von nachgeschalteten Zielgenen bindet und deren Transkription aktiviert. Zum besseren Verständnis der intrazellulären Funktionen der TRPM3-Stimulation ist die Identifikation von AP-1-Zielgenen von entscheidender Bedeutung.

Viele extrazelluläre Signalmoleküle regulieren die Transkription des IL-8-Gens. Im Rahmen meiner Arbeit sollte die Expression des IL-8-Gens nach TRPM3-Stimulation analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

| | |
|--|---|
| Analysenwaage | Sartorius, Göttingen |
| Auflichtmikroskop (Stemi2000) | Zeiss, Göttingen |
| Autoklav | Schütt, Göttingen |
| Behälter für Flüssigstickstoff | diverse Hersteller |
| Brutschränke | diverse Hersteller |
| Eismaschine | diverse Hersteller |
| Feinwaagen | Sartorius, Göttingen |
| Heizblock | Eppendorf, Hamburg |
| Kühlzentrifuge J2-HS | Beckman, München |
| Luminometer | Berthold Detection Systems, Alabama, USA |
| Magnetrührer | IKA Labortechnik, Staufen |
| Microplate Reader Model 550 | Bio-Rad, München |
| Mikroskop (Durchlicht) Axiovert25 | Zeiss, Göttingen |
| Mikrowellenherd | AEG, Nürnberg |
| Milliporewasser-Anlage Milli Q | Millipore, Milford, USA |
| Neubauer Zählkammer improved | Roth, Karlsruhe |
| pH-Meter, inoLab pH 720 | WTW, Weilheim |
| Photometer Pharmacia Biotech Ultrospec 3000 | NJ, USA |
| Pipetten (20µl, 200µl, 1000µl) | Eppendorf, Hamburg Abimed, Langenfeld; Gilson, Middleton, USA |
| Pipetus®Akku | Hirschmann Laborgeräte, Heilbronn |
| Rotoren für Kühlzentrifuge J2-HS: JA.10 (max. 17.700x g) und JA.20 (max. 48.800x g) | Beckman, München |
| Spannungsgeräte für Agarosegel- Sterilbank | Bio-Rad, München Heraeus, Hanau |

Tischzentrifuge: Biofuge®pico
Vortex-Mixer
Wasserbäder, temperierbar
Zentrifuge: Centrifuge 5810R

Heraeus, Hanau
IKA Labortechnik, Staufen
diverse Hersteller
Eppendorf, Hamburg

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Einmal-Spitzen (max. 200 µl bzw. max. 1000 µl)
Einmal-Spritzen Injekt (10 ml, 20 ml)
Kryoröhrchen
Küvetten (1,5 ml Halbmikro)
Petrischalen mit Nocken (35x15 mm und 60x15 mm)
Plastikröhrchen („Falcon“-Röhrchen) 15 ml
Plastikröhrchen („Falcon“-Röhrchen) 50 ml
96-Loch-Platte weiß
96-Loch-Platte durchsichtig
Reaktionsgefäße 1,5 ml
Sterilfilter (0,22 µm, 0,45 µm)
Sterilfilter Filtropur L 0,2 LS
Zellkulturflaschen in den Größen 75 cm², 175 cm²

Sarstedt, Nürnberg
Braun Melsungen AG, Melsungen
Greiner bio-one, Frickenhausen
Brand, Wertheim, Deutschland
Sarstedt, Nürnberg
Greiner bio-one, Frickenhausen
Sarstedt, Nürnberg
Nunc, Roskilde, Dänemark
Greiner bio-one, Frickenhausen
Eppendorf, Hamburg
Sarstedt, Nürnberg
Sarstedt, Nürnberg
Greiner bio-one, Frickenhausen

2.1.3. Chemikalien und Feinchemikalien

Adenosin-5'triphosphat (ATP)
BCA Protein Kit
Blasticidin
Bromphenolblau
Calciumchlorid
Chloroquin
CNO

Coenzym A
DMSO
DTT
DMEM

Roche, Mannheim
Pierce, Rockford, USA
Invitrogen, Darmstadt, #R210-01
Serva, Hamburg
Roth, Karlsruhe
Sigma-Aldrich, München
Enzo Life Sciences, Lörrach,
#NS-105-0005
Sigma-Aldrich, München
Roth, Karlsruhe
Roth, Karlsruhe
PAA, Marburg

Material und Methoden

| | |
|---|--|
| EDTA | Roth, Karlsruhe |
| D-Erythrosphingosin | biomol, Hamburg, #10007907 |
| Ethidiumbromid | Roth, Karlsruhe |
| Fetal Calf Serum (FCS) | Biochrom AG, Berlin |
| Glutamin | PAA, Marburg |
| HCl | Roth, Karlsruhe |
| HEPES | Roth, Karlsruhe |
| Kaliumchlorid (KCl) | Roth, Karlsruhe |
| Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) | Merck, Darmstadt |
| Luminol | Roth, Karlsruhe |
| Luziferin | Sigma-Aldrich, München |
| Magnesiumhydroxidcarbonat ((MgCO ₃) ₄ Mg(OH) ₂ x 5H ₂ O) | Merck, Darmstadt |
| Magnesiumchlorid (MgCl ₂) | Merck, Darmstadt |
| Magnesiumsulfat (MgSO ₄ x 7 H ₂ O) | Sigma-Aldrich, München |
| Mefenaminsäure | Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA, #sc-205380 |
| Molekulargewichtsmarker (prestained) | Fermentas, St.Leon-Rot |
| Natriumchlorid (NaCl) | Roth, Karlsruhe |
| di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) | Merck, Darmstadt |
| Penicillin/Streptomycin | PAA, Marburg |
| Pregnenolonsulfat | Sigma-Aldrich, Steinheim, #P162 |
| Pregnenolon | Sigma-Aldrich, Steinheim, #P9129 |
| Progesteron | Sigma-Aldrich, Steinheim, #P8783 |
| Polybrene | Sigma-Aldrich, München |
| Reporterlysepuffer | Promega, Mannheim |
| Tetrazyklin | Sigma-Aldrich, München, #T7680 |
| TPA | Calbiochem, Darmstadt, #524400-1 |
| Tricine | Merck, Darmstadt |
| Tris | Roth, Karlsruhe |
| Trypsin/EDTA 10X | PAA, Marburg |
| Zeocin | Invitrogen, Darmstadt, #R250-01 |

2.1.4. Verwendete Vektoren und Plasmide

2.1.4.1. Verpackungs- und Transferplasmide zur Generierung infektiöser Viren

$\Delta 8.91$

Dieses Plasmid dient als Verpackungsplasmid und kodiert für die viralen Proteine gag, pol und rev, flankiert von dem starken „immediate early“ (IE)-Promotor/Enhancer des Cytomegalo-Virus (CMV) bzw. dem Polyadenylierungssignal des Simian-Virus 40 (SV40).

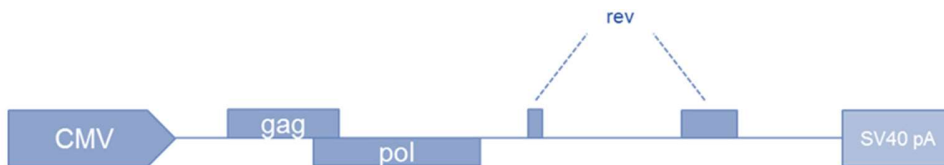


Abbildung 7 Schematische Darstellung des Verpackungsplasmids $\Delta 8.91$.

Der Vektor $\Delta 8.91$ enthält die Kodierungsregion für die viralen Proteine gag, pol und rev unter der Kontrolle des Immediate Early (IE)-Promotor/Enhancer des Cytomegalo-Virus (CMV). Es verfügt über das Polyadenylierungssignal des Simian-Virus 40 (SV40) (Thiel und Rössler, 2007).

pCMV-G

Das Expressionsplasmid pCMV-G kodiert für das virale Hüllprotein des Vesicular Stomatitis-Virus (VSV) unter der Kontrolle des starken „immediate early“ (IE)-Promotor/Enhancer des Cytomegalo-Virus (CMV) und besitzt am 3'-Ende das Polyadenylierungssignal des Simian-Virus 40 (SV40).



Abbildung 8 Schematische Darstellung des Expressionsplasmids pCMV-G.

In den Vektor wurde die Kodierungsregion für das virale Hüllprotein des VSV unter der Kontrolle des Immediate Early (IE)-Promotor/Enhancers des Cytomegalo-Virus (CMV) einkloniert. Es verfügt über das Polyadenylierungssignal des Simian-Virus 40 (SV40) (Thiel und Rössler, 2007).

pFUW

Der Transfervektor pFUW stellt das Grundgerüst für die lentiviralen Transfervektoren dar. Er besitzt keine kodierende Region für ein Transgen und dient als Kontrollplasmid (Lois et al., 2002).

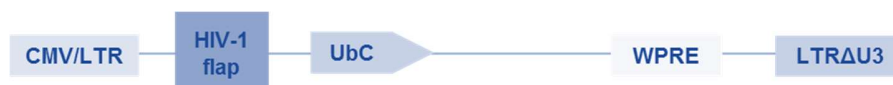


Abbildung 9 Schema des lentiviralen Transfervektors pFUW. Der Transfervektor pFUW ist das Grundgerüst der meisten in dieser Arbeit verwendeten Plasmide. Der humane Ubiquitin-C-Promotor (UbC) dient dabei als Promotor.

Weitere enthaltene Elemente sind der Promotor/Enhancer-Bereich des Cytomegalovirus (CMV) und das 5'long terminal repeat (LTR). Das darauffolgende HIV-1-flap-Element soll den Virustiter erhöhen, das „woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element“ (WPRE) die Transkriptionsrate. Die unterschiedlichen Sequenzen der verschiedenen Transgene wurden zwischen dem UbC-Promotor und dem WPRE inseriert.

2.1.4.2. Lentivirale Reporterplasmide

pFW-hcFos.luc

Kodiert für das Luziferasegen unter der Kontrolle des humanen c-Fos-Promotors von -711 bis +42. Spiegelt die SRE und CRE vermittelte Transkription wider.

pFW-hcFosTk.luc

Mutante des pFW-hcfos.luc, kodiert für das Luziferasegen unter Kontrolle des humanen c-Fos-Promotors, dessen CRE-Bindestelle mutiert ist. Dient der Kontrolle der CRE-vermittelten Transkription.

pFW-mcFos.luc

Kodiert für das Luziferasegen unter der Kontrolle des murinen c-Fos-Promotors (Ely et al., 2011).

pFW-mcFos.luc Δ AP-1

Mutante des pFW-mcfos.luc, kodiert für das Luziferasegen unter Kontrolle des murinen c-Fos-Promotors, dessen AP-1-Bindestelle mutiert ist. Dient der Kontrolle der AP-1-vermittelten Transkription (Ely et al., 2011).

pFW-mcFos.luc Δ Ets

Mutante des pFW-mcfos.luc, kodiert für das Luziferasegen unter Kontrolle des murinen c-Fos-Promotors, dessen Bindestelle für TCFs mutiert ist. Dient der Kontrolle der TCF-vermittelten Transkription (Ely et al., 2011).

pFW-mcFos.luc Δ CArg

Mutante des pFW-mcfos.luc, kodiert für das Luziferasegen unter Kontrolle des murinen c-Fos-Promotors, dessen SRF-Bindestelle mutiert ist. Dient der Kontrolle der SRF-vermittelten Transkription (Ely et al., 2011).

pFW-mcFos.luc Δ SIE

Mutante des pFW-mcfos.luc, kodiert für das Luziferasegen unter Kontrolle des murinen c-Fos-Promotors, dessen Bindestelle für STAT-Transkriptionsfaktoren (SIE = *SIS-inducible element*) mutiert ist. Dient der Kontrolle der STAT-vermittelten Transkription (Ely et al., 2011).

pFW-UAS⁵SP1².luc

Kodiert für das Reporter-gen Luziferase unter der Kontrolle eines Promotors, der fünf Bindestellen für GAL4 und zwei Bindestellen für Sp1 besitzt (Ekici et al., 2012). Wird verwendet, um die biologische Aktivität der GAL4-Fusionsproteine zu analysieren.

2.1.4.3. Lentivirale Expressionsplasmide

pFUW GAL4-Elk-1

Dieses Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein aus Elk-1 von Aminosäuresequenz 307 bis 428, das an die GAL4- DNA- Bindedomäne fusioniert wurde (Rössler et al., 2008; Thiel and Rössler, 2011) (Lesch et al., 2015)

pFUW GAL4-Sp1

Dieses Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein aus dem humanen Sp1 von Aminosäuresequenz 88 bis 620, das an die GAL4- DNA- Bindedomäne fusioniert wurde (Ekici et al., 2012).

pFUW-c-Jun Δ N

Dieser Vektor kodiert für eine dominant- negative Mutante von c-Jun (Steinmüller and Thiel, 2003). Besitzt ein N-terminalen FLAG-Tag.

pFUW-MKP-1

Dieses Plasmid wurde freundlicherweise von Nicholas K. Tonks, (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, USA) zur Verfügung gestellt. (Bauer et al., 2007; Stefano et al., 2007a). Es kodiert für die MAP-Kinase Phosphatase 1 und besitzt einen FLAG-Tag.

pFUW-REST/Elk-1 Δ C

Dieses Plasmid kodiert für eine dominant-negative Mutante des ternären Komplexfaktors Elk-1 (Stefano et al., 2006). Es besitzt die N-terminale Repressordomäne des transkriptionalen Repressors REST (Thiel et al., 1998) und einen N-terminalen FLAG-Tag zur immunologischen Detektion und ein Kernlokalisierungssignal.

pFUW Δ CnA

Dieser Vektor kodiert für eine konstitutiv aktive Mutante von Calcineurin A (Rössler et al., 2008). Er besitzt einen FLAG-Tag.

pFUW Δ CnA- EGFP

Dieses Plasmid kodiert für eine konstitutiv aktive Mutante von Calcineurin A (Lesch et al., 2017). Es besitzt einen GFP-Tag zur fluorimetrischen Detektion des exprimierten Proteins.

pLL3.7

Dieses lentivirale Transferplasmid enthält keine kodierende Region einer shRNA. Es dient als Kontrollplasmid bei Verwendung der pLL-shRNA-Konstrukte (Rubinson et al., 2003; Choi et al., 2006) und besitzt eine EGFP-Expressionskassette.

pLL3.7-shTRPM3

Dieser lentivirale Transfervektor kodiert für eine spezifische shRNA gegen TRPM3 (Mayer et al., 2011; Müller et al., 2011).

pLL3.7-c-Jun

Dieser Vektor kodiert für eine c-Jun- spezifische shRNA (Mayer et al., 2011). Er besitzt eine EGFP-Expressionskassette.

pLL3.7-ERK1

Dieses Plasmid kodiert für eine spezifische shRNA gegen die Kinase ERK1 unter der Kontrolle des U6-Promotors (Hong et al., 2009). Es besitzt eine EGFP-Expressionskassette.

pLL3.7-ERK2

Dieses Plasmid kodiert für eine spezifische shRNA gegen die Kinase ERK2 unter der Kontrolle des U6-Promotors (Hong et al., 2009). Es besitzt eine EGFP-Expressionskassette.

pLL3.7-JNK

Dieser Vektor kodiert für eine spezifische shRNA gegen die Kinase JNK unter der Kontrolle des U6-Promotors und beinhaltet eine EGFP-Expressionskassette.

Das Verpackungsplasmid, das VSV-G Expressionsplasmid und die aufgeführten Transferplasmide wurden freundlicherweise von Prof. Thiel zur Verfügung gestellt.

2.2. Methoden

2.2.1. Herstellung chemisch-kompetenter Bakterienzellen

Zur Herstellung kompetenter Zellen für die DNA-Transformation wurde der E. coli-Stamm XL-1 Blue in 10 ml antibiotikafreiem LB-Medium angeimpft und bei 37 °C für 10 bis 20 h unter starkem Schütteln inkubiert. 2 ml der Suspension wurden anschließend in 250 ml antibiotikafreies LB-Medium überführt und bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,5 inkubiert. Bei Erreichen der OD wurde die Kultur in einem vorgekühlten Zentrifugenbecher 10 min auf Eis gestellt und anschließend bei 4 °C und 4000 xg abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 50 ml eiskalter 0,1 M $MgCl_2$ -Lösung vorsichtig resuspendiert. Die Suspension wurde in 50 ml Tubes umgefüllt und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 0 °C und 1351 g für 5 min wurden die Bakterien in 5 ml eiskalter 0,1 M $CaCl_2$ /14 % [v/v] Glycerin-Lösung erneut vorsichtig resuspendiert. Abschließend wurden Aliquots zu je 200 µl in vorgekühlte Reaktionsgefäße abgefüllt und bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.2. Transformation chemisch-kompetenter Zellen

Die Transformation diente dem Einbringen und somit der Vervielfältigung von Plasmiden in Bakterienzellen. Bei der chemischen Transformation wurden pro Ansatz je 40 µl chemisch kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut, mit 0,1 - 0,2 µg Plasmid-DNA vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach 2 min Hitzeschock bei 42 °C wurde die Suspension erneut für 10 min auf Eis abgekühlt. Abschließend wurden 300 µl auf 37 °C vorgewärmtes LB-Medium ohne Selektionsantibiotikum zur Suspension gegeben und das Gemisch anschließend für 60 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach der erfolgten Transformation wurden die Zellen auf LB_{Amp} -Agarplatten ausplattiert und diese über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.2.3. Aufreinigung von Plasmid-DNA (Maxi-Plasmidpräparation)

Um größere, aufgereinigte Plasmidmengen von transformierten Bakterien mit gewünschtem Insert zu erhalten, wurde eine Maxi-Plasmidpräparation mithilfe des PureYield™ Plasmid Maxiprep System von Promega durchgeführt.

Dazu wurde am Vortag der Präparation in 10 ml LB-Medium mit 50 mg/ml Ampicillin eine mit 10-20 gepickten Kolonien angeimpfte Übertag-Kultur der transformierten Bakterien bei 37 °C 6-8 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden 200 ml flüssiges LB-Nährmedium mit 200 µl Ampicillin (100 mg/ml) mit 1 ml der gewachsenen Bakterienkultur überimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Kulturen in 50 ml Zentrifugenröhrchen 20 min abzentrifugiert (4000 x g, 4°C) und der Überstand verworfen. Die Plasmidpräparation erfolgte nach Angaben des Herstellers des PureYield™ Plasmid Maxiprep Systems.

2.2.4. DNA-Restriktion

Eine Restriktionsanalyse nach der Maxi-Plasmid-Präparation dient der finalen Überprüfung der korrekten Insertion des Zielgens in den Vektor. Dazu diente folgender Restriktionsansatz:

2 µl DNA

0,5 µl Enzym A

0,5 µl Enzym B

1 µl 10x Puffer (zu den Enzymen passend)

6 µl H₂O_{dd}

Nach mehrstündiger Inkubation des Ansatzes bei 37°C wurde das Resultat der Restriktion in einem Agarosegel überprüft.

2.2.5. Zellkultur

Die verwendeten Zelllinien wurden im Brutschrank bei 5% CO₂ und 37°C in feuchter Atmosphäre kultiviert. Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden unter der Sterilbank durchgeführt und alle Medien und Zusätze vor Gebrauch auf 37°C vorgewärmt.

2.2.5.1. Zelllinien

293T/17-Zellen

HEK293T Zellen leiten sich von humanen embryonalen Nierenzellen (293) ab, die mit dem T-Antigen SV40 transformiert wurden (Graham et al., 1977; DuBridgde et al., 1987). Diese wurden freundlicherweise von D. Baltimore (Rockefeller University, New York, USA) zur Verfügung gestellt.

T-REx-293-Zellen

HEK293T Zellen, die die kodierende Region des humanen TRPM3-Kanals, unter der Kontrolle eines Tetrazyklin-induzierten Promotors, enthalten. Diese wurden freundlicherweise von David Beech und Yasser Majeed (University of Leeds, UK) zur Verfügung gestellt und kultiviert wie zuvor beschrieben von (Naylor et al., 2008).

Tetrazyklin-System im Zellkultur-Modell:

In dieser Arbeit wurde das Inducible Protein Expression - T-REx™ System (Invitrogen) verwendet, ein TetOn-System zur gezielten Expression von TRPM3 mittels Tetrazyklin. Abbildung 10 zeigt eine schematische Darstellung des TetOn-Systems.

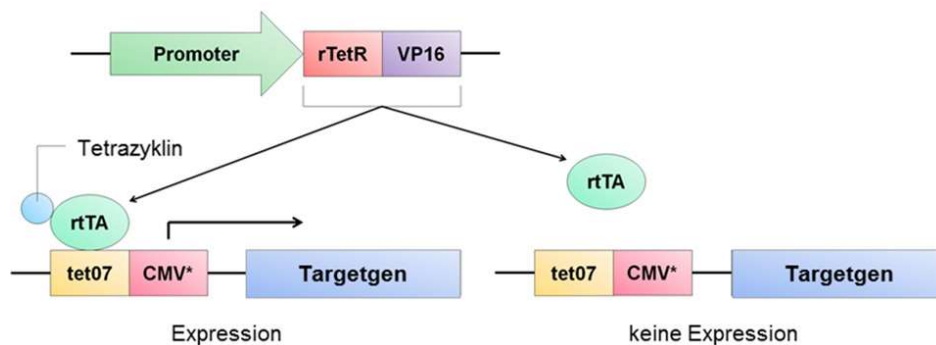


Abbildung 10 Schema des Tet-On Systems.

Der reverse Tetrazyklin-abhängige Transaktivator kann erst in Anwesenheit von Tetrazyklin an die Operon-Sequenz binden und die Transkription initiieren (Kohan, 2008).

Im Tet-On-System besteht der reverse Tetrazyklin-abhängige Transaktivator (rtTA) aus der rTetR-Domäne, der ein tetOperon (tetO), fusioniert mit der VP16 Transaktivierungsdomäne des Herpes-simplex-Virus, erkennt. rtTA bindet an sieben tetO-Domänen (tetO7), die mit einem minimal aktiven CMV-Promotor (CMV*) verbunden sind, was zur Genaktivierung führt. Durch die Zugabe von Tetrazyklin zum Kulturmedium der Zellen, bindet dieses an rtTA und induziert die Genaktivierung von TRPM3. In Abwesenheit von Tetrazyklin nimmt rtTA eine Konformation an, die eine Interaktion mit dem Operon verhindert (Kohan, 2008).

293ΔB-Raf:ER

Die HEK 293ΔB-Raf:ER-Zelllinie wurde mittels retroviralem Gentransfer generiert (Al-Sarraj et al., 2005) und freundlicherweise von Prof. Thiel zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie exprimiert stabil ein ΔB:Raf:Östrogenrezeptor-Fusionsprotein.

2.2.5.2. Kultivierung von Zellen

Sofern nicht anders beschrieben wurden die verwendeten Zelllinien in Zellkulturflaschen mit einer Größe von 175cm² und in folgendem Medium kultiviert:

DMEM

10% FCS

25 mM Glukose

2 mM L-Glutamin

100 U/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

Um zu vermeiden, dass im FCS enthaltene Substanzen Einfluss auf die Stimulation nehmen, wurde 24 Stunden vor der Stimulation der Serumgehalt im Medium auf 0,05% reduziert.

Serum-reduziertes Medium für 293/TRPM3-Zellen:

DMEM

0,05% FCS

25 mM Glukose

2 mM L-Glutamin

100 U/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C in feuchter Atmosphäre und einem CO₂-Gehalt von 5% inkubiert. Alle Zellkultur-Arbeiten wurden steril durchgeführt.

2.2.5.3. Auftauen von Säugerzellen

Die gefrorene Zellsuspension wurde rasch in einem 37°C warmen Wasserbad erwärmt und rasch in ein steriles 15ml Falcon überführt, in dem 9 ml warmes Medium vorgelegt waren. Die

Zellsuspension wurde 3 min lang bei 200 x g zentrifugiert, in ca. 3 ml Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche gegeben. Am folgenden Tag wurde das Medium in der Zellkulturflasche entfernt und durch frisches Medium ersetzt.

2.2.5.4. Passagieren von Säugerzellen

Es ist nötig, die Zellen zu passagieren, um sie im teilungsfähigen Zustand zu halten, sie zu vereinzeln, von abgeschiedenen Stoffwechselprodukten zu befreien und den Mangel an Nährstoffen zu beseitigen. Nach lichtmikroskopischer Beurteilung wurde je nach Zelltyp darüber entschieden, ob eine Subkultivierung nötig war. Die Zellen wurden in beschichteten Zellkulturgefäßen (Flaschen und Platten) kultiviert. Zur Subkultivierung von adhären Zellen wurde das Kultivierungsmedium zunächst vollständig abgenommen, der Zellrasen einmal mit 1x PBS (170 mM NaCl, 3,35 mM KCl, 4 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 1,84 mM KH₂PO₄ pH 7,2) gewaschen und mit 1x Trypsin/EDTA (0,25% (w/v) Trypsin, 0,1% (w/v) EDTA) bei 37°C so lange inkubiert, bis die Zellen sich vom Boden gelöst haben. Durch die anschließende Zugabe von frischem Medium wurde das zytotoxische EDTA gebunden. Die Zellsuspension wurde durch mehrmaliges vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert und die Zellen in neuen Zellkulturflaschen- oder schalen ausgesät.

2.2.5.5. Einfrieren von Säugerzellen

Nach Waschen mit 1x PBS und Ablösen vom Flaschenboden mit Trypsin/EDTA, wurden die Zellen mit Medium resuspendiert und 3 min lang in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen bei 200xg und 4°C zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in ca. 1,5 ml kaltem FCS mit 10% DMSO vorsichtig resuspendiert und in ein Kryokonservierungsröhrchen aliquotiert. Nach Zwischenlagerung bei -20°C über Nacht wurden die Zellen bei -80°C eingefroren und schließlich in flüssigen Stickstoff (-196°C) zur langfristigen Aufbewahrung überführt.

2.2.5.6. Aussäen von Zellen

10µl des durch Passagieren erhaltenen Zell-Medium-Gemischs wurden auf eine Neubauer-Zellzählkammer gegeben. Es wurden hier zwei 16-er Quadrate ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Die gezählte Zahl multipliziert mit dem Faktor 10.000 ergab daraufhin die Anzahl der Zellen pro ml Zell-Medium-Gemisch. Die gewünschte Anzahl an Zellen wurde auf 35 bzw. 60mm Zellkulturschalen ausgesät und mit Medium auf 2 bzw. 4ml aufgefüllt.

Folgende Zelldichten wurden ausgesät:

Tabelle 1 Übersicht über die benutzten Zelllinien, sowie die ausgesäte Zelldichte im jeweiligen Versuchsabschnitt.

| Vorgang | Zelllinie | Zelldichte |
|------------------------------|-----------------------|---------------------|
| Calciumphosphat-Transfektion | 293T/17 | 2 Mio./60mm-Schale |
| Lentivirale Infektion | 293/TRPM3 | 400.000/35mm-Schale |
| | 293 Δ B-Raf:ER | 200.000/35mm-Schale |

2.2.6. Manipulation eukaryontischer Zellen durch lentiviralen Gentransfer

Lentiviren gehören zur Gruppe der Retroviren und können gleichermaßen teilungsfähige sowie postmitotische Zellen infizieren. Daher werden Lentiviren als Vehikel für den Transfer von Genen in zahlreiche Zelllinien genutzt. Das Genom der Lentiviren ist nur etwa 10.000 Basenpaare groß und setzt sich aus drei Genbereichen zusammen: gag (group-specific antigen, kodiert für den Proteinmantel des Virus), pol (polymerase, kodiert für die virale Polymerase) und env (envelope, kodiert für das Hüllprotein). Auch in Lentiviren enthalten sind akzessorische Gene, die jedoch für die Replikation nicht essentiell sind. Repetitive DNA-Sequenzen, so genannte LTRs (long terminal repeats), die sich an beiden Enden der Nukleinsäure von Viren befinden, sind dafür verantwortlich, die revers transkribierte DNA vor hydrolytischem Abbau zu schützen, bevor es zum Einbau in das Wirtsgenom kommt. Das Repeat am 5'-Ende der Nukleinsäure fungiert als starker Promotor und unterstützt die Transkription viraler Gene, während das 3'-LTR ein Polyadenylierungssignal liefert, um das Ende des viralen Genoms zu definieren. Das Verpackungssignal Ψ hüllt das lentivirale Genom in einen Proteinmantel. Die lentiviralen Vektoren wurden mit dem Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis-Virus (VSV) pseudotypisiert, so dass der Virus in der Lage ist, Zellen unterschiedlicher Spezies zu infizieren (Burns et al., 1993; Naldini et al., 1996). Die bereits erwähnten Komponenten des lentiviralen Grundgerüsts werden auf zwei Plasmide aufgeteilt, um die Wahrscheinlichkeit zufälliger homologer Rekombination zu minimieren. Das Verpackungsplasmid, das die Gene gag und pol enthält, und das VSV-G Expressionsplasmid, welches das Gen für das env-Protein aufweist. Ein weiteres Plasmid wird als selbst inaktivierender Transfektor bezeichnet und enthält die cDNA des einzubringenden Gens. Der hierzu verwendete lentivirale Transfektor steht unter der Kontrolle des humanen Ubiquitinpromotors (Lois et al., 2002). Zusätzlich enthält er verschiedene regulatorische Elemente, die die Stabilität der lentiviralen Transgene und die Expression erhöhen: das posttranscriptional regulatory element (PRE) des Woodchuck (W) Hepatitis B-Virus (Zufferey et al., 1999). Dieses WPRE ist ein

posttranskriptionelles, regulatorisches Element und fördert den Transport von Provirus-RNA ins Zytosol. HIV-flap ist ein weiteres unterstützendes Element, das den Virentiter erhöht, indem es den Kerntransport der Viren-DNA katalysiert (Sirven et al., 2000).

2.2.6.1. Produktion von Lentiviren mittels Calciumphosphat-Transfektion in 293T/17-Zellen

Zum erfolgreichen Gentransfer ist eine Kotransfektion mit den drei folgenden Konstrukten nötig: Das Verpackungsplasmid enthält die Gene gag und pol, das VSV-G Expressionsplasmid enthält das Gen für das VSV-G env-Protein. Zusätzlich wird der SIN-Transfektor verwendet, der für die genomische RNA des Virus kodiert. An seinem 5'-Ende befindet sich eine nicht-lentivirale Promotor/Enhancer-Region, so dass die Effizienz der Herstellung von RNA-Transkripten gesteigert wird. Um infektiöse Partikel herstellen zu können, werden die Verpackungszellen 293T/17 mit den genannten drei Plasmiden kotransfiziert. Hierfür wurde die Transfektionsmethode der Calciumphosphat-Präzipitation verwendet. Die humane embryonale Nierenzelllinie 293T/17 weist eine hohe Transfektionsrate auf und ist daher gut zur Durchführung der Transfektion geeignet. Hierzu werden 24 h vor der Transfektion ca. $2,0 \times 10^6$ 293T/17 Zellen auf 60 mm Zellkulturschalen ausgesät und 24 h lang kultiviert. Für jeden Transfektor wurde eine Calciumphosphat-Transfektion, bestehend aus je zwei Lösungen, angesetzt: Lösung 1 mit der benötigten Menge DNA in Form der verschiedenen Plasmide, aufgefüllt auf 250 μ l H₂O Millipore. Außerdem waren 5 μ g des Verpackungsplasmids, 2,3 μ g des VSV-G Expressionsplasmids und 6,6 μ g des Transfektors enthalten. Der DNA-Gehalt der Plasmide wurde im Voraus photometrisch bei 260 und 280 nm bestimmt, wobei der Quotient OD_{280nm}/OD_{260nm} zur Überprüfung des Reinheitswertes (2,0) ermittelt wurde. Aus diesen Werten wurde das einzusetzende Volumen der Plasmid-Lösung errechnet. Zu diesen Komponenten von Lösung 1 wurde zuletzt eine 2.5M CaCl₂ zugegeben.

Lösung 2 besteht aus 2x HBSS (274 mM NaCl, 25 mM KCl, 3,75 mM Na₂HPO₄, 27,75 mM Glukose und 105 mM HEPES pH 7,05-7,12) und wurde vorsichtig zu Lösung 1 getropft, während diese vorsichtig besprudelt wurde. Das Medium der 293T/17-Zellen wurde abgenommen und durch Medium ersetzt, das 25 μ M Chloroquin enthielt. Chloroquin wirkt dem Abbau des Calciumphosphat/DNA-Gemisches entgegen und steigert die Transfektionseffizienz. Abschließend wurde ein Teil des fertigen Gemisches aus Lösung 1 und Lösung 2 auf die am Tag zuvor ausgesäten Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ über Nacht. Nach der Inkubation wurden die Zellen unter S2-Bedingungen (gentechnische Sicherheitsstufe 2)

zweimal mit 1x PBS gewaschen und mit frischem Medium versetzt. Nach 72 h konnten die Virenpartikel aus dem Mediumüberstand geerntet und für die Infektion eingesetzt werden. Die verwendeten Plasmide sind in Abschnitt 2.1.4 beschrieben.

2.2.6.2. Lentivirale Infektion eukaryotischer Zellen

Die Methode der lentiviralen Infektion wurde verwendet, um das jeweilige Gen von Interesse in das Chromatin der untersuchten Zelllinie einzubauen. So wurde ein möglichst zellnahes Modell zum Nachweis eines spezifischen Genexpressionsmusters erhalten. Die zu untersuchenden Zellen wurden kurz vor der Infektion in 35 mm Zellkulturschalen ausgesät. Am Tag der Infektion wurden die virenhaltigen Überstände der transfizierten Zellen abpipettiert und durch einen 0,45µm Spritzenfilter filtriert, um eine Kontamination der Zielzellen mit den Verpackungszellen zu vermeiden. Der Virusüberstand wurde mit 8 µg/ml Hexadimethrin-Bromid (Polybrene) versetzt, um die Anheftung des Virus an die Zielzellen zu erleichtern. Jeweils 1,5 ml des Virusüberstandes wurden anschließend auf die zuvor ausgesäten Zielzellen gegeben. Die Infektion erfolgte über Nacht bei 37°C und 5% CO₂.

2.2.6.3. Serumreduktion und Stimulation

Am Tag nach der Infektion wurden die Virenüberstände unter S2-Bedingungen abgenommen und frisches Kultivierungsmedium zugegeben. Nach 4-6 h wurde das Vollmedium durch serumreduziertes Medium (0,05% FCS) ersetzt, um eine Beeinflussung der Stimulation durch Bestandteile des im Medium vorhandenen FCS auszuschließen. Die Expression von TRPM3 wurde hierbei durch die Zugabe von Tetrazyklin [1µg/ml] induziert, 24 h vor Stimulation der Zellen. Zur Stimulation der Zellen am darauffolgenden Tag wurden die jeweiligen Stimuli zu serumreduziertem Medium gegeben. Tabelle 3 zeigt eine Übersicht der verwendeten Stimuli.

Tabelle 2 Übersicht über die Stock- und Endkonzentrationen der verwendeten Stimuli.

| Stimulus | Endkonzentration [µM] | Wirkung |
|-------------------|------------------------------|----------------|
| Pregnenolonsulfat | 20 | Agonist |
| CIM0216 | 20 | Agonist |
| Forskolin | 20 | Agonist |
| Mefenaminsäure | 30 | Antagonist |
| PD98059 | 50 | Antagonist |

2.2.7. Reporteranalysen

Um genregulatorische DNS-Sequenzabschnitte in Säugerzellen zu untersuchen, bedient man sich häufig der Reporteranalyse. Zur Durchführung von Reporteranalysen werden spezifische Promotorelemente vor Reportergene inkloniert. So wird bei Aktivierung des inklonierten Promotors das Reportergen exprimiert. Hier kodiert das Reportergen für das Enzym Luziferase. Die Luziferase ist in der Lage, eine Oxidation des zur Messung eingesetzten Substrats D-Luziferin zu Oxyluziferin zu katalysieren. Die aus dieser Reaktion resultierende Lichtemission konnte dann bei einer Wellenlänge von 562 nm im Luminometer detektiert werden. Über die gemessene Luziferaseaktivität konnten im Anschluss Rückschlüsse auf die Aktivität des in die Zielzellen eingebrachten Promotors gezogen werden.

2.2.7.1. Zellernte und Präparation von Gesamtprotein

Die Infektionen wurden in einem vierfachen Ansatz durchgeführt. Die lentiviral infizierten Zellen wurden einmal mit 1x PBS gewaschen, anschließend mit in 0,5 ml 1x PBS mit einem Zellschaber von der Zellkulturschale abgelöst, in ein Eppendorfgeläß überführt und bei 16000x g und 4°C für 5 min sedimentiert. Das Pellet wurde anschließend in 25-40 µl Reporterlysepuffer für 10 min auf Eis aufgeschlossen.

2.2.7.2. Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration in den Zellkern- bzw. Zytoplasmaextraktions-Lysaten wurde mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Protein-Assay ermittelt. Der BCA-Assay kombiniert die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Proteine in alkalischem Milieu mit dem hochempfindlichen und selektiven kolorimetrischen Nachweis des Kupferkations (Cu^{1+}) durch Bicinchoninsäure. Im ersten Schritt der Reaktion, die als Biuret-Reaktion bekannt ist, bilden Peptide, die drei oder mehr Aminosäurereste enthalten, einen farbigen Chelatkomplex mit Cu^{2+} -Ionen in einer alkalischen Umgebung, die Natriumkaliumtartrat enthält. Dadurch wird Cu^{2+} zu Cu^{1+} reduziert. Im zweiten Schritt der Farbentwicklungsreaktion reagiert Bicinchoninsäure (BCA) mit dem reduzierten Kupfer-Kation, das im ersten Schritt gebildet wurde. Das intensiv violett gefärbte Reaktionsprodukt ergibt sich aus der Chelatierung von zwei Molekülen BCA mit einem Kupferion. Die Reaktion, die zur BCA-Farbbildung führt, wird stark von vier Aminosäureresten (Cystein oder Cystin, Tyrosin und

Tryptophan) in der Aminosäuresequenz des Proteins beeinflusst (Smith et al., 1985). Abbildung 11 stellt das Reaktionsprinzip des BCA-Assays dar.

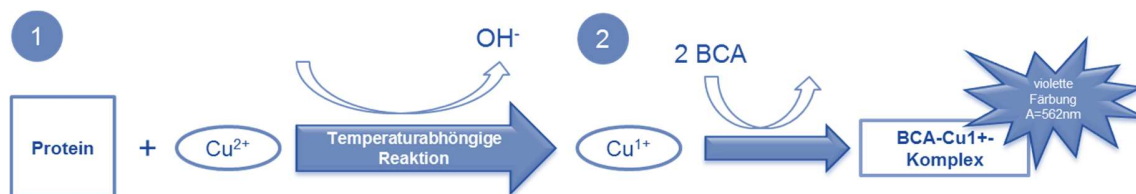


Abbildung 11 Reaktionsprinzip des BCA-Assays.

Zunächst reduzieren die Peptidbindungen im Protein Cu^{2+} -Ionen vom Kupfer(II)-sulfat zu Cu^{1+} (temperaturabhängige Reaktion). Die Menge an reduziertem Cu^{2+} ist proportional zur in der Lösung vorhandenen Proteinmenge. Im Anschluss chelatieren zwei Moleküle Bicinchoninsäure mit einem gebildeten Cu^{1+} -Ion, wobei ein violetter Komplex entsteht, der bei einer Wellenlänge von 562 nm stark absorbiert (aus (Smith et al., 1985)).

12,5 μl des Proteinextrakts wurden in eine 96-Well-Platte pipettiert und mit je 100 μl BCA-Lösung (1:50 Verdünnung aus BCA-Reagenz A und B, Interchim, Frankreich) versetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Absorption bei 562 nm gemessen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch den Computer unter Zuhilfenahme einer Standardkurve. Hierfür wurden BSA-Lösungen in den Konzentrationen 0, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 und 2000 $\mu\text{g/ml}$ verwendet. Pro Reaktionsansatz wurden vier Proben gemessen und daraus der Mittelwert gebildet sowie die Standardabweichung errechnet wurde.

2.2.7.3. Luziferase-Assay zum Nachweis der Genexpression

Je 10 μl des präparierten Gesamtzellextrakts wurden in ein Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und mit 50 μl Working Luziferase Assay Reagent (9 Vol. Luziferase Assay Reagent Stock (22 mM Tricine pH 7,8, 1,177mM $(\text{MgCO}_3)_4 \text{Mg}(\text{OH}) 2x 5\text{H}_2\text{O}$, 2,94 mM $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,11 mM EDTA, 36,3 mM DTT, 297 μM Coenzym A, 583 μM ATP) +1 Vol. 4,7mM Luziferin) versetzt. Unmittelbar danach wurde die Luziferaseaktivität im Luminometer gemessen. Die gemessenen Lichteinheiten wurden mithilfe des Programms Simplicity-Photocounter erfasst. Pro Reaktionsansatz wurden vier Proben gemessen, aus denen anschließend der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung errechnet wurde. Die relative Luziferaseaktivität ergibt sich durch die gemessene Proteinkonzentration [μg] in Abhängigkeit der gemessenen Lichteinheiten (lu).

$$\text{relative Luziferaseaktivität} = \frac{\text{light units (lu)}}{\text{Proteinkonzentration } [\mu\text{g}]}$$

Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mittels Balkendiagrammen.

2.2.8. Proteinbiochemische Methoden

2.2.8.1. Extraktion von Zytoplasmaproteinen

Die zuvor isolierten Zellpellets wurden mit 100 µl Puffer A (10 mM HEPES-KOH, pH 7,9, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,5 mM DTT, 0,5% Nonidet P40 (v/v), 40 µl/ml Complete 25x) versetzt und 30 min. auf Eis lysiert. Die mechanische Lyse erfolgte durch mehrmaliges Ziehen des Reaktionsgefäßes über ein Drahtgestell, der ein fünf minütiger Zentrifugationsschritt bei 4°C und 13000 x g folgte, um die Zellkerne von den restlichen Zellbestandteilen im Überstand zu separieren. Die erhaltenen Überstände wurden in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 5 µl zur Proteinbestimmung eingesetzt. Der restliche Extrakt wurde im Verhältnis 1:1 mit 2x SDS-Stoppuffer versetzt (Stock: 125 mM Tris/HCl pH 6,8; 3 mM EDTA; 20% (v/v) Glycerol; 9% SDS; 0,05% Bromphenolblau; Gebrauchslösung: 9 Vol. 2x SDS-Stoppuffer + 1 Vol. β-Mercaptoethanol) und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.2.8.2. Extraktion von Zellkernproteinen

Um im Zellkern exprimierte Proteine nachzuweisen, wurden die Zellkerne aus den geernteten Zellpellets extrahiert und aufgeschlossen. Dazu wurde das Pellet zunächst wie in Abschnitt 2.2.10.1. beschrieben behandelt. Das im Anschluss erhaltene Zellkern-Pellet wurde in Puffer C (10 mM HEPES-KOH, pH7,9, 25% Glycerin (v/v), 420 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 40 µl/ml Complete 25x) resuspendiert und mind. 30 min. auf die gleiche Weise wie in Abschnitt zuvor mechanisch aufgeschlossen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die erhaltenen Überstände, die die Zellproteine enthalten, in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, wovon 5 µl zur Proteinbestimmung eingesetzt wurden. Der restliche Extrakt wurde im Verhältnis 1:1 mit 2x SDS-Stoppuffer versetzt und für ca. 5 min bei 95°C gekocht.

2.2.8.3. Denaturierende diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mithilfe einer diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) konnte ich Proteine im elektrischen Feld ihrem Molekulargewicht bzw. ihrer Größe nach auftrennen. Dieses System ermöglicht eine optimale Trennung von Proteinen, deren Molekülmasse zwischen 5 und 250 kDa liegt, mit dem Vorteil einer hohen Bandenschärfe. Dabei werden die Proteine an die anionische Substanz SDS (sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat) gebunden, um die Eigenladungen der zu untersuchenden Proteine zu überdecken. Ich nutzte in meiner Arbeit ein 10%iges engporiges Trenngel, das in eine Minigelkammer gegossen. Nach Auspolymerisierung des Trenngels wurde ein weitporiges Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ein Kamm eingesteckt. Nach Polymerisation der Gele wurde die Gummidichtung zwischen den beiden Glasplatten entfernt, die Gelkammer mit 1x SDS-Laufpuffer (250 mM Tris pH 8,3, 2,5 M Glycin, 1% SDS (Laemmli, 1970) gefüllt und der Kamm vorsichtig herausgezogen. Zur Polymerisationsreaktion der enthaltenen Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung wurde zum Trenn- und Sammelgel jeweils 10%iges Ammoniumperoxidsulfat (APS) und TEMED zugegeben. Bei der Probenvorbereitung wurde das SDS im Überschuss zu den Proteinen hinzugegeben und die Proben anschließend auf 95°C erhitzt, um die Sekundär- und Tertiärstrukturen durch das Unterbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen aufzubrechen. Die reduzierenden Thiolverbindungen β -Mercaptoethanol und Dithiothreitol (DTT) wurden hierbei dem Probenpuffer zugesetzt, um die Disulfidbrücken aufzuspalten. Die mit 2x SDS-Stoppuffer versetzten Proben wurden 5 min lang bei 95°C gekocht. Anschließend wurden 50-100 μ g denaturiertes Protein in die Geltaschen geladen. Als Marker wurden gefärbte Proteine bekannten Molekulargewichts (Prestained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas) verwendet. Abschließend wurde eine Spannung von 65V angelegt, um die Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen.

Trenngel (10%)

4,2 ml H₂O

3,3 ml 30% Acryl/Bisacrylamid Mix (Rotiphoresegel 30, Roth)

2,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8

100 μ l 10% SDS (0,4%) (w/v)

100 μ l 10% APS

Sammelgel

3,2 ml H₂O

750 μ l 30% Acryl/Bisacrylamid Mix (Rotiphoresegel 30, Roth)

1,25 ml 0,5 M Tris pH 6,8

50 µl 10% SDS (0,4%) (w/v)
100 µl 10% APS
10 µl TEMED

2.2.8.4. Western Blot von SDS-Gelen

Zum immunologischen Nachweis der Proteine nutzte ich die Western Blot-Analysemethode. Nach elektrophoretischer Auftrennung der denaturierten Proteine wurden diese vom SDS-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Im Zuge meiner Experimente nutzte ich ein Flüssigtransfer-Verfahren in einer Blotting-Apparatur (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco). Bei einer Stromstärke von etwa 250 mA wurden die Proteine in 120 min Transferzeit elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran mit einer Porengröße von 0,2 µm und einer Dicke von 140 µm übertragen. Für den Transfer wurde luftblasenfrei ein „Sandwich“ aus einem Schwamm, drei Lagen 2 mm Whatman-Papier, der Nitrocellulose-Membran, dem SDS-Gel, weiteren drei Lagen Whatman-Papier und einem weiteren Schwamm in die mit Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol) befüllte Blottingapparatur gespannt. Dazu wurden die Schwämme, das Whatman-Papier und die Membran zuvor mit Transferpuffer angefeuchtet. Die Membran war in der Apparatur zur Anoden- und das SDS-Gel zur Kathodenseite orientiert. Die Schwämme, die Whatman-Papiere und die Nitrocellulose-Membran wurden vor Zusammenbau der Apparatur mit Transferpuffer befeuchtet. Die Proteine haben durch das im Elektrophoresegel enthaltene SDS eine negative Ladung. Legte man ein elektrisches Feld an, wurden die Proteine auf die Nitrocellulose-Membran übertragen. Nach Beendigung des Transfers wurde die Nitrocellulose-Membran mit 500 µl Ponceau-S-Lösung (Ponceau-S-Konzentrat, Herstellung gemäß den Herstellerangaben von Sigma-Aldrich; mit H₂O 1:20 verdünnt) angefärbt. Dadurch konnte die vollständige Übertragung der Proteine auf die Membran überprüft werden. Zum Entfärben wurde die Membran dreimal 5 min mit destilliertem Wasser gewaschen.

2.2.8.5. Immunzytochemischer Nachweis von Proteinen

Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran wurde diese zur Blockierung unspezifischer Bindestellen für mindestens 30 min bei RT mit Blocking-Lösung (5% Magermilchpulver (w/v) in TBS-T (10mM Tris-HCl pH 8.0, 150mM NaCl, 0,05% Tween 20)) inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit in TBS-T verdünntem Primärantikörper (Tabelle 2) über Nacht bei 4°C unter Schwenken inkubiert. Um ungebundene Primärantikörper zu entfernen, wurde die Membran 3 x 20 min auf einem Wipptisch mit TBS-T-Puffer gewaschen und

im Anschluss mit in TBS (10mM Tris-HCl pH 8.0, 150mM NaCl) verdünnten Sekundärantikörper (1:10000) für 2 h bei RT inkubiert. Der Sekundärantikörper war mit dem Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt und gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet. Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde die Membran erneut 3 x 15 min mit TBS-T-Puffer gewaschen. Der Komplex aus Protein, Primär- und Sekundärantikörper konnte durch das ECL-Substrat detektiert werden. Die beiden Lösungen ECL1 (100 mM Tris pH 8,5) und ECL2 (5,4 mM H₂O₂, 2,5 mM Luminol, 100 mM Tris pH 8,5, 400 µM para-Coumarsäure (Roth) wurden im Verhältnis 1:1 miteinander vermischt, gleichmäßig auf der Membran verteilt und für 2 min inkubiert. Die Peroxidase des Sekundärantikörpers katalysiert eine chemilumineszente Reaktion, deren Produkt mit Hilfe des ChemiDoc XRS+ Imaging Systems und der Quantity One 1-D Analysesoftware (BioRad) detektiert werden konnte. Die spezifischen Proteinbanden konnten hier anhand des mitgeführten Markers identifiziert werden. Die Expositionszeit wurde an die jeweilige Signalstärke angepasst.

Tabelle 3 Verwendete Primärantikörper

| Primärantikörper | Firma | Sekundärantikörper |
|-------------------------|------------------------------------|---------------------------|
| HDAC 1 (H-11) | Santa Cruz, Heidelberg (# sc81598) | anti-mouse IgG |
| c-Fos (4) | Santa Cruz, Heidelberg (# sc52) | anti-rabbit IgG |
| c-Jun (H-79) | Santa Cruz, Heidelberg (# sc1694) | anti-rabbit IgG |
| FLAG-M2 | Sigma, Deisenhofen (# F3165) | anti-mouse IgG |

Tabelle 4 Verwendete Sekundärantikörper

| Sekundärantikörper | Firma |
|--|--|
| Peroxidase-conjugated AffiniPure goat-anti-mouse IgG (H+L) | Jackson Immuno Research Lab Baltimore, USA (#115035003) |
| Peroxidase-conjugated AffiniPure goat-anti-rabbit IgG (H+L) | Jackson Immuno Research Lab Baltimore, USA (#111035003) |

Die Western Blot-Analysen, die in den Abschnitten 3.2.2. (Abbildung 16C), 3.2.3. (Abbildung 18D) und 3.2.5. (Abbildung 20D) gezeigt sind, wurden von Dr. Oliver Rößler durchgeführt und deren Ergebnisse mir freundlicherweise von ihm für meine Arbeit zur Verfügung gestellt.

2.2.9. Statistische Auswertung

Die Messdaten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) aus 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mittels Microsoft Excel und wurde auf Basis des two-tailed student's t-test durchgeführt. Das Signifikanzniveau P wurde mit 0.05 festgelegt und die statistische Wahrscheinlichkeit in meiner Arbeit wie folgt dargestellt: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

3. Ergebnisse

Experimente, die mit Insulinoma-Zellen durchgeführt wurden, zeigten, dass sowohl TRPM3-Kanäle als auch L-Typ spannungsgesteuerte Calcium-Kanäle an der Regulation der Genexpression, induziert durch Pregnenolonsulfat, beteiligt sind (Mayer et al., 2011). Weitere Studien in HEK293-Zellen belegen im Gegensatz dazu, dass ein Calcium-Einstrom nach TRPM3-Stimulation durch Pregnenolonsulfat unabhängig von L-Typ spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen stattfindet (Majeed et al., 2010; Wagner et al., 2008). Diese Beobachtungen zeigen, dass TRPM3 einen ligandengesteuerten ionotropen Rezeptor darstellt, der im aktivierten Zustand unabhängig von L-Typ spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen einen Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle zulässt. Zur Untersuchung der TRPM3-Kanäle diente bei den Experimenten zu dieser Arbeit ein spezielles HEK293-Expressionssystem, bei dem die TRPM3-Expression durch Zugabe von Tetracyclin ins Kulturmedium induziert werden konnte.

3.1. Aktivierung der Gentranskription durch CIM0216, einem synthetischen Liganden von TRPM3-Kanälen

3.1.1. AP-1-Aktivität in Pregnenolonsulfat- oder CIM0216-stimulierten HEK293-Zellen, die den TRPM3-Kanal exprimieren

Als Sensor zur Messung der AP-1 regulierten Gentranskription wurde ein Kollagenase-Promotor/Luziferase-Reportergen benutzt. Dieses konnte durch lentiviralen Gentransfer in das Chromatin von HEK293-Zellen integriert werden, die eine durch Tetracyclin induzierbare TRPM3-Expressionseinheit enthielten (Abbildung 12A). Ich testete verschiedene Konzentrationen von CIM0216, um die AP-1-responsive Reportergentranskription zu induzieren (Abbildung 12B). Zur Kontrolle wurden die Zellen mit Pregnenolonsulfat stimuliert (Abbildung 12C). Die Ergebnisse zeigten, dass CIM0216 signifikant die Transkription des Coll.luc-Reportergens stimulierte. Allerdings zeigte Pregnenolonsulfat einen mehr als doppelt so starken Effekt auf die AP-1-Aktivität via TRPM3 als CIM0216 (Abbildung 12D).

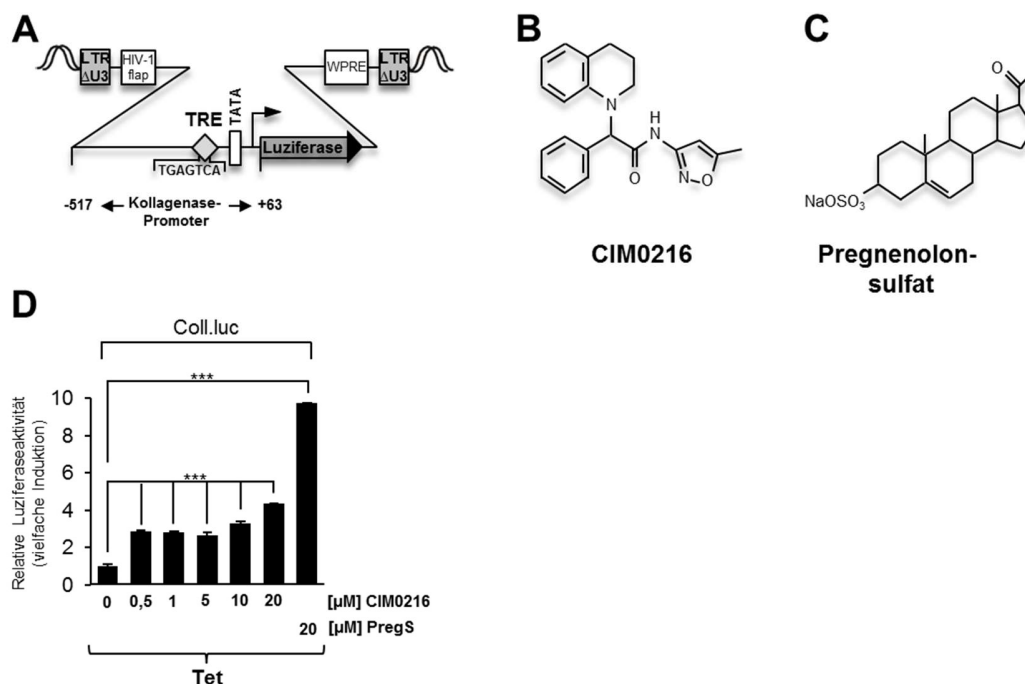


Abbildung 12 Stimulation von TRPM3 mit Pregnenolonsulfat oder CIM0216 aktiviert AP-1. (A) Schematische Darstellung des integrierten Provirus, der das AP-1-responsive Kollagenase-Promotor/Luziferase-Reportergen enthält (Coll.luc). Die AP-1-Bindestelle, auch Phorbol-12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA)-responsives Element (TRE) genannt, ist dargestellt. Das woodchuck hepatitis-virus posttranscriptional regulatory element (WPRE) und das HIV-flap-Element sind ebenfalls gezeigt. (B) CIM0216 (C) Pregnenolonsulfat (D) HEK293 Zellen, die eine durch Tetrazyklin induzierbare TRPM3-Expressionseinheit enthalten, wurden mit einem rekombinanten Lentivirus infiziert, der ein Kollagenase-Promotor/Luziferase-Reportergen besitzt (Coll.luc). Die Zellen wurden für 24 h in Medium mit 0,05% Serum in Anwesenheit von Tetrazyklin kultiviert (serumreduziert). Die Stimulation mit CIM0216 (0,5-20 μ M) oder Pregnenolonsulfat (PregS, 20 μ M) wurde ebenfalls für 24 h serumreduziertem Medium durchgeführt. Zellextrakte wurden präpariert und die Luziferase-Aktivität gemessen. Diese wurden auf ihre Protein-Konzentrationen normiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm -Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten, die vierfach durchgeführt wurden (***, $P < 0.001$).

3.1.2. Die Stimulation mit CIM0216 erhöht signifikant das Transkriptionsaktivierungspotential von c-Fos und c-Jun in TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen

Ursprünglich wurde der Transkriptionsfaktor AP-1 als ein Dimer der basischen Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktoren c-Fos und c-Jun identifiziert. Zur Messung der Transkriptionsaktivierungspotenziale von c-Fos und c-Jun wurden Fusionsproteine aus der DNA-Bindungsdomäne des Hefe-Transkriptionsfaktors GAL4 und den Aktivierungsdomänen von c-Fos und c-Jun, die durch Phosphorylierung reguliert werden, exprimiert (Abbildung 13A, 13B). Um die

Transkriptionsreaktion zu messen, integrierte ich ein Reportergen in das Genom, das GAL4-Bindestellen (UAS, upstream activation sequence) in seinem regulatorischen Bereich besaß (Abbildung 13C). Die Ergebnisse zeigen, dass das Transkriptionsaktivierungspotenzial von c-Fos und c-Jun in TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen, die mit CIM0216 oder Pregnenolonsulfat stimuliert wurden, signifikant erhöht wurde (Abbildungen 13D, 13E).

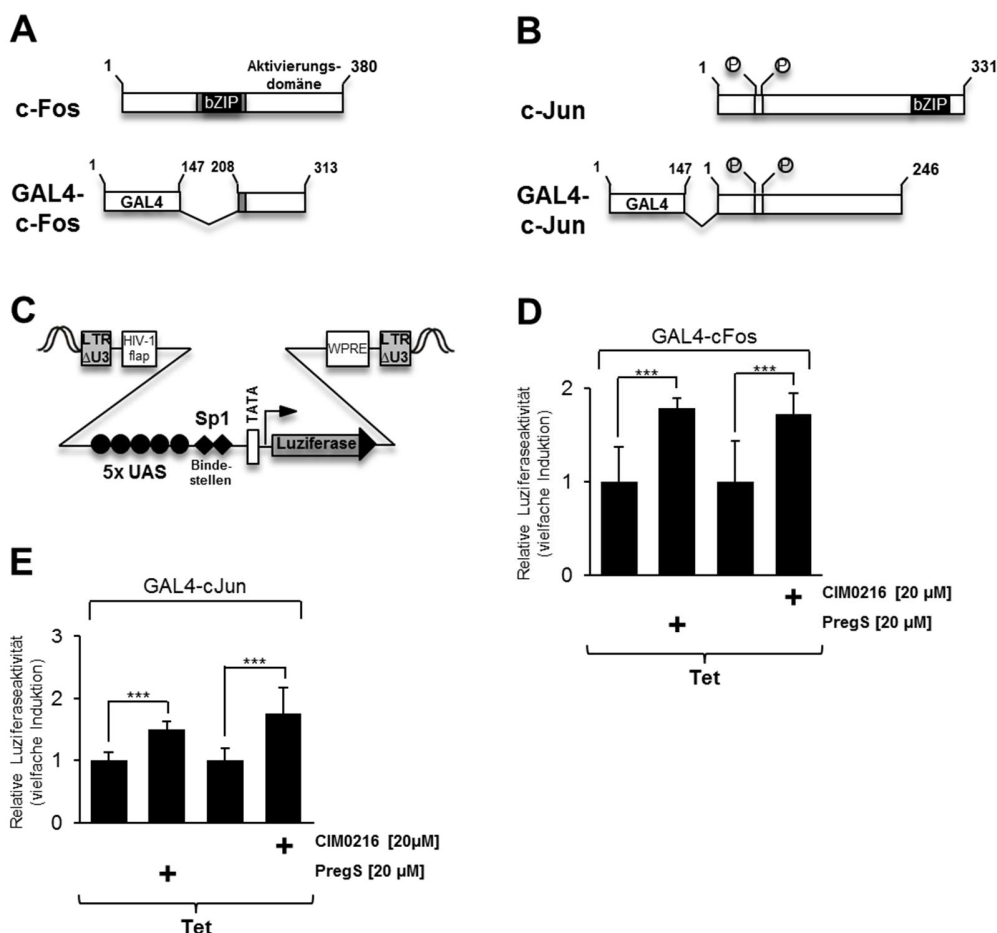


Abbildung 13 Stimulation von TRPM3 mit CIM0216 oder Pregnenolonsulfat erhöht das Transkriptionsaktivierungspotenzial von c-Fos und c-Jun. Schematische Darstellung der modularen Struktur von c-Fos und GAL4-c-Fos (A) bzw. c-Jun und GAL4-c-Jun (B). Die bZIP DNA-Bindestelle und die Dimerisierungsdomäne sind dargestellt. Den GAL4-Fusionsproteinen fehlte die bZIP-Domäne, sie besaßen jedoch noch die C-terminale Aktivierungsdomäne von c-Fos (GAL4-c-Fos) bzw. die N-terminale Aktivierungsdomäne von c-Jun (GAL4-c-Jun). Die verkürzten c-Fos- und c-Jun-Proteine wurden gemeinsam mit der N-terminalen DNA-Bindestelle von GAL4 als Fusionsprotein exprimiert. (C) Schematische Darstellung des integrierten Provirus, der für ein Luziferase-Reportergen unter der Kontrolle eines Minimalpromotors kodiert. Der Promotor besitzt fünf GAL4-Bindestellen (UAS, upstream activating sequence), zwei Sp1-Bindestellen, eine TATA-Box und ein Initiator-Element. (D, E) HEK293 Zellen, die eine durch Tetrazyklin induzierbare TRPM3-Expressionseinheit enthielten, wurden mit rekombinanten Lentiviren infiziert, die zum einen ein GAL4-responsives Luziferase-Reportergen, zum anderen GAL4-c-Fos (D) oder GAL4-c-Jun (E)

kodierten. Die Zellen wurden für 24 h in Anwesenheit von Tetrazyklin (1 µg/ml) serumreduziert. Die Stimulation mit CIM0216 (20 µM) oder PregS (20 µM) wurde ebenfalls für 24 h in serumreduziertem Medium durchgeführt. Zellextrakte wurden präpariert und die Luziferase-Aktivität gemessen. Diese wurden auf ihre Protein-Konzentrationen normiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte +/-Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten, die vierfach durchgeführt wurden (***, P < 0.001).

3.1.3. Die Inkubation mit Mefenaminsäure reduziert die CIM0216-induzierte AP-1-Aktivierung in TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen

In meiner Masterarbeit konnte ich zeigen, dass die Hochregulation von AP-1 in Pregnenolonsulfat-stimulierten HEK293-Zellen, die TRPM3 exprimieren, durch die Vorinkubation der Zellen mit Mefenaminsäure nahezu vollständig blockiert werden konnte (Lesch et al., 2014). Abbildung 14A zeigt, dass nach Inkubation der Zellen mit Mefenaminsäure die CIM0216-induzierte AP-1-Aktivierung in HEK293-Zellen, die TRPM3-Kanäle exprimierten, ebenfalls abgeschwächt war. Darüber hinaus reduzierte die Expression einer TRPM3-spezifischen shRNA die AP-1-Aktivität in TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen nach Stimulierung der Zellen mit CIM0216 oder Pregnenolonsulfat signifikant (Abbildung 14B). Somit beruht sowohl die CIM0216- als auch die Pregnenolonsulfat-induzierte Gentranskription auf der Aktivierung von TRPM3-Kanälen.

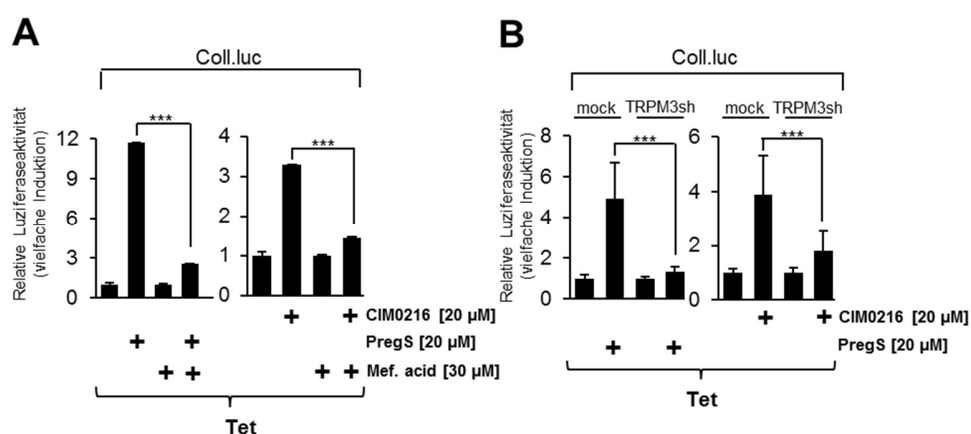


Abbildung 14 CIM0216 und Pregnenolonsulfat sind TRPM3-Liganden. (A) HEK293 Zellen, die eine durch Tetrazyklin induzierbare TRPM3-Expressionseinheit enthielten, wurden mit rekombinanten Lentiviren infiziert, die das Kollagenase-Promotor/Luziferase-Reportergen entielten (Coll.luc). Die Zellen wurden für 24 h in Anwesenheit von Tetrazyklin (1 µg/ml) serumreduziert und anschließend erneut für 24 h mit CIM0216 (20 µM) oder PregS (20 µM) in An- bzw. Abwesenheit von Mefenaminsäure (Mef, 30 µM) stimuliert. (B) HEK293 Zellen, die eine durch Tetrazyklin induzierbare TRPM3-Expressionseinheit enthielten, wurden mit rekombinanten Lentiviren infiziert, die das Kollagenase-Promotor/Luziferase-Reportergen entielten (Coll.luc). Zusätzlich wurden die Zellen mit einem Lentivirus infiziert, der für eine TRPM3-spezifische shRNA kodiert. Als Kontrolle diente dabei die Infektion der Zellen mit Lentiviren, die mit dem lentiviralen Transfervektor pLL3.7 generiert wurden (mock). Die Zellen wurden für 24 h in Anwesenheit von

Tetrazyklin (1 µg/ml) serumreduziert und anschließend für 24 h mit CIM0216 (20 µM) oder PregS (20 µM) stimuliert. Zellextrakte wurden präpariert und die Luziferase-Aktivität gemessen. Diese wurden auf ihre Protein-Konzentrationen normiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte +/-Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten, die vierfach durchgeführt wurden (***, P < 0.001).

3.2. Die Stimulation der TRPM3-Kanäle erhöht die c-Fos-Promotoraktivität, die c-Fos-Expression und das Transkriptionsaktivierungspotential von c-Fos

Das Steroid Pregnenolonsulfat aktiviert endogene TRPM3-Kanäle. Dies führt wiederum zu einer Hochregulation der c-Fos-Promotoraktivität (Müller et al., 2011). Daher war es für mich interessant zu untersuchen, welcher Signalweg bei der c-Fos-Promoteraktivierung involviert ist.

3.2.1. Pregnenolonsulfat bewirkt eine Transkriptionserhöhung von c-Fos-Promotor/Luziferase-Reportergenen

Ich verwendete den lentiviralen Gentransfer, um ein humanes c-Fos-Promotor/Luziferase-Reportergen (hc-Fos.luc) oder ein murines c-Fos-Promotor/Luziferase-Reportergen (mc-Fos.luc) in das Genom der Zellen zu integrieren. Die eukaryotische Chromatinstruktur wirkt hemmend auf die Transkription, die eine Zugänglichkeit zur DNA erfordert. Das Einbringen der Reporter Gene in das Chromatin stellte sicher, dass diese Gene in eine geordnete Nukleosomstruktur gepackt wurden. Im Gegensatz dazu können Plasmide, die Reporter Gene enthalten, die durch transiente Transfektion in die Zellen eingeführt werden unvollständig organisiert sein und somit einer prokaryotischen Genorganisation mit einem nicht einschränkenden Transkriptionsgrundzustand ähneln. Eine schematische Darstellung der integrierten Proviren, die das Luziferase-Reportergen unter der Kontrolle der menschlichen oder murinen c-Fos-regulatorischen Regionen kodieren, ist in Abbildung 15A gezeigt. Die charakteristischen genetischen Elemente innerhalb des c-Fos-Promotors sind dargestellt. HEK293-Zellen, die eine auf Tetrazyklin ansprechende TRPM3-Expressionskassette enthielten, wurden mit Lentiviren infiziert, die für eines der c-Fos-Promotor/Luziferase-Reporter Gene kodierten. Die Zellen wurden mit Tetrazyklin behandelt, um die TRPM3-Expression zu induzieren, für 24 Stunden serumreduziert und mit Pregnenolonsulfat für 24 Stunden stimuliert. Abbildung 15B zeigt, dass die Pregnenolonsulfat-Stimulation von HEK293-Zellen, die TRPM3 exprimierten, eine Hochregulation der c-Fos-Promotor-regulierten Reporter Gen-Transkription induzierte.

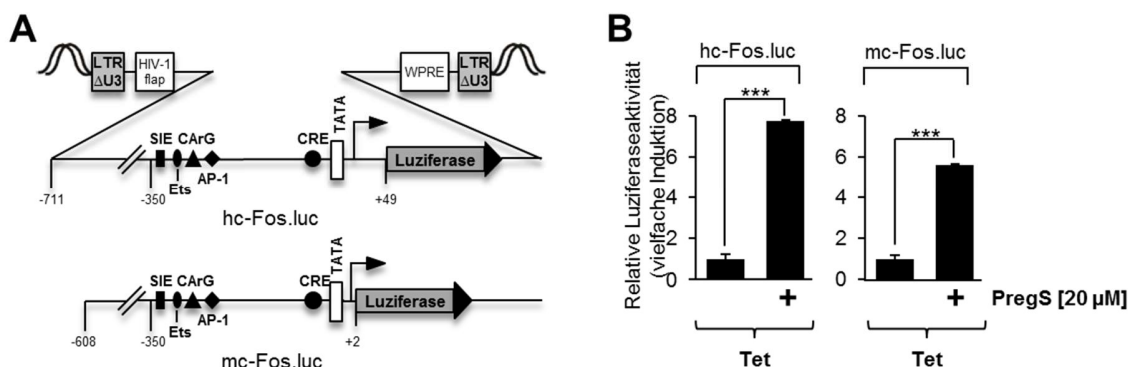


Abbildung 15 Die Stimulation von TRPM3 aktiviert die Transkription von c-Fos-Promotor/Luziferase-Reportergenen. (A) Schematische Darstellung der integrierten Proviren, die ein humanes (hc-Fos.luc) oder murines c-Fos-Promotor/Luziferase-Reporter-Gen (mc-Fos.luc) kodieren. Die charakteristischen Transkriptionsfaktor-Bindestellen sind dargestellt, einschließlich der STAT-Bindestelle (SIE), der Bindestelle für ternäre Komplexfaktoren (Ets), der CARg-Box, der AP-1-Bindestelle und des cAMP-responsiven Elements (CRE). (B) HEK293-Zellen, die eine Tetrazyklin-induzierbare TRPM3-Transkriptionseinheit enthielten, wurden mit rekombinanten Lentiviren infiziert, die ein humanes (hc-Fos.luc) oder murines c-Fos-Promotor/Luziferase-Reporter-Gen (mc-Fos.luc) kodieren. Die Zellen wurden 24 h lang in Gegenwart von Tetrazyklin (1 µg/ml) serumreduziert und dann mit PregS (20 µM) für 24 h stimuliert. Zellextrakte wurden präpariert und die Luciferase-Aktivitäten gemessen. Diese wurden auf ihre Protein-Konzentrationen normiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten, die vierfach durchgeführt wurden (***, $P < 0.001$).

3.2.2. Die Proteinphosphatasen MKP-1 und MKP-5 vermindern die Pregnenolonsulfat-induzierte Aktivierung des c-Fos-Promotors sowie die c-Fos-Expression in TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen

MAP-Kinase Phosphatase-1 (MKP-1), das Enzym, das die MAP-Kinasen extrazellulär-signalregulierte Proteinkinase (ERK), p38 und c-Jun-N-terminale Proteinkinase (JNK) im Zellkern dephosphoryliert und inaktiviert (Shapiro and Ahn, 1998; Slack et al., 2001), reduzierte die Pregnenolonsulfat-induzierte Hochregulation der Egr-1-Expression in Insulinomazellen (Mayer et al., 2011) und die Hochregulation der AP-1-Aktivität in Pregnenolonsulfat-stimulierten HEK293-Zellen, die TRPM3 exprimierten (Lesch et al., 2015). Daher testete ich, ob die Überexpression von MKP-1 auch die Pregnenolonsulfat-induzierte Transkription von c-Fos-Promotor/Reporter-Genen reduziert. Die Abbildungen 16A und 16B zeigen, dass die Reporter-Gen-Transkription in Pregnenolonsulfat-stimulierten TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen, die mit einem MKP-1-kodierenden Lentivirus infiziert worden waren, signifikant reduziert war. Darüber hinaus wurde die Reporter-Gen-Transkription auch in Zellen reduziert, die MKP-5 exprimierten, das Enzym, das die MAP-Kinasen p38 und JNK dephosphoryliert und inaktiviert. Die Expression von MKP-1 oder

MKP-5 reduzierte die Hochregulation der c-Fos-Expression nach Stimulation von TRPM3-Kanälen mit Pregnenolonsulfat signifikant (Abbildungen 16C und 16D). Wie bereits berichtet wurde, wird c-Fos wahrscheinlich aufgrund der Phosphorylierung als Doppelbande auf Western-Blots visualisiert (Koga et al., 2009; Kaufmann et al., 2013). Diese Daten zeigen, dass die Aktivierung von MAP-Kinasen wesentlich ist, um die TRPM3-Stimulation mit einer verbesserten c-Fos-Gentranskription und c-Fos-Expression zu verbinden.

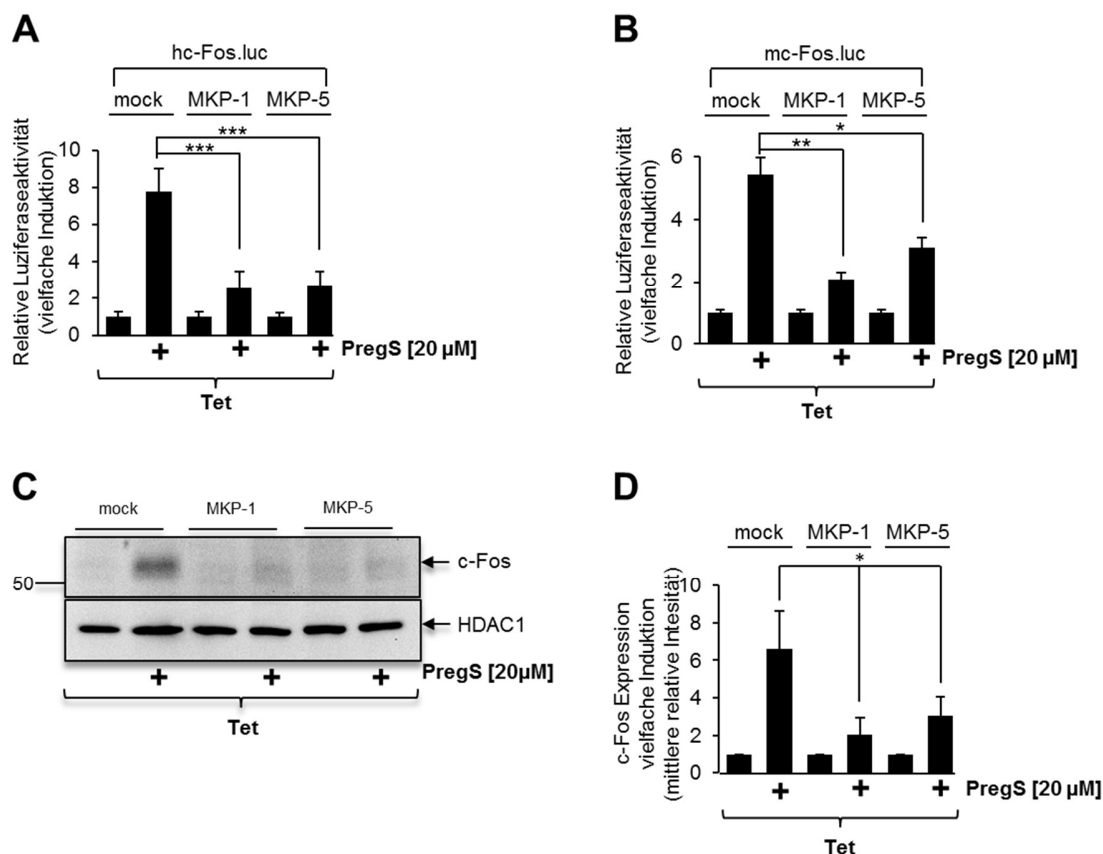


Abbildung 16 MAP-Kinasen verbinden die TRPM3-Aktivierung mit einer Erhöhung der c-Fos-Promotoraktivität und c-Fos-Expression. HEK293-Zellen, die eine durch Tetrazyklin induzierbare TRPM3-Transkriptionseinheit enthielten, wurden mit einem rekombinanten Lentivirus infiziert, der das Luziferase-Reportergen, unter der Kontrolle des menschlichen (A) oder des murinen (B) c-Fos-Promotors, enthielt. Die Zellen wurden zusätzlich mit einem Lentivirus infiziert, der entweder MKP-1 oder MKP-5 kodierte. Die Transgene wurden unter der Kontrolle des humanen Ubiquitin-C-Promotors exprimiert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit einem Lentivirus infiziert, der mit dem lentiviralen Transferplasmid pFUW (mock) erzeugt wurde. Die Zellen wurden 24 h lang in Gegenwart von Tetrazyklin (1 µg/ml) serumreduziert und dann mit PregS (20 µM) für 24 h stimuliert. Zellextrakte wurden hergestellt und die Luziferase-Aktivität analysiert. Diese wurde auf die Proteinkonzentration normiert. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von drei Experimenten, die in vierfacher Ausführung durchgeführt wurden (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). (C) HEK293-Zellen, die eine durch Tetrazyklin induzierbare TRPM3-Transkriptionseinheit enthielten, wurden mit einem rekombinanten Lentivirus infiziert, der entweder MKP-1 oder MKP-5 kodierte. Als Kontrolle wurden Zellen mit lentiviralen Zellüberständen, die mit dem lentiviralen Transfervektor pFUW (mock) hergestellt wurden,

infiziert. Die Zellen wurden 24 h lang in Gegenwart von Tetrazyklin (1 µg/ml) serumreduziert und dann mit PregS (20 µM) stimuliert. Zellkernextrakte wurden hergestellt und mit ihnen eine Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines gegen c-Fos gerichteten Antikörpers durchgeführt. Ein Antikörper gegen HDAC1 wurde als Ladekontrolle verwendet. Dieses Experiment wurde von Dr. Oliver Rößler durchgeführt. (D) Zur Quantifizierung der c-Fos-Expression wurde die Intensität des c-Fos-Signals auf die Intensität der HDAC1-Kontrolle normiert. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten (*, P < 0.05).

3.2.3. Die TRPM3-induzierte Signalkaskade zielt auf das CRE-Element im c-Fos-Promotor ab

Vor kurzem wurde gezeigt, dass die Stimulation von Insulinomazellen mit Pregnenolonsulfat zu einer signifikanten Hochregulation der CREB-vermittelten Gentranskription führt (Müller et al., 2011). Die Beteiligung von TRPM3 wurde in diesen Experimenten durch Expression einer TRPM3-spezifischen shRNA verifiziert, die die TRPM3-Expression signifikant herunterregulierte. Allerdings wurde die Pregnenolonsulfat-induzierte Hochregulation eines CRE-kontrollierten Reportergens auch durch Vorinkubation der Zellen mit dem L-Typ-spannungsgesteuerten Calciumkanal-Inhibitor Verapamil beeinträchtigt (Müller et al., 2011). Somit sind sowohl TRPM3 als auch spannungsgesteuerte Ca²⁺-Kanäle bei der Regulation von Pregnenolonsulfat-induzierter CRE-vermittelter Gentranskription in Insulinomzellen beteiligt. Die bisherigen Experimente haben gezeigt, dass die TRPM3-Stimulation die c-Fos-Gentranskription in HEK293-Zellen verstärkte. Nun stellte sich die Frage, ob das CRE-Element innerhalb des c-Fos-Promotors als Pregnenolonsulfat-reaktives Element nicht nur in Insulinomazellen, sondern auch in HEK293-Zellen, denen L-Typ-spannungsgesteuerte Ca²⁺-Kanäle fehlen, fungiert. Zuerst konnte ich bestätigen, dass ein Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration die Transkription von c-Fos-Promotor/Luziferase-Reportergenen stimuliert (Abbildung 17A). Ich habe das c-FosCRE⁴.luc-Reportergen verwendet, um die CRE-regulierte Gentranskription zu messen, da die Transkription dieses Gens nur durch die CREs reguliert wird (Abbildung 17B). Abbildung 17C zeigt, dass die Transkription dieses CRE-kontrollierten Reportergens in Pregnenolonsulfat-stimulierten TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen signifikant stimuliert wurde. Als Kontrolle zeigte ich, dass diese Transkriptionseinheit stark auf einen durch Forskolin, einen direkten Stimulator der Adenylylcyclase, erhöhten cAMP-Spiegel in den Zellen anspricht (Abbildung 17D).

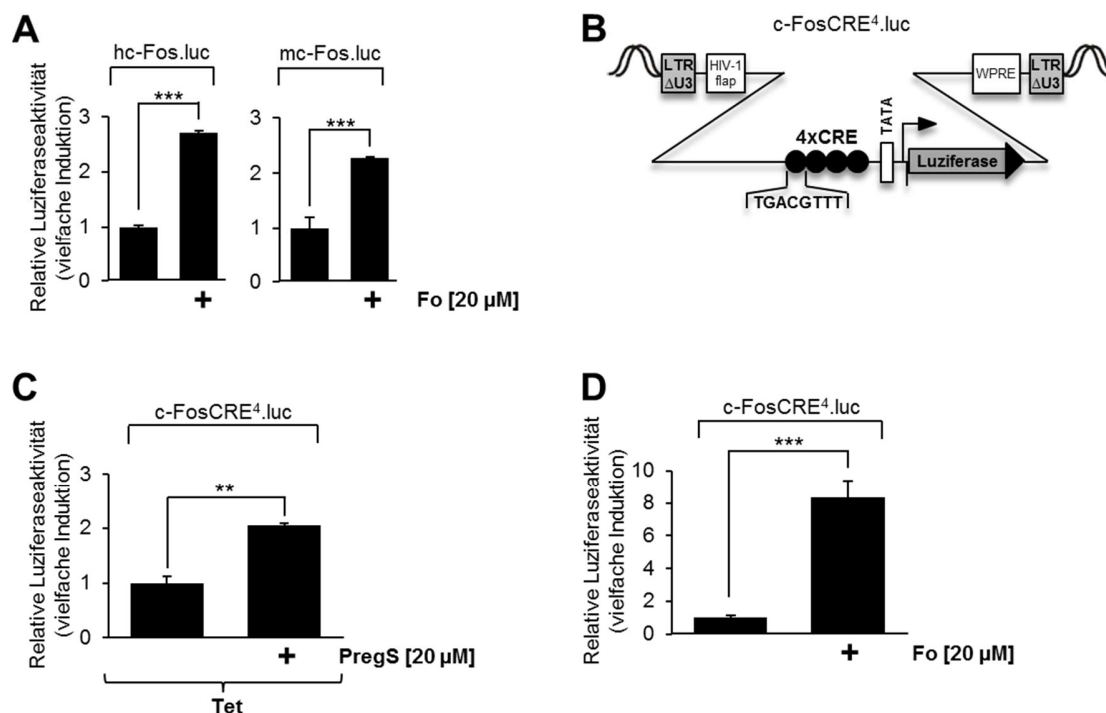


Abbildung 17 Die Stimulation von TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen mit Pregnenolonsulfat induziert eine durch das cAMP-responsive Element (CRE) des humanen c-Fos-Gens vermittelte Gentranskription. (A) HEK293-Zellen, die eine Tetrazyklin-induzierbare TRPM3-Transkriptionseinheit enthielten, wurden mit rekombinanten Lentiviren infiziert, die ein Luziferase-Reportergen unter der Kontrolle des humanen (linke Balken) bzw. des murinen (rechte Balken) c-Fos-Promotors kodierten. Die Zellen wurden für 24 h serumreduziert und anschließend mit Forskolin (Fo, 20 μM) für 24 h stimuliert. Zellextrakte wurden hergestellt und die Luziferaseaktivität analysiert. Diese wurde auf die Proteinkonzentration normiert. Die angegebenen Daten sind Mittelwert +/- Standardabweichung (***, P < 0.001) (B) Schematische Darstellung des integrierten Provirus, der ein c-FosCRE⁴/Luziferase-Reportergen kodiert. Die regulatorische Region des Reportergens enthielt einen minimalen Promotor, bestehend TATA-Box und vier Kopien von CRE, die aus dem menschlichen c-Fos-Gen stammten. (C) HEK293-Zellen, die eine Tetrazyklin-induzierbare TRPM3-Transkriptionseinheit enthielten, wurden mit rekombinanten Lentiviren infiziert, die das Luziferase-Reportergen c-FosCRE⁴.luc enthielten. Die Zellen wurden 24 h lang in Gegenwart von Tetrazyklin (1 μg/ml) serumreduziert und dann mit PregS (20 μM) (C) oder Forskolin (Fo, 20 μM) (D) für 24 h stimuliert. Zellextrakte wurden hergestellt und die Luziferaseaktivität analysiert. Diese wurde auf die Proteinkonzentration normiert. Die angegebenen Daten sind Mittelwert +/- Standardabweichung (**, P < 0.01; ***, P < 0,001).

Um diese Beobachtung zu bestätigen, habe ich eine dominant-negative Mutante von CREB (REST/CREB) in HEK293-Zellen exprimiert, die eine Tetrazyklin-responsive TRPM3-Expressionseinheit enthielten. Diese Mutante enthielt die bZIP-Domäne von CREB, jedoch fehlten ihr die Aktivierungsdomänen (Abbildung 18A). Zellkernproteine von Kontroll-infizierten HEK293-Zellen oder solchen, die mit einem REST/CREB-kodierenden Lentivirus infiziert waren, wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und das Fusionsprotein mittels Western-Blot-Analyse unter

Verwendung von Antikörpern, die auf das FLAG-Epitop abzielten, identifiziert (Abbildung 18B). Anschließend habe ich die funktionellen Effekte der REST/CREB-Expression auf die Pregnenolonsulfat-induzierte Aktivierung des c-Fos-Promotors untersucht. Abbildung 18C zeigt, dass die Expression von REST/CREB die Hochregulation der c-Fos-Promotor/Reportergen-Transkription in Pregnenolonsulfat-stimulierten HEK293-Zellen, die TRPM3-Kanäle exprimierten, signifikant reduzierte. Zusätzlich drückte die Expression von REST/CREB die Hochregulation der c-Fos-Expression in HEK293-Zellen nach Aktivierung von TRPM3-Kanälen ab (Abbildung 18D und 18E). Diese Daten zeigen, dass CREB Teil der Signalkaskade ist, die die Stimulation von TRPM3-Kanälen mit einer verbesserten c-Fos-Promotoraktivität und c-Fos-Expression verbindet.

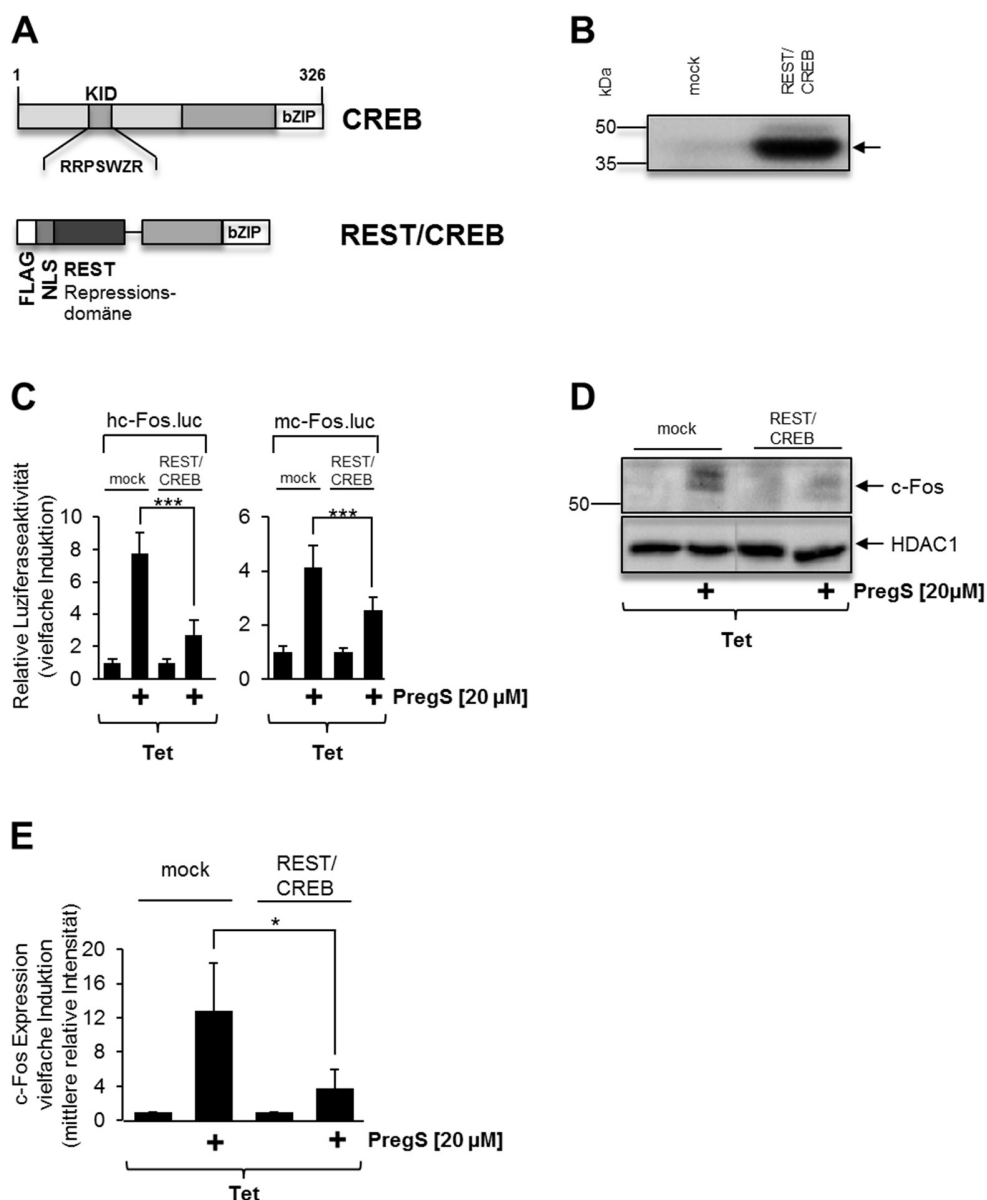


Abbildung 18 Die Expression einer dominant-negativen CREB-Mutante reduziert die Hochregulation der c-Fos-Promotoraktivität und der c-Fos-Expression in HEK293-Zellen, die aktivierte TRPM3-Kanäle exprimierten. (A) Schematische Darstellung von CREB und der dominant-negativen Mutante REST/CREB. Die phosphorylierungsabhängige transkriptionelle Aktivierungsdomäne von CREB (kinaseinduzierbare Domäne, KID) ist dargestellt. Die bZIP-Domäne befindet sich am C-Terminus. Der Mutante fehlt der KID-Domäne, DNA- und Dimerisierungsdomänen sind noch vorhanden. Die Mutante wird als Fusionsprotein zusammen mit einer Transkriptionsrepressionsdomäne, die aus dem Transkriptionsrepressor REST stammt, exprimiert. (B) Western-Blot-Analyse von HEK293-Zellen mit einem Kontroll-Lentivirus (mock) oder mit rekombinanten Lentiviren, die für REST/CREB kodieren, infiziert. Die Western Blots wurden mit einem Antikörper gegen den FLAG-Epitop untersucht. (C) HEK293-Zellen, die eine Tetrazyklin-induzierbare TRPM3-Transkriptionseinheit enthielten, wurden mit einem Lentivirus infiziert, der ein vom humanen c-Fos-Promotor (linke Balken) oder vom murinen c-Fos-Promotor kontrolliertes Luziferase-Reportergen (rechte Balken) kodierten. Außerdem wurden sie mit einem für REST/CREB kodierenden

Lentivirus infiziert. Als Kontrolle dienten Lentiviren, die mit dem lentiviralen Transfervektor pFUW (mock) hergestellt wurden. Zellextrakte wurden hergestellt und auf Luziferase-Aktivitäten analysiert, welche dann auf die Proteinkonzentration normiert wurde. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte +/- Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten, die vierfach durchgeführt wurden (**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). (D) HEK293-Zellen, die eine Tetrazyklin-induzierbare TRPM3-Transkriptionseinheit enthielten, wurden mit einem rekombinanten Lentivirus infiziert, der für REST/CREB kodierte. Kontrollzellen wurden mit Lentiviren infiziert, die mit dem lentiviralen Transfervektor pFUW (mock) hergestellt wurden. Die Zellen wurden 24 h lang in Gegenwart von Tetrazyklin (1 $\mu\text{g/ml}$) serumreduziert und dann mit PregS (20 μM) stimuliert. Kernextrakte wurden hergestellt und einer Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines gegen das c-Fos-Protein gerichteten Antikörpers unterworfen. Ein Antikörper gegen HDAC1 wurde als Ladekontrolle verwendet. Dieses Experiment wurde von Dr. Oliver Rößler durchgeführt. (E) Quantifizierung der c-Fos-Expression. Die Intensität des c-Fos-Signals wurde auf die Intensität der HDAC1-Expression normiert. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte +/- Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten (*, $P < 0.05$).

3.2.4. Die AP-1-Bindestelle und die CARG-Box sind Pregnenolonsulfat-responsive Elemente im murinen c-Fos-Promotor

Um zu überprüfen, ob das CRE innerhalb des c-Fos-Promotors das einzige auf Pregnenolonsulfat ansprechende genetische Element ist, habe ich diese Sequenz innerhalb des humanen c-Fos-Promotors entfernt. Eine schematische Darstellung der integrierten Proviren, die das Luziferase-Reportergen unter der Kontrolle der verkürzten menschlichen, regulatorischen Region von c-Fos kodierten, ist in Abbildung 19A gezeigt. Die Stimulation von HEK293-Zellen mit Forskolin zeigte, dass die Transkription eines Reportergens unter der Kontrolle des verkürzten c-Fos-Promotors nicht mehr auf einen erhöhten cAMP-Spiegel in den Zellen ansprach (Abbildung 19B). Die Transkription des verkürzten c-Fos-Promotor/Luziferase-Reportergens reagierte jedoch weiterhin auf die Pregnenolonsulfat-Stimulation, solange TRPM3 exprimiert wurde (Abbildung 19C). Diese Daten deuten darauf hin, dass - neben dem CRE - andere genetische Elemente an der Hochregulation der c-Fos-Expression nach Stimulation von TRPM3 mit Pregnenolonsulfat beteiligt sind.

Um andere TRPM3-responsive Elemente zu identifizieren, analysierte ich Mutanten des murinen c-Fos-Promotors, die Basenpaar-Mutationen der STAT-Bindestelle (SIE = *SIS-inducible element*) und der Bindestellen für ternäre Komplexfaktoren (Ets), Serum-Response-Faktor (SRF, CARG-Box) und AP-1 enthielten (Abbildung 19D). Die Ergebnisse zeigen, dass die Mutation der Bindestellen für AP-1 und SRF signifikant die Pregnenolonsulfat-induzierte Hochregulation der c-Fos-Promotor/Luziferase-Gentranskription beeinträchtigte (Abbildung 19E). Im Gegensatz dazu hatte die Mutation der Ets-Stelle und des SIE, die ternäre Komplexfaktoren bzw. STAT-

Transkriptionsfaktoren binden, keinen Einfluss auf die TRPM3-induzierte Hochregulation der Reportergentranskription.

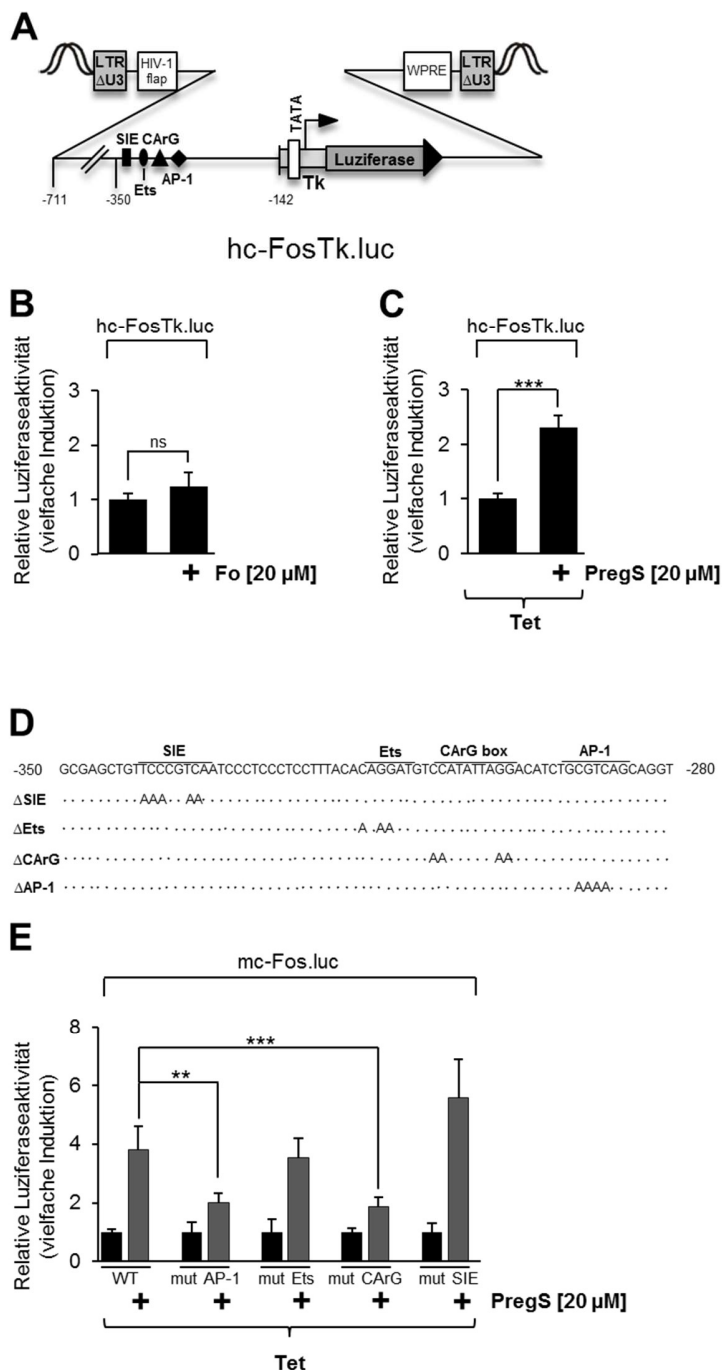


Abbildung 19 Eine Mutationsanalyse identifiziert die AP-1-Bindestelle und die CArG-Box als Pregnenolonsulfat-responsive Elemente innerhalb des c-Fos-Promotors. (A) Schematische Darstellung des integrierten Provirus, das für ein verkürztes c-Fos-Promotor/Luziferase-Reportergen kodiert, dem das CRE fehlt. (B, C) HEK293-Zellen, die eine durch Tetrazyklin induzierbare TRPM3-Transkriptionseinheit enthielten, wurden mit rekombinanten Lentiviren infiziert, die ein Luziferase-Reportergen unter der Kontrolle des verkürzten humanen c-Fos-Promotors kodierten. Die Zellen

wurden für 24 h serumreduziert und dann für 24 h mit Forskolin (Fo, 20 μ M) (B) oder PregS (20 μ M) in Gegenwart von Tetrazyklin (1 μ g/ml) (C) stimuliert. (D) Sequenz des murinen c-Fos-Promotors von -350 bis -280. Die mutierten Basenpaare von SIE, Ets und SRF bzw. der AP-1-Bindestelle sind dargestellt. (E) HEK293-Zellen, die eine Tetrazyklin-induzierbare TRPM3-Transkriptionseinheit enthielten, wurden mit rekombinanten Lentiviren infiziert, die entweder das murine c-Fos-Promotor/Luziferase-Reportergen oder eines der mutierten murinen c-Fos-Promotor/Luziferase-Reportergene kodierten. Die Zellen wurden 24 h in Gegenwart von Tetrazyklin (1 μ g/ml) serumreduziert und dann für 24 h mit PregS (20 μ M) stimuliert. Zellextrakte wurden hergestellt und auf Luziferase-Aktivitäten analysiert, welche dann auf die Proteinkonzentration normiert wurde. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten, die vierfach durchgeführt wurden (**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

3.2.5. Die Expression einer dominant-negativen Mutante des Transkriptionsfaktors Elk-1 reduziert die vom c-Fos-Promotor regulierte Reportergentranskription sowie die c-Fos-Expression in TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen

Experimente mit Insulinomazellen zeigten, dass die Expression einer dominant-negativen Mutante des ternären Komplexfaktors Elk-1 (REST/Elk-1 Δ C) die c-Fos-Promotoraktivität nach Stimulation endogener TRPM3-Kanäle mit Pregnenolonsulfat reduzierte (Müller et al., 2011). Diese Mutante behält die DNA-Bindedomäne und SRF-Interaktionsdomäne bei, ihr fehlt jedoch die C-terminale Phosphorylierungs-regulierte Aktivierungsdomäne von Elk-1. REST/Elk-1 Δ C enthielt zusätzlich die N-terminale Repressionsdomäne des Transkriptionsrepressors REST (Abbildung 20A). Ich exprimerte die Mutante in HEK293-Zellen, die eine Tetrazyklin-responsive TRPM3-Expressionseinheit enthielten (Abbildung 20B), und beurteilte den Einfluss dieser Mutante auf die Regulation der c-Fos-Promotoraktivität. Die Ergebnisse zeigen, dass die Expression der Mutante die Hochregulation der Reportergentranskription in Pregnenolonsulfat-stimulierten HEK293-Zellen, die TRPM3 exprimieren, reduzierte (Abbildung 20C). Somit reduzierte die Expression der dominant-negativen Elk-1-Mutante, die an die Ets-Bindestelle des c-Fos-Promotors bindet und auch die SRF-Bindedomäne besitzt, die Pregnenolonsulfat-induzierte Aktivierung des c-Fos-Promotors (Abbildung 20D, 20E) – obwohl die Ets-Bindestelle nicht für die Hochregulation der c-Fos-Expression durch Pregnenolonsulfat über TRPM3 nötig ist (Abbildung 19E). Diese Daten zeigen, dass Elk-1 ein wichtiges Signalmolekül ist, das die TRPM3-Stimulation mit einer verstärkten c-Fos-Promotoraktivität und c-Fos-Expression verbindet.

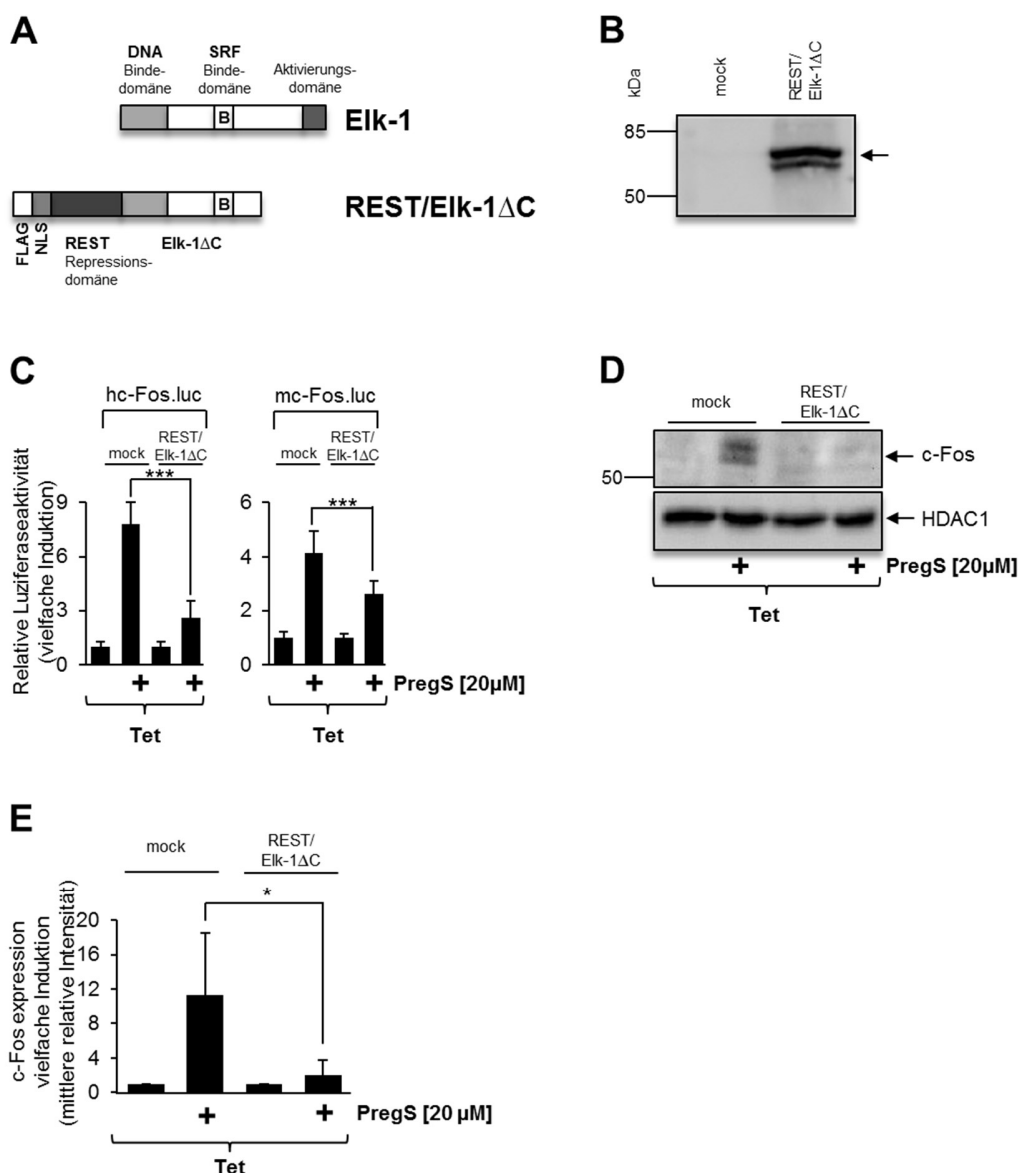


Abbildung 20 Die Expression einer dominant-negativen Mutante von Elk-1 reduzierte die Hochregulation der c-Fos-Promotoraktivität und der c-Fos-Expression in HEK293-Zellen, die aktivierte TRPM3-Kanäle exprimierten. (A) Schematische Darstellung von Elk-1 und der dominant-negativen Mutante REST/Eik-1 Δ C. (B) Western-Blot-Analyse von HEK293-Zellen, die entweder mit einem für REST/Eik-1 Δ C kodierenden rekombinanten Lentivirus oder mit einem Kontroll-Lentivirus infiziert worden waren. Der Western-Blot wurde mit einem Antikörper gegen das FLAG-Epitop getestet. Marker für die Molekulargewichte in kDa sind auf der linken Seite gezeigt. (C) HEK293-Zellen wurden zum einen mit einem Lentivirus infiziert, der ein Luziferase-Reportergen unter der Kontrolle des humanen (linke Balken) bzw. des murinen (rechte Balken) c-Fos-Promotors kodieren. Zusätzlich wurden die Zellen mit einem Lentivirus infiziert, der für REST/Eik-1 Δ C kodiert. Als Kontrolle dienten lentivirale Überstände, die mit dem lentiviralen Transfektor pFUW (mock) hergestellt wurden. Die Zellen wurden 24 h in Gegenwart von Tetracyclin (1 μ g/ml) serumreduziert und dann 24 h mit PregS (20 μ M) stimuliert. Zellextrakte wurden hergestellt und auf Luziferase-Aktivitäten analysiert. Die Luziferase-Aktivität wurde auf die Proteinkonzentration normiert. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte \pm

Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten, die vierfach durchgeführt wurden (***) $P < 0,001$). (D) HEK293-Zellen, die eine Tetrazyklin-induzierbare TRPM3-Transkriptionseinheit enthielten, wurden mit einem rekombinanten Lentivirus infiziert, der für REST/Elk-1 Δ C kodiert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit lentiviralen Überständen infiziert, die mit dem lentiviralen Transfervektor pFUW (mock) hergestellt wurden. Die Zellen wurden 24 Stunden lang in Gegenwart von Tetrazyklin (1 μ g/ml) serumreduziert und anschließend mit PregS (20 μ M) stimuliert. Kernextrakte wurden hergestellt und einer Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines gegen das c-Fos-Protein gerichteten Antikörpers unterzogen. Ein gegen HDAC1 gerichteter Antikörper wurde als Ladekontrolle verwendet. Dieses Experiment wurde von Dr. Oliver Rößler durchgeführt. (E) Quantifizierung der c-Fos-Expression. Die Intensität des c-Fos-Signals wurde auf die Intensität der HDAC1-Kontrolle normiert. Die angegebenen Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei Experimenten (*, $P < 0,05$).

3.2.6. Die Expression einer dominant-negativen Mutante des Transkriptionsfaktors c-Jun vermindert die vom c-Fos-Promotor regulierte Reportergentranskription und die c-Fos-Expression via TRPM3

Die Mutationsanalyse des murinen c-Fos-Promotors ergab, dass die AP-1-Stelle innerhalb des Promotors an der Verbindung der TRPM3-Stimulation mit einer Zunahme der c-Fos-Promotoraktivität beteiligt ist. Es wurde auch kürzlich gezeigt, dass die Stimulation von TRPM3-Kanälen mit Pregnenolonsulfat die Biosynthese von c-Jun in HEK293-Zellen, die TRPM3 exprimieren, induziert (Lesch et al., 2014). Um die Rolle von c-Jun bei der Regulation der c-Fos-Promotoraktivität zu bestätigen, habe ich die dominant-negative Mutante c-Jun Δ N in HEK293-Zellen exprimiert, die eine durch Tetrazyklin induzierbare TRPM3-Expressionseinheit enthielten. Die modulare Struktur von c-Jun und der dominant-negativen Mutante von c-Jun, c-Jun Δ N, ist in Abbildung 21A dargestellt. Abbildung 21B zeigt, dass die Expression von c-Jun Δ N die c-Fos-Promotor-regulierte Reportergentranskription in Pregnenolonsulfat-stimulierten HEK293-Zellen, die TRPM3-Kanäle exprimierten, signifikant reduzierte. Die Expression von c-Jun Δ N dämpfte auch die Hochregulation der c-Fos-Expression in HEK293-Zellen, die aktivierte TRPM3-Kanäle exprimierten (Abbildung 21C, 21D). Somit ist c-Jun notwendig, um die TRPM3-Stimulation mit verstärkter c-Fos-Promotoraktivität und c-Fos-Expression zu verbinden.

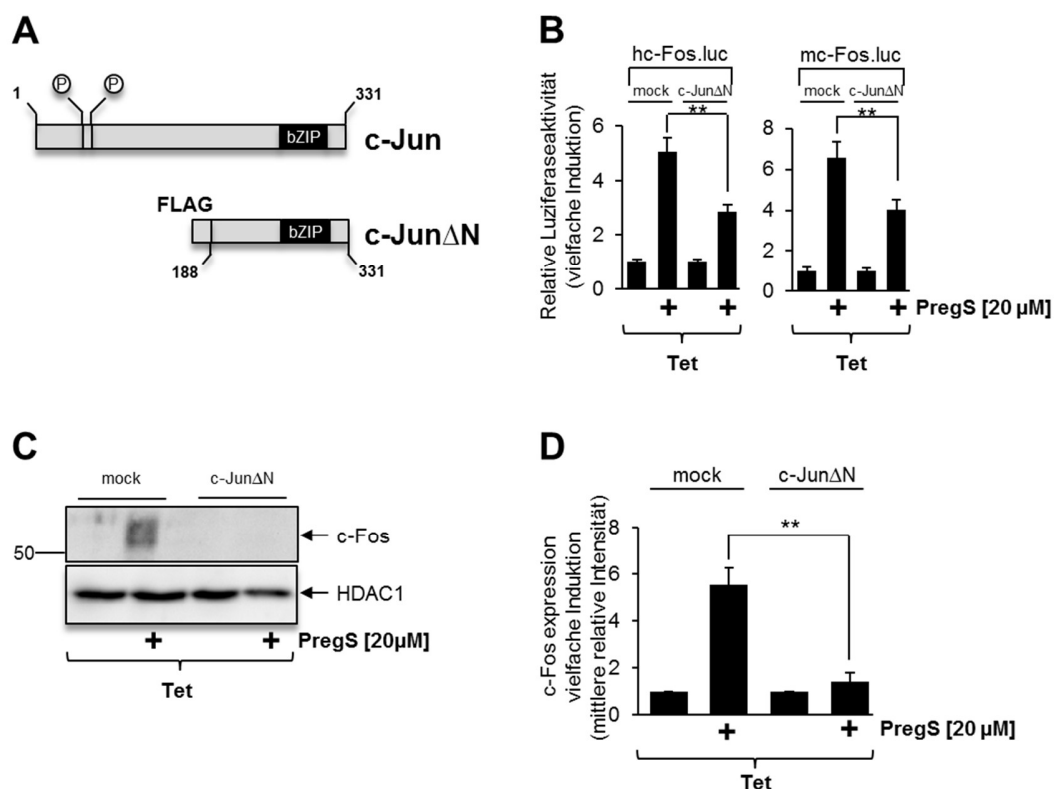


Abbildung 21 Der Transkriptionsfaktor c-Jun verbindet die TRPM3-Aktivierung mit einer erhöhten c-Fos-Promotoraktivität und c-Fos-Expression.

(A) Modulare Struktur von c-Jun und der dominant-negativen Form c-JunΔN. (B) HEK293-Zellen, die eine Tetracyclin-induzierbare TRPM3-Transkriptionseinheit enthielten, wurden mit einem Lentivirus infiziert, der das Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle des menschlichen (linke Balken) oder murinen (rechte Balken) c-Fos-Promotors kodierte. Zusätzlich wurden Zellen mit einem Lentivirus infiziert, der für die c-Jun-Mutante c-JunΔN kodierte. Als Kontrolle wurden Zellen mit lentiviralen Überständen infiziert, die mit dem lentiviralen Transfervektor pFUW (mock) präpariert wurden. Die Zellen wurden 24 h lang in Gegenwart von Tetracyclin (1 μg/ml) serumreduziert und dann 24 h mit PregS (20 μM) stimuliert. Zellextrakte wurden hergestellt und auf Luciferase-Aktivitäten analysiert. Die Luciferase-Aktivität wurde auf die Proteinkonzentration normiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwert \pm Standardabweichung von drei Experimenten, die in vierfacher Ausführung durchgeführt wurden (**, $P < 0,01$). (C) HEK293-Zellen, die eine Tetracyclin-induzierbare TRPM3-Transkriptionseinheit enthielten, wurden mit einem rekombinanten Lentivirus infiziert, der für c-JunΔN kodierte. Als Kontrolle wurden Zellen mit lentiviralen Stämmen infiziert, die mit dem lentiviralen Transfervektor pFUW (mock) präpariert wurden. Die Zellen wurden 24 h in Gegenwart von Tetracyclin (1 μg/ml) serumreduziert und dann mit PregS (20 μM) stimuliert. Kernextrakte wurden hergestellt und einer Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines gegen das c-Fos-Protein gerichteten Antikörpers unterzogen. Der gegen HDAC1 gerichtete Antikörper wurde als Ladungskontrolle verwendet. (D) Quantifizierung der c-Fos-Expression. Die Intensität des c-Fos-Signals wurde auf die Intensität der HDAC1-Kontrolle normiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten (**, $P < 0,01$).

3.2.7. Stimulation von TRPM3-Kanälen mit Pregnenolonsulfat erhöht das Transkriptionsaktivierungspotential von c-Fos

Die bisherigen Experimente analysierten die intrazellulären Signalmoleküle, die für die Hochregulation der c-Fos-Gentranskription nach Stimulation von TRPM3-Kanälen verantwortlich waren. Nun stellte sich die Frage, ob das Transkriptions-Aktivierungspotential von c-Fos auch unter diesen Bedingungen erhöht wird. Ich habe ein GAL4-c-Fos-Fusionsprotein als Werkzeug zur Untersuchung des Transkriptionsaktivierungspotentials von c-Fos in HEK293-Zellen exprimiert, die eine Tetrazyklin-regulierte TRPM3-Transkriptionseinheit enthielten (s. Abbildung 13A). Das Transkriptionsaktivierungspotential von c-Fos wurde in Pregnenolonsulfat-stimulierten HEK293-Zellen, die TRPM3, das GAL4-c-Fos-Fusionsprotein und das GAL4-responsive Reporter gen exprimierten, erhöht (Abbildung 22A). Als Kontrolle habe ich die Zellen entweder mit Forskolin oder mit TPA stimuliert. In diesen Experimenten wurden die Zellen nicht mit Tetrazyklin behandelt, so dass TRPM3 nicht exprimiert wurde. Die Abbildungen 22B und 22C zeigen, dass, während der Phorbol ester TPA das Transkriptionsaktivierungspotential von c-Fos verstärkte, die Forskolin-Stimulation die c-Fos-Aktivität nicht erhöhte.

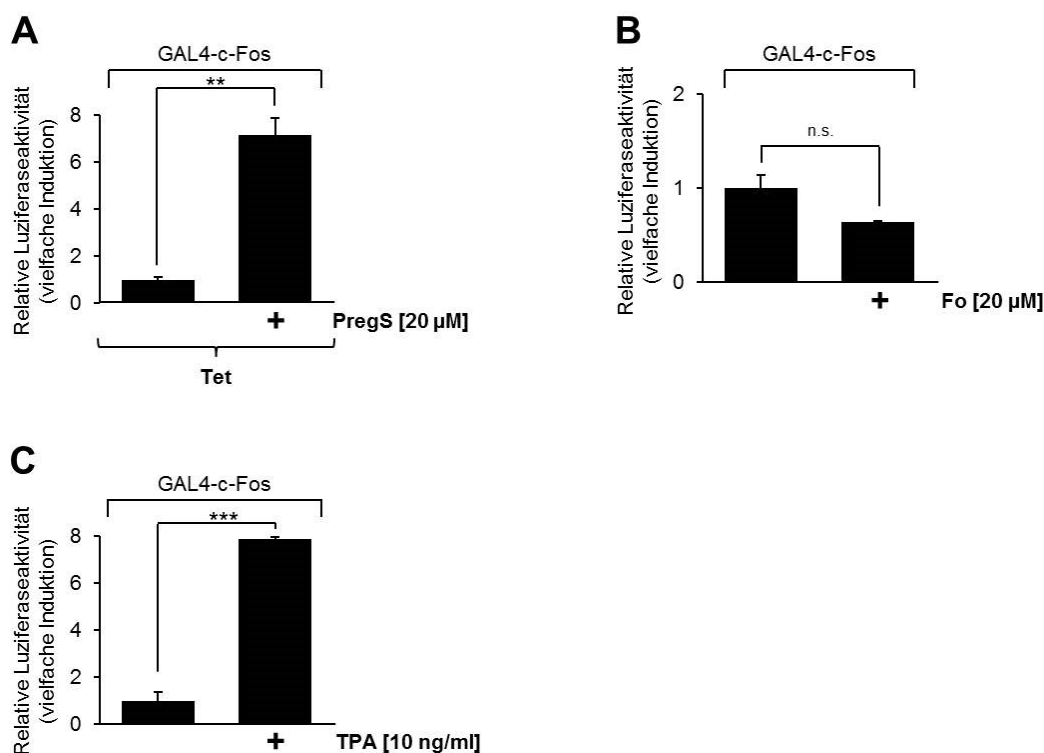


Abbildung 22 Die Stimulation von TRPM3-Kanälen reguliert das Transkriptionsaktivierungspotential von c-Fos herauf. (A, B, C) HEK293-Zellen, die eine Tetrazyklin-induzierbare TRPM3-Expressionseinheit enthielten, wurden doppelt mit einem Lentivirus infiziert, der das GAL4-responsive Luciferase-Reportergen enthielt und einem Lentivirus, der für GAL4-c-Fos kodiert (s. Abbildung 13 A und C). Die Zellen wurden 24 h lang in Gegenwart von Tetrazyklin (1 µg/ml) serumreduziert und anschließend 24 h entweder mit PregS (20 µM) (C), Forskolin (20 µM) (D) oder 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA) (10 ng/ml) (E) stimuliert. Zellextrakte wurden hergestellt und auf Luciferase-Aktivitäten analysiert. Die Luciferase-Aktivität wurde auf die Proteinkonzentration normiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwert +/- Standardabweichung von drei Experimenten, die vierfach durchgeführt wurden (**, $P < 0,01$; n.s., nicht signifikant)

3.3. Stimulation von TRPM3-Kanälen erhöht das Transkriptionsaktivierungspotential von Elk-1 unter Beteiligung von zytosolischem Ca^{2+} , der extrazellulär signalregulierten Proteinkinase (ERK) und Calcineurin

Vor kurzem wurde gezeigt, dass die Stimulation von TRPM3-Kanälen mit Pregnenolonsulfat das Transkriptionsaktivierungspotential von Elk-1 in TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen reguliert (Lesch et al., 2014). Wie ich bereits in Abschnitt 3.2.5. beschrieben habe, reduzierte die Expression einer dominant-negativen Mutante des Transkriptionsfaktors Elk-1 die vom c-Fos-

Promotor regulierte Reportergentranskription sowie die c-Fos-Expression in TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen. Dies zeigt, dass Elk-1 ein wichtiges Signalmolekül der Signalkaskade zwischen TRPM3-Kanälen und dem c-Fos-Gen darstellt. Es stellte sich nun die Frage, welche Signalkaskade bei der Verbindung von aktivierten TRPM3-Kanälen mit Elk-1 involviert ist.

3.3.1. Die Pregnenolonsulfat-induzierte Hochregulation des transkriptionalen Aktivierungspotentials von Elk-1 in TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen erfordert den Einstrom von Ca²⁺-Ionen

TRPM3-Kanäle sind Ca²⁺-durchlässige Kationenkanäle (Wagner et al., 2008; Majeed et al., 2011). Es wurde gezeigt, dass ein Einstrom von Ca²⁺ in die Zellen für die TRPM3-vermittelte Transkriptionsregulation durch die Transkriptionsfaktoren Egr-1 und AP-1 notwendig ist (Mayer et al., 2011; Lesch et al., 2015). Daher habe ich die Rolle der extrazellulären Ca²⁺-Ionen bei der Pregnenolonsulfat-induzierten Steigerung der Elk-1-Aktivität in HEK293-Zellen, die TRPM3-Kanäle exprimierten, untersucht. Als Sensor für die Elk-1-Aktivität wurde ein Fusionsprotein exprimiert, das aus einer GAL4-DNA-bindenden Domäne, die mit der Transkriptionsaktivierungsdomäne von Elk-1 fusioniert war, bestand (Abbildung 23A). Die DNA-Bindedomäne von Elk-1 ist am N-Terminus lokalisiert, während die Transkriptionsaktivierungsdomäne am C-Terminus lokalisiert ist. Eine regulatorische Domäne liegt innerhalb dieser transkriptionellen Aktivierungsdomäne. Die Phosphorylierungsstellen S383 und S389 befinden sich ebenfalls innerhalb dieser Domäne. Abbildung 23B (linke Balken) zeigt, dass das transkriptionale Aktivierungspotential von Elk-1 in Pregnenolonsulfat-stimulierten, TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen signifikant erhöht wurde. Die Hochregulation des transkriptionalen Aktivierungspotentials von Elk-1 wurde dafür vollständig geblockt, nachdem die Zellen in Ca²⁺-freiem Medium kultiviert wurden (Abbildung 23B, rechte Balken). Diese Ergebnisse zeigen, dass ein Einstrom von Ca²⁺-Ionen in die Zellen wesentlich ist, um die TRPM3-Stimulation mit einer erhöhten Elk-1-Aktivität zu verbinden.

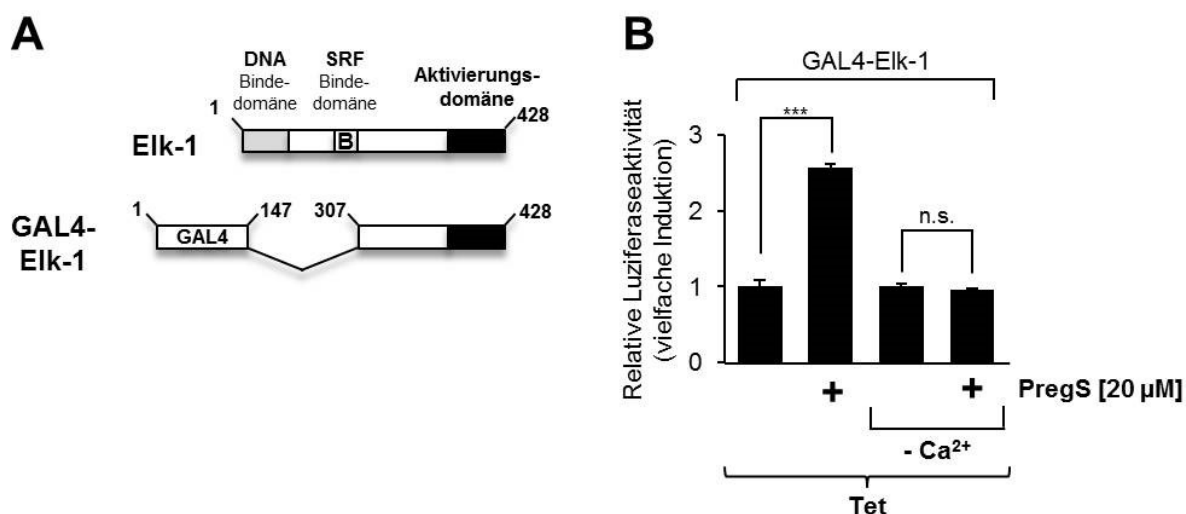


Abbildung 23 Die Hochregulation des Transkriptionsaktivierungspotentials von Elk-1 in Pregnenolonsulfat-stimulierten HEK293-Zellen, die TRPM3 exprimieren, erfordert einen Einstrom von Ca^{2+} -Ionen. (A) Schematische Darstellung der modularen Struktur von Elk-1 und GAL4-Elk-1. (B) Schematische Darstellung des in Chromatin eingebetteten GAL4-responsiven Reportergens UAS⁵Sp¹².luc. (C) HEK293-Zellen, die eine Tetracyclin-regulierte Transkriptionseinheit zur Expression von TRPM3 enthielten, wurden mit einem Lentivirus infiziert, der ein GAL4-responsives Luciferase-Reportergen enthielt. Zusätzlich wurden Zellen mit einem Lentivirus infiziert, der GAL4-Elk-1 kodiert. Die Zellen wurden 24 h lang in DMEM oder in Ca^{2+} -freiem Medium serumreduziert, in Gegenwart von Tetrazyklin, um die TRPM3-Expression zu induzieren. Die Zellen wurden 24 h lang mit PregS (20 μM) stimuliert. Zellextrakte wurden hergestellt und auf Luciferase-Aktivitäten analysiert. Die Luciferase-Aktivität wurde auf die Proteinkonzentration normiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten, die vierfach durchgeführt wurden (***, $P < 0,001$, n.s., nicht signifikant).

3.3.2. Ein Anstieg der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration ist notwendig, um die Expression von Elk-1 nach Stimulation von TRPM3 zu aktivieren

Es wurde diskutiert, ob eine Erhöhung von zytoplasmatischem und/oder nukleärem Ca^{2+} für eine Transkriptionsfaktor-Aktivierung notwendig ist. Für die Stimulation von NFAT4 (Kar and Parekh, 2015) ist ein Anstieg der nukleären Ca^{2+} -Konzentration essentiell, während ein Anstieg der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration für die Transkriptionsinduktion in glukose-stimulierten INS-1-Zellen essentiell ist (Müller et al., 2012). Um die Bedeutung von zytoplasmatischem oder nukleärem (Ca^{2+}) bei der Pregnenolonsulfat-regulierten Aktivierung von Elk-1 zu beurteilen, exprimierte ich das Ca^{2+} -bindende Protein Parvalbumin (PV) entweder im Zytosol oder im Zellkern als Fusionsprotein mit mCherry. Die modulare Struktur der PVmCherry-Fusionsproteine ist in Abbildung 24A dargestellt. Als Kontrolle wurden die Zellen mit einem mCherry-kodierenden Lentivirus infiziert. Abbildung 24B zeigt, dass das NES-markierte PVmCherry-Fusionsprotein im

Zytosol und das NLS-markierte PV-mCherry-Fusionsprotein im Zellkern exprimiert wurde, während mCherry im Zytosol und im Zellkern gefunden wurde. Der Anstieg des zytoplasmatischen (Ca^{2+}) in TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen wurde durch Expression des zytosolischen Ca^{2+} -Puffers NES-PVmCherry gepuffert. Dadurch wurde die Pregnenolonsulfat-induzierte Hochregulation der Elk-1-Aktivität signifikant reduziert. Im Gegensatz dazu hatte die Expression des nukleären Ca^{2+} -Puffers NLS-PVmCherry das Transkriptionsaktivierungspotential von Elk-1 nicht signifikant reduziert (Abbildung 24C). Daher kann man sagen, dass ein Anstieg der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration für die Stimulierung von Elk-1 in Pregnenolonsulfat-stimulierten TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen essentiell ist

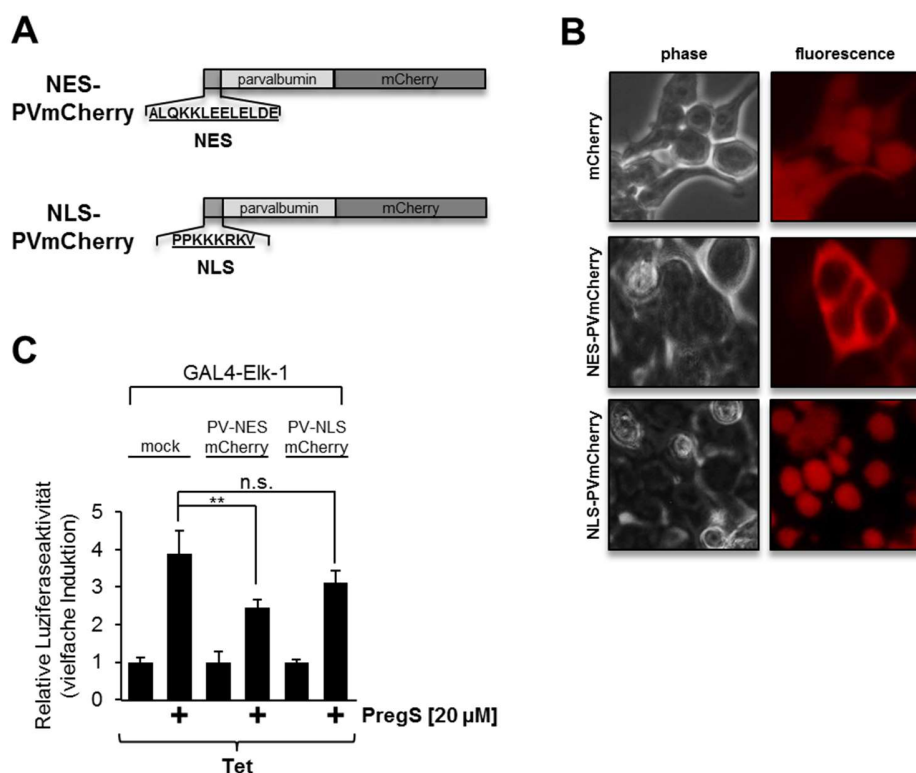


Abbildung 24 Die TRPM3-vermittelte Hochregulierung des Transkriptionsaktivierungspotentials von Elk-1 erfordert einen Anstieg des zytoplasmatischen Ca^{2+} . (A) Schematische Darstellung der modularen Struktur der Ca^{2+} -pufferenden Proteine NES-PVmCherry und NLS-PVmCherry, die entweder ein nukleäres Exportsignal (NES) zur direkten Expression im Zytosol oder ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) zur direkten Expression im Kern enthalten. (B) Phasenkontrast- und Fluoreszenzbilder von HEK293-Zellen, die eine Tetrazyklin-induzierbare TRPM3-Expressionseinheit enthalten. Die Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die mCherry (oben), NES-PVmCherry (Mitte) oder NLS-PVmCherry (unten) kodieren. (C) HEK293-Zellen, die eine Tetrazyklin-induzierbare TRPM3-Transkriptionseinheit enthielten, wurden mit einem Lentivirus, der ein GAL4-Elk-1-Fusionsprotein kodiert, und einem Lentivirus, der das GAL4-reaktive Reporterergen UAS⁵Sp¹².luc enthält, infiziert. Zusätzlich wurden Zellen mit einem Lentivirus infiziert, der mCherry, NES-PVmCherry oder NLS-PVmCherry kodiert. Die Zellen wurden 24 h lang in

Gegenwart von Tetrazyklin (1 µg/ml) serumreduziert und dann 24 h mit PregS (20 µM) stimuliert. Zellextrakte wurden hergestellt und auf Luziferase-Aktivitäten analysiert. Die Luziferase-Aktivität wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwert ± Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten, die in vierfacher Ausführung durchgeführt wurden (**, P < 0,01; n.s., nicht signifikant).

3.3.3. Hemmung des ERK-Signalweges reduziert die Pregnenolonsulfat-induzierte Aktivierung von Elk-1 in HEK293-Zellen, die TRPM3 exprimieren

Die Aktivierung der „extrazellulär Signal-regulierten Proteinkinase“ (ERK1/2) ist ein Schlüsselereignis bei der Kontrolle der Egr-1-Expression nach TRPM3-Stimulation (Mayer et al., 2011). ERK1/2 wird in vielen Zelltypen als Folge erhöhter intrazellulärer Ca²⁺-Konzentrationen aktiviert. Ich habe daher die Fragestellung bearbeitet, ob ERK1/2 für die Hochregulation des transkriptionalen Aktivierungspotentials von Elk-1 nach Stimulation von TRPM3-Kanälen mit Pregnenolonsulfat erforderlich ist. Ich verwendete dabei genetische und pharmakologische Hilfsmittel, um den ERK-Signalweg an drei verschiedenen Punkten zu stören und so die Wirkung auf die Aktivität von Elk-1 zu untersuchen.

HEK293-Zellen, die eine Tetracyclin-induzierbare Expressionseinheit von TRPM3 enthielten, wurden mit einem für GAL4-Elk-1 kodierenden Lentivirus infiziert. Zusätzlich wurden die Zellen mit einem Lentivirus infiziert, um das GAL4-responsive Reportergen in das Genom zu integrieren. Anschließend folgte eine Vorinkubation mit PD98059, einer Verbindung, die die Phosphorylierung der MAP-Kinase-Kinase durch Raf hemmt und somit den ERK-Signalweg blockiert. Abbildung 25A zeigt, dass die Inkubation der Zellen mit PD98059 die Hochregulation des transkriptionalen Aktivierungspotentials von Elk-1 nach der Stimulation der TRPM3-exprimierenden Zellen mit Pregnenolonsulfat effizient abschwächte.

Außerdem reduzierte die Expression von ERK1/2-spezifischen short hairpin (sh) RNAs die Konzentration von ERK1/2. Die Versuche zeigten, dass die Hochregulation des transkriptionalen Aktivierungspotentials von Elk-1 bei Pregnenolonsulfat-stimulierten TRPM3-HEK293-Zellen signifikant reduziert wurde (Abbildung 25B).

Zuletzt habe ich in dieser Versuchsreihe MAP-Kinase-Phosphatase-1 (MKP-1), das Enzym, das ERK im Zellkern inaktiviert (Shapiro and Ahn, 1998), in den Zellen überexprimiert. Abbildung 25C zeigt, dass die Hochregulation des Transkriptionsaktivierungspotentials von Elk-1 in Pregnenolonsulfat-stimulierten, TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen, die mit einem MKP-1-kodierenden Lentivirus infiziert worden waren, abgeschwächt wurde. Im Gegensatz dazu hatte

die Expression der Proteinphosphatase 2C (PP2C) keinen Einfluss auf die Transkriptionsaktivität von Elk-1. Diese Daten zeigen, dass eine aktive, nukleäre ERK1/2 notwendig ist innerhalb der Signalkaskade, die TRPM3 mit Elk-1-Aktivität verbindet. Zusammen zeigen die aus pharmakologischen und genetischen Experimenten gewonnenen Daten, dass ERK1/2 als Signaltransduktor zwischen aktivierten TRPM3-Kanälen und der Stimulierung des Transkriptionsaktivierungspotentials von Elk-1 fungiert.

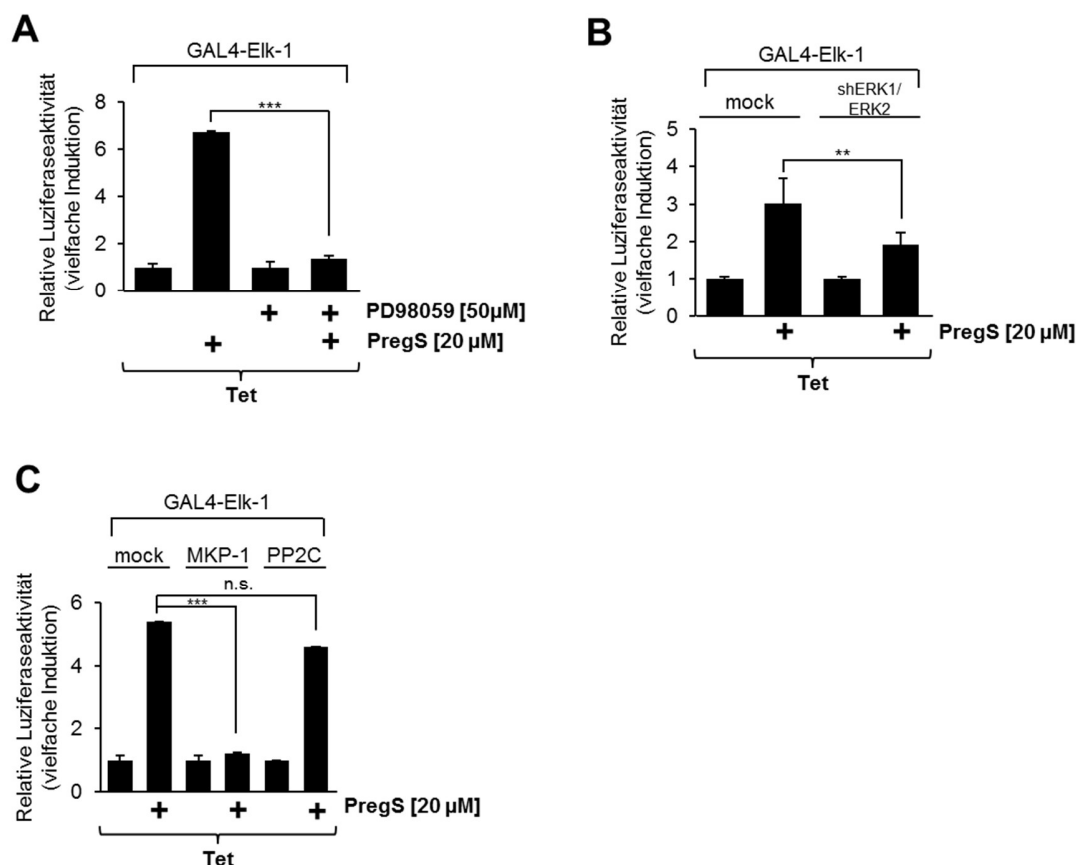


Abbildung 25 Die Abschwächung des ERK-Signalwegs stört die Pregnenolonsulfat-induzierte Hochregulation des Transkriptionsaktivierungspotentials von Elk-1 in TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen.

HEK293-Zellen, die eine Tetrazyklin-induzierbare TRPM3-Transkriptionseinheit enthielten, wurden in allen Experimenten mit einem rekombinanten Lentivirus infiziert, der ein GAL4-responsives Reporterogen (UAS⁵Sp¹².luc) enthielt. Zusätzlich wurden Zellen mit einem Lentivirus infiziert, der GAL4-Elk-1 kodiert. Darüber hinaus wurden die Zellen 24 h lang in Gegenwart von Tetrazyklin (1 µg/ml) serumreduziert. (A) Die Zellen wurden 3 h mit PD98059 (50 µM) vorinkubiert und dann 24 h in Gegenwart von PD98059 mit PregS (20 µM) stimuliert. (B) Die Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die ERK1- und ERK2-spezifische shRNAs kodieren. Als Kontrolle wurden Zellen mit einem Lentivirus infiziert, der mit dem lentiviralen Transfervektor pLL3.7 (mock) erzeugt wurde. Die Zellen wurden 24 h lang mit PregS (20µM) stimuliert. (C) Die Zellen wurden mit einem Lentivirus infiziert, der entweder MKP-1 oder die Proteinphosphatase 2C (PP2C) kodiert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit einem Lentivirus infiziert, der mit dem lentiviralen Transferplasmid pFUW (mock) erzeugt wurde. Die Zellen wurden 24 h lang mit PregS (20µM) stimuliert. Zellextrakte wurden hergestellt und auf Luziferase-Aktivitäten analysiert. Die Luziferase-Aktivität wurde auf die Proteinkonzentration normiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwert +/-

Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten, die vierfach durchgeführt wurden (**, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; n.s., nicht signifikant).

3.3.4. Calcineurin reduziert die Pregnenolonsulfat-induzierte Hochregulation des transkriptionalen Aktivierungspotentials von Elk-1 in HEK293-Zellen, die TRPM3-Kanäle exprimieren

Ein Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration aktiviert Calcineurin, eine Serin/Threonin-Phosphatase, die durch Ca^{2+} und Calmodulin reguliert wird (Rusnak and Mertz, 2000). Ein wichtiges Substrat von Calcineurin ist Elk-1 (Sugimoto et al., 1997; Tian and Karin, 1999; Sieber et al., 2007). Ich habe daher die Rolle von Calcineurin in der Signalkaskade, die aktivierte TRPM3-Kanäle mit Elk-1 verbindet, untersucht. Dabei wurde eine konstitutiv aktive Calcineurin-A-Mutante (Δ CnA) exprimiert, der die Calmodulin-Bindestelle und die C-terminale autoinhibitorische Domäne fehlten und die keine Ca^{2+} -Ionen zur Aktivierung benötigte (Abbildung 26A). Die Zellen wurden mit Tetrazyklin behandelt, um die TRPM3-Expression zu induzieren und mit Pregnenolonsulfat stimuliert. Abbildung 26B zeigt, dass die Expression von Δ CnA die Hochregulation des Transkriptionsaktivierungspotentials von Elk-1 in HEK293-Zellen, die stimulierte TRPM3-Kanäle exprimieren, signifikant reduziert hat.

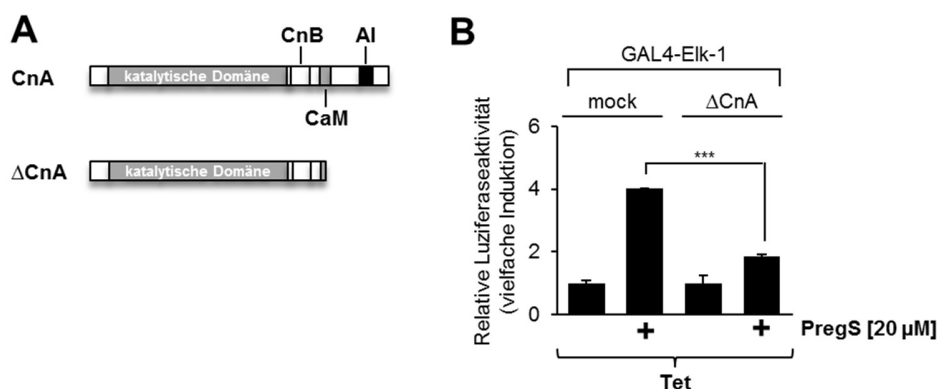


Abbildung 26 Calcineurin reguliert das Transkriptionsaktivierungspotential von Elk-1 nach Stimulation von TRPM3-Kanälen mit Pregnenolonsulfat. (A) Schematische Darstellung von Calcineurin A und Δ CnA, einer konstitutiv aktiven Mutante von Calcineurin A. Die Calcineurin B (CnB)- und Calmodulin (CaM)-Bindestellen sind ebenso dargestellt wie die am C-Terminus gelegene autoinhibitorische Domäne (AI). (B) HEK293-Zellen, die eine Tetrazyklin-induzierbare TRPM3-Transkriptionseinheit enthielten, wurden mit Lentiviren, die GAL4-Elk-1, sowie das GAL4-reaktive Reporter-gen UAS⁵Sp1².luc kodieren, infiziert. Darüber hinaus wurden die Zellen entweder mit einem Kontroll-Lentivirus (mock) oder mit einem rekombinanten Lentivirus, der für Δ CnA kodiert, infiziert. Die Zellen wurden 24 h lang in Gegenwart von Tetrazyklin (1 μ g/ml) serumreduziert und dann 24 h mit PregS (20 μ M) stimuliert. Zellextrakte wurden hergestellt und auf Luciferase-Aktivität analysiert. Diese wurde auf die Proteinkonzentration normiert. Die gezeigten

Daten sind Mittelwert +/- Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten, die in vierfacher Ausführung durchgeführt wurden (***, $P < 0,001$).

3.4. Stimulation des TRPM3-Kanals aktiviert die Gentranskription von Interleukin-8 unter Beteiligung von AP-1/c-Jun und der Proteinkinase ERK

Die Stimulation von HEK293-Zellen, die TRPM3-Kanäle exprimieren, durch Pregnenolonsulfat erhöht die Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 (Müller et al., 2011; Lesch et al., 2014, 2015). Pharmakologische und genetische Experimente zeigten, dass die TRPM3-Expression notwendig ist, um Pregnenolonsulfat-Stimulation mit einer Hochregulation der AP-1-vermittelten Gentranskription notwendig ist (Lesch et al., 2014, 2015). Nach der Aktivierung bindet AP-1 an die regulatorische Region von nachgeschalteten Genen und stimuliert die Transkription dieser Gene. Bei der Suche nach AP-1-responsiven nachgeschalteten Genen analysierte ich das IL-8-Gen, das für das Chemokin IL-8 kodiert. IL-8 ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, das als potenter Chemoattraktor und Aktivator von Immunzellen, einschließlich Neutrophilen und T-Zellen, wirkt. So wurde die Biosynthese und Sekretion von IL-8 mit verschiedenen entzündlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Die Expression und Funktion von IL-8 ist nicht auf Immunzellen beschränkt, und es wurde gezeigt, dass IL-8 in vielen Nicht-Immunzellen synthetisiert und sezerniert wird. Es ist von besonderem Interesse, dass IL-8 in Tumorzellen exprimiert und sezerniert wird, wobei es Tumorwachstum, Invasion, Zellmigration, Metastasierung und Angiogenese reguliert (Scheingart et al., 2001; Li et al., 2003; Brat et al., 2005; Waugh and Wilson, 2008; Ning et al., 2011; Wu et al., 2012; Liu et al., 2016). Angesichts der Tatsache, dass das IL-8-Gen ein Konvergenzpunkt vieler Signalwege ist, entschied ich mich, die Expression von IL-8 in Pregnenolonsulfat-behandelten TRPM3-exprimierenden HEK293T-Zellen zu untersuchen.

3.4.1. Die Stimulation von TRPM3-Kanälen mit Pregnenolonsulfat aktiviert den Interleukin-8-Promotor

Abbildung 27A zeigt die schematische Darstellung eines Provirus, das ein IL-8-Promotor/Luziferase-Reporter gen enthält. Abbildung 16B (rechte Balken) zeigt, dass die Stimulation von TRPM3-Kanälen die Transkription eines ins Chromatin eingebetteten Reportergens unter der Kontrolle des IL-8-Promotors signifikant erhöht hat. Die Transkription des IL-8-Gens wurde in

Zellen, die nicht mit Tetracyclin behandelt wurden und daher keine TRPM3-Kanäle exprimierten, nicht hochreguliert (Abbildung 27B, linke Balken).

Es wurde gezeigt, dass Mefenaminsäure, ein N-Phenyl-substituiertes Anthranilsäurederivat, den TRPM3-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom in HEK293-Zellen, die TRPM3 exprimieren (Klose et al., 2011; Straub et al., 2013a), inhibierten und die TRPM3-vermittelte Gentranskription blockierten (Lesch et al., 2014). Ich habe untersucht, ob Mefenaminsäure die TRPM3-induzierte Hochregulation der IL-8-Promotoraktivität blockiert. Die Ergebnisse zeigen, dass Mefenaminsäure die Transkription eines IL-8-Promotors/ Luziferase-Reportergens nach Stimulation von TRPM3-Kanälen mit Pregnenolonsulfat hemmte (Abbildung 27C). Darüber hinaus wurde die Pregnenolonsulfat-stimulierte IL-8-Promotor/Luziferase-Reportergen-Transkription in Zellen abgeschwächt, die eine short hairpin (sh)-RNA, die gegen TRPM3 gerichtet war, exprimierten (Abbildung 27D). Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass TRPM3-Kanäle für die Pregnenolonsulfat-induzierte Aktivierung der IL-8-Gentranskription erforderlich sind.

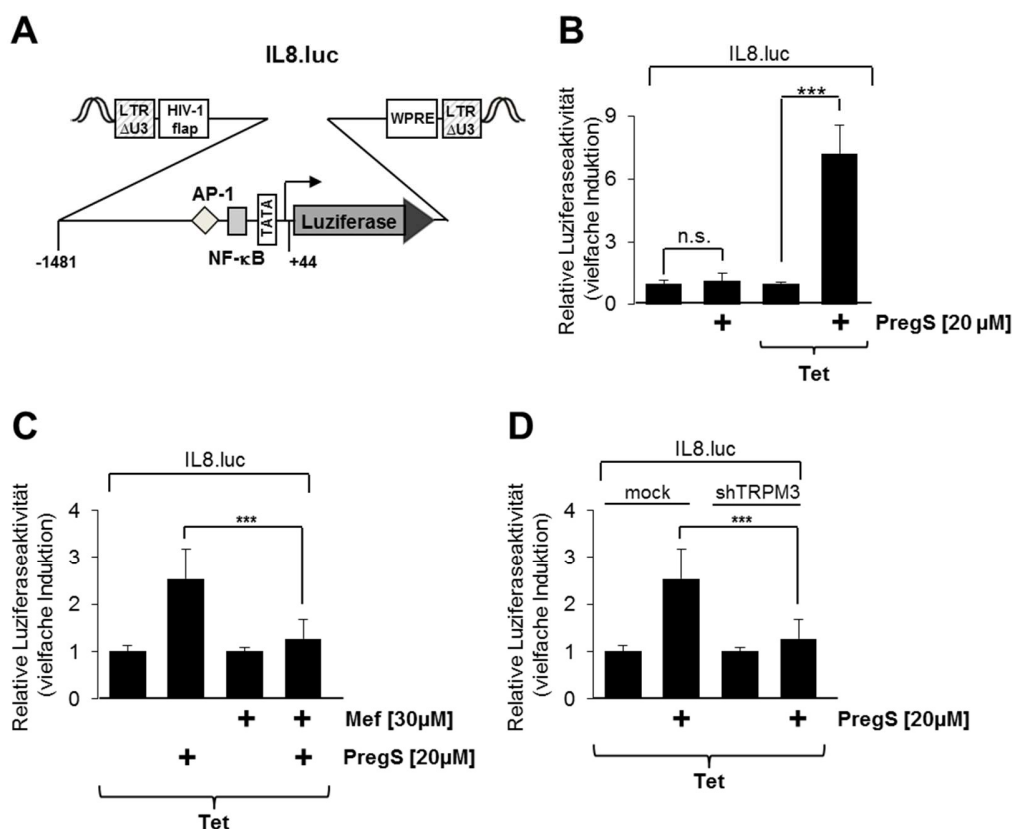


Abbildung 27 Das IL-8-Gen fungiert als ein nachgeschaltetes Zielgen des via TRPM3 aktivierten Transkriptionsfaktors AP-1. (A) Schematische Darstellung des Provirus, der ein IL-8-Promotor/Luziferase-Reportergen enthält. Der Promotor umfasst IL-8-Gensequenzen von -1481 bis +44 und wurde upstream des offenen Leserahmens der Luziferase eingefügt. Die Positionen der AP-1- und NF- κ B-Bindestellen innerhalb des IL-8-Promotors und des WPRE- und HIV-

flap-Elements innerhalb des Provirus sind dargestellt. (B, C, D) HEK293-Zellen, die eine Tetrazyklin-induzierbare TRPM3-Expressionseinheit enthielten, wurden mit einem rekombinanten Lentivirus infiziert, der das IL-8-Promotor/Luziferase-Reportergen (IL-8.luc) kodierte (B, C) oder zusätzlich mit einem Lentivirus, der eine short hairpin-RNA kodiert, die gegen TRPM3 gerichtet ist, bzw. mit einem Kontroll-Lentivirus (mock) (D). Die Zellen wurden geerntet, lysiert und die Extrakte verwendet, um die Luziferase-Aktivitäten zu messen, die auf die Proteinkonzentrationen normiert wurden. Drei unabhängige Experimente, die in vierfacher Ausführung durchgeführt wurden; die gezeigten Daten sind Mittelwerte +/- Standardabweichung (***, $P < 0.001$).

3.4.2. Die AP-1-Bindestelle des IL-8-Promotors stellt ein Pregnenolonsulfat-responsives Element dar

Abbildung 28A zeigt die Struktur der Proviren, die verkürzte und mutierte Versionen von IL-8-Promotor/Luziferase-Reportergenen enthalten. Es stellte sich die Frage, ob ein verkürzter IL-8-Promotor, der 133 Nukleotide stromaufwärts von der Startstelle der Transkription umfasst, ausreicht, um die Reportergen-Transkription in HEK293-Zellen, die aktivierte TRPM3-Kanäle exprimieren, zu steigern. Abbildung 28B zeigt, dass die Transkription des durch einen verkürzten IL-8-Promotor kontrollierten Reportergens nach Aktivierung von TRPM3-Kanälen signifikant durch Pregnenolonsulfat induziert wurde. Der proximale Promotor des IL-8-Gens enthält Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B. Ich analysierte daher IL-8-Promotor-Reportergene, die Mutationen der AP-1 oder der NF- κ B-Stelle enthielten (Abbildung 28A). Die in Abbildung 28C dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die AP-1-Stelle wesentlich ist, um die Pregnenolonsulfat-vermittelte TRPM3-Stimulation mit einer verstärkten Transkription eines integrierten IL-8-Promotor-kontrollierten Reportergens zu verbinden. Die Mutationsanalyse des IL-8-Promotors identifizierte somit die AP-1-Bindestelle als Pregnenolonsulfat-responsives Element. Im Gegensatz dazu hatte die Mutation der NF- κ B-Bindestelle keine Wirkung auf die IL-8-Promotor-regulierte Gentranskription in Zellen, die aktivierte TRPM3-Kanäle exprimierten (Abbildung 28C).

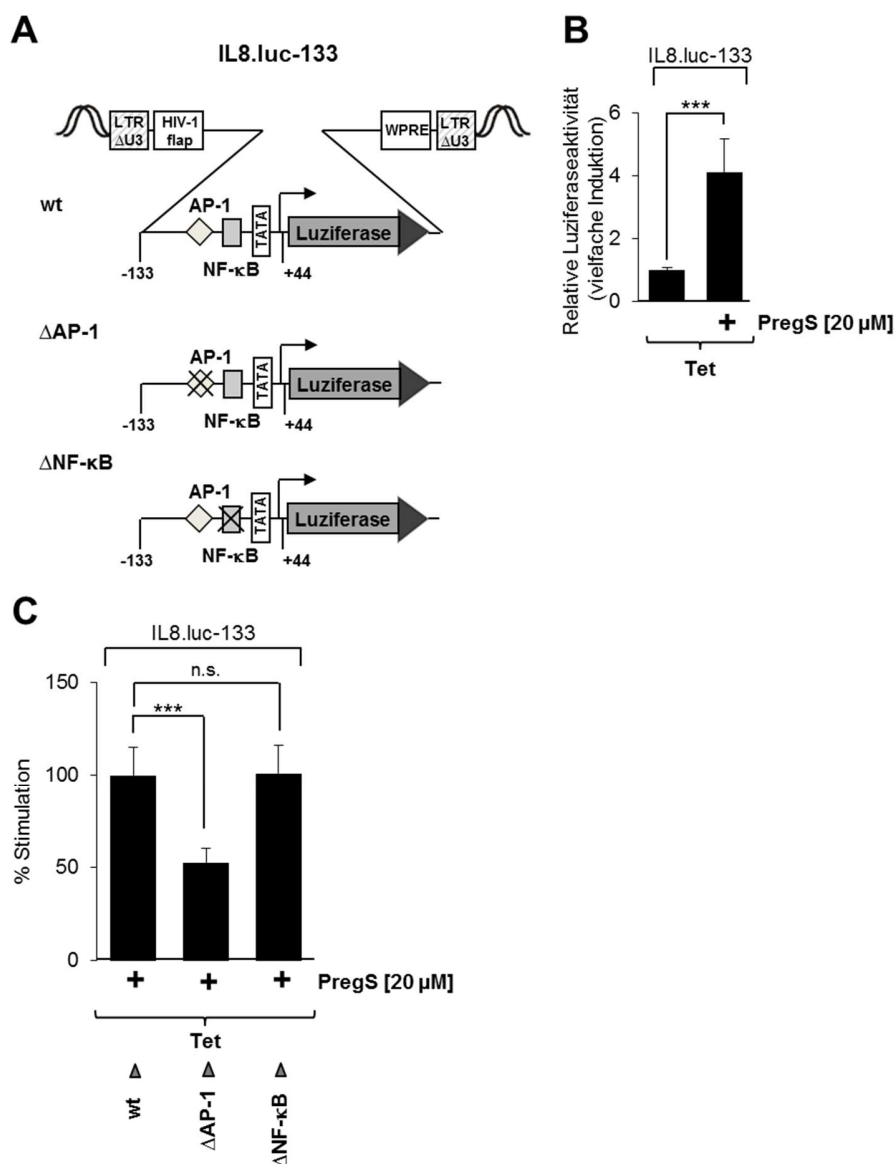


Abbildung 28 Identifizierung der AP-1-Bindestelle innerhalb der regulatorischen Region des IL-8-Gens als Pregnenolonsulfat -responsives Element. (A) Schematische Darstellung der Proviren, die verkürzte und mutierte IL-8-Promotor/Luziferase-Reportergene enthalten. Der Promotor umfasst IL-8-Gensequenzen von -133 bis +44. Die Stellen der AP-1- und NF- κ B-Bindestellen und die Inaktivierung jeder Stelle innerhalb des IL-8-Promotors sind dargestellt. (B) HEK293-Zellen, die eine Tetrazyklin-induzierbare TRPM3-Expressionseinheit exprimieren, mit IL-8-Promotorsequenzen von -133 bis +44, wurden mit einem der Lentiviren infiziert, die die verkürzten (B) oder verkürzten und mutierten (C) IL-8 Promotor-kontrollierten Reportergene enthielten, serumreduziert, mit Tetrazyklin behandelt und mit Pregnenolonsulfat (PregS, 20 μ M) stimuliert. Luziferase-Aktivitäten und Proteinkonzentrationen der Extrakte wurden gemessen. Drei unabhängige Experimente, die in vierfacher Ausführung durchgeführt wurden, und die angegebenen Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (***, $P < 0.001$, n.s. nicht signifikant).

3.4.3. Die Transkriptionsfaktoren c-Jun und ATF2 sind notwendig, um die IL-8-Promotoraktivität nach TRPM3-Stimulation zu erhöhen

AP-1 ist ein dimerer Transkriptionsfaktor, der aus bZIP-Proteinen der Jun-, Fos- und ATF-Familien von Transkriptionsfaktoren besteht. Kürzlich wurde gezeigt, dass c-Jun und ATF2 für die Aktivierung von AP-1 über TRPM3 erforderlich sind (Lesch et al., 2015a). Es stellte sich die Frage, ob c-Jun und ATF2 auch an der Stimulation des IL-8-Promotors in TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen, die mit Pregnenolonsulfat stimuliert worden waren, beteiligt sind. Um die Rolle von c-Jun und ATF2 bei der Regulation der TRPM3-Kanal-induzierten IL-8-Genexpression zu analysieren, exprimierten wir dominant-negative Mutanten von c-Jun oder ATF2 (Abbildung 29A). Den dominant-negativen Mutanten beider Transkriptionsfaktoren, c-Jun Δ N und ATF2 Δ N genannt, fehlten die Transkriptionsaktivierungsdomänen, die bZIP-Domänen, die für die DNA-Bindung und Dimerisierung notwendig sind, waren jedoch noch vorhanden. Beide Mutanten wurden in den Zellen über lentiviralen Gentransfer exprimiert (Abbildung 29B). Anschließend wurde die IL-8-Promotoraktivität in TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen entweder in Gegenwart oder in Abwesenheit der dominant-negativen Mutanten gemessen. Abbildung 29C und D zeigen, dass die Expression sowohl von c-Jun Δ N als auch von ATF2 Δ N die IL-8-Promotor-regulierte Transkription in TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen, die mit Pregnenolonsulfat stimuliert worden waren, abschwächte. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Stimulation von TRPM3-Kanälen den IL-8-Promotor aktiviert, an dem c-Jun und ATF2 oder Dimerisierungspartner dieser beiden Proteine beteiligt sind. Als nächstes exprimierten wir c-Jun- oder ATF2-spezifische short hairpin (sh)-RNAs in TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen mit dem Ziel, eine Beteiligung von c-Jun und ATF2 in der Signalkaskade, die TRPM3-Kanäle mit dem IL-8-Gen verbindet, direkt zu beweisen. Die biologischen Aktivitäten dieser shRNAs wurden in früheren Publikationen dokumentiert (Lesch et al., 2015; Keim et al., 2012; (Freund et al., 2004). Das Herabsetzen der Genexpression von c-Jun oder ATF2 reduzierte signifikant die IL-8-Promotoraktivität in HEK293-Zellen, die mit Pregnenolonsulfat stimulierte TRPM3-Kanäle exprimieren (Abbildungen 29E und F). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass c-Jun und ATF2 notwendig sind, um die IL-8-Promotoraktivität nach TRPM3-Stimulation zu erhöhen.

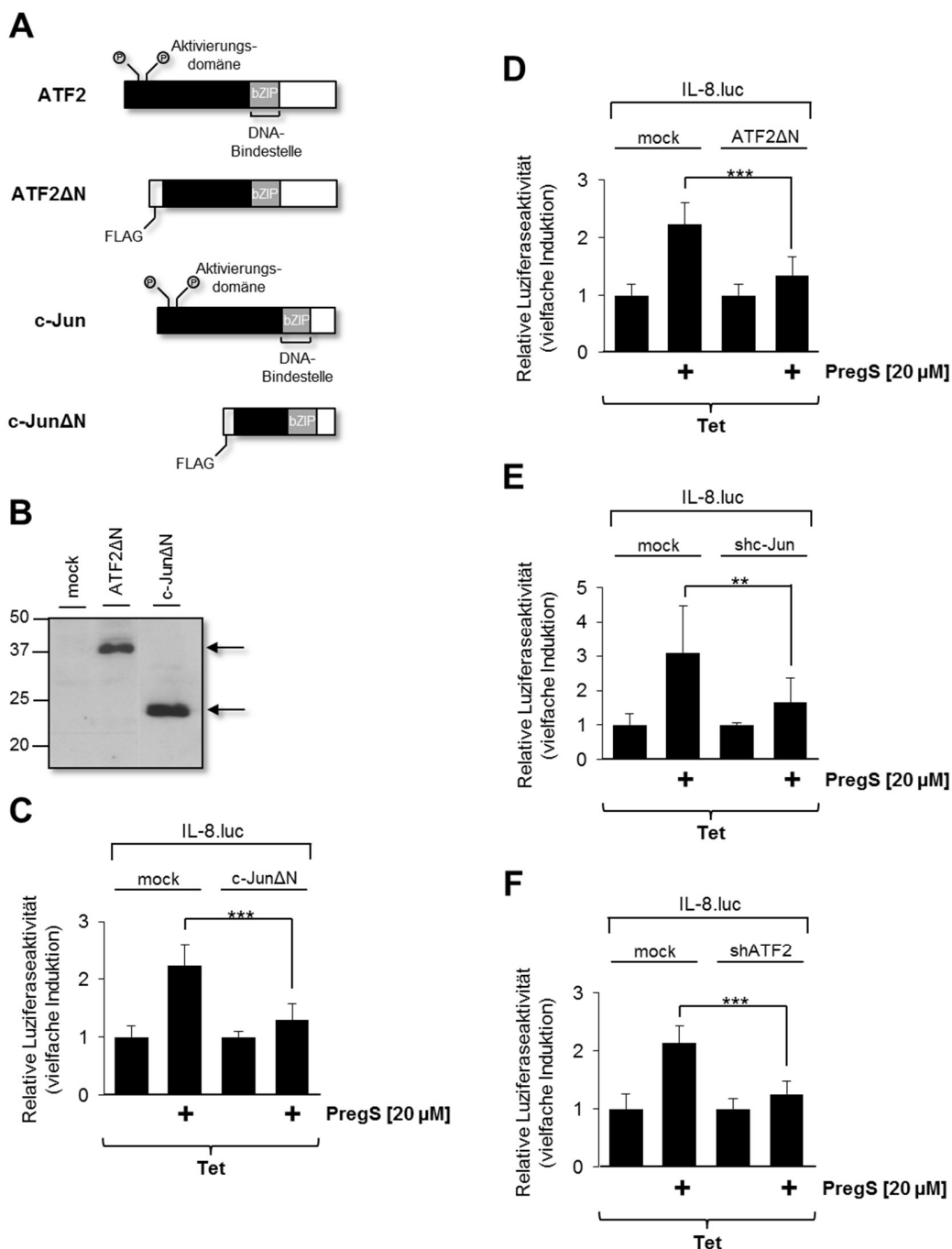


Abbildung 29 c-Jun und ATF2 verbinden die TRPM3-Aktivierung mit der IL-8-Genaktivierung. (A) Modulare Struktur von c-Jun und ATF2 und ihrer dominant-negativen Mutanten c-JunΔN und ATF2ΔN. (B) Expression von c-JunΔN und ATF2ΔN in HEK293-Zellen, die eine Tetrazyklin-induzierbare TRPM3-Expressionseinheit enthielten. Die Zellen wurden mit rekombinanten Lentiviren infiziert, die entweder cJunΔN oder ATF2ΔN exprimierten. Die Zellen wurden mit einem Kontroll-Lentivirus infiziert, der mit dem pFUW-Vektor erzeugt wurde (mock). Die Western-Blot-Analyse wurde mit einem Antikörper durchgeführt, der gegen das FLAG-Epitop gerichtet war. (C, D) HEK293-Zellen, die eine Tetrazyklin-induzierbare TRPM3-Expressionseinheit enthielten, wurden mit einem Lentivirus infiziert, der für das IL-8/Luziferase-Reportergen (IL-8.luc) kodierte. Die Zellen wurden auch mit einem Lentivirus infiziert, der entweder

c-Jun Δ N (C) oder ATF2 Δ N (D) kodierte, sowie mit einem Lentivirus, der mit dem lentiviralen Transfervektor pFUW als Kontrolle erzeugt wurde (mock). (E, F) TRPM3-exprimierende HEK293-Zellen wurden außerdem mit einem Lentivirus infiziert, der ein IL-8 Promotor-kontrolliertes Reportergen (IL-8.luc) enthielt, sowie mit einem Lentivirus, der entweder eine c-Jun (E) oder eine ATF2-spezifische (F) shRNA kodierte bzw. mit dem Vektor pLL3.7 als Kontrolle erzeugt wurde (mock). Sie wurden anschließend in einem Tetrazyklin enthaltenden Medium serumreduziert und für 24 h mit PregS (20 μ M) stimuliert. Drei unabhängige Experimente, in vierfacher Ausführung durchgeführt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte +/- Standardabweichung (**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

3.4.4. TCFs sind an einer erhöhten IL-8-Promotoraktivität via TRPM3 beteiligt

Ternäre Komplexfaktoren (TCFs) binden zusammen mit einem Dimer des Serum-Response-Faktors an das Serum-Response-Element, das innerhalb der regulatorischen Region des c-Fos-Gens zu finden ist. Der bZIP-Transkriptionsfaktor c-Fos dimerisiert mit c-Jun und bildet als c-Fos/c-Jun-Dimer einen funktionalen AP-1-Transkriptionsfaktorkomplex. Zuvor konnte ich zeigen, dass die Expression einer dominant negativen Mutante des TCFs Elk-1 die TRPM3-induzierte Biosynthese von c-Fos und die TRPM3-induzierte Stimulation von AP-1 blockierte (Abschnitt 3.2.5). Eine weitere Fragestellung meiner Arbeit war daher, welche Rolle c-Fos innerhalb der TRPM3-induzierten Signalkaskade, an deren Ende das IL-8-Gen steht, spielt. Ich exprimiere dazu eine dominant-negative Mutante von Elk-1 (Abbildung 30A) in HEK293-Zellen, die eine induzierbare TRPM3-Expressionseinheit enthielten. Das Ergebnis war eine signifikante Reduktion des durch TRPM3 induzierten Anstiegs der IL-8-Promotoraktivität (Abbildung 30B). Diese Daten legen nahe, dass c-Fos ebenfalls Teil der Signalkaskade ist, die das IL-8-Gen nach Aktivierung von TRPM3-Kanälen reguliert.

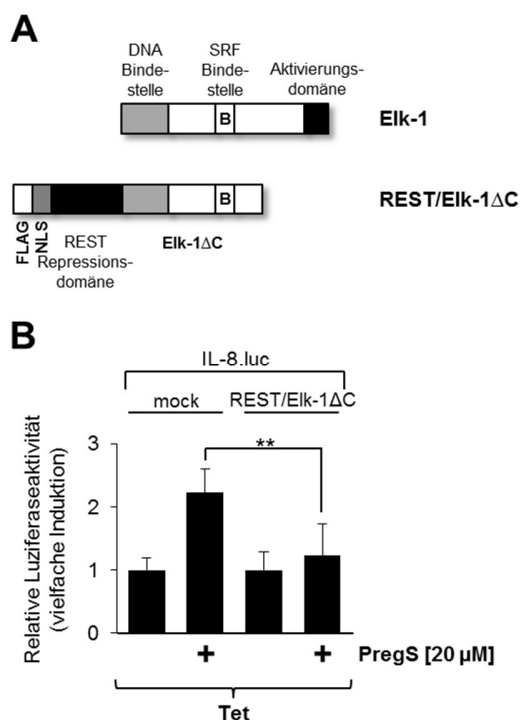


Abbildung 30 Ternärer Komplexfaktor kontrolliert die IL-8-Promotoraktivität nach Stimulation von TRPM3-Kanälen. (A) Modulare Struktur von Elk-1 und REST/Elk-1ΔC, einer dominant-negativen Mutante. (B) HEK293-Zellen, die eine Tetrazyklin-induzierbare TRPM3-Expressionseinheit enthielten, wurden mit Lentivirus infiziert, der ein IL-8-Promotor-kontrolliertes Reportergen enthielt. Die Zellen wurden zusätzlich mit einem Kontroll-Lentivirus (mock) oder mit einem rekombinanten Lentivirus, der für die Elk-1-Mutante REST/Elk-1ΔC kodierte, infiziert. Die Zellen wurden in serumreduziertem Medium in Gegenwart von Tetrazyklin inkubiert und für 24 h mit Pregnenolonsulfat (PregS, 20 μM) stimuliert. Luziferase-Aktivitäten und Proteinkonzentrationen wurden gemessen. Drei unabhängige Experimente, die in vierfacher Ausführung durchgeführt wurden, und die gezeigten Daten sind Mittelwerte +/- Standardabweichung (**, $P < 0.01$).

3.4.5. Die Protein-Phosphatase MKP-1 vermindert die Pregnenolonsulfat-induzierte Stimulation des IL-8-Promotors in TRPM3-exprimierenden HEK293 Zellen

In Pregnenolonsulfat-stimulierten TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen wurde die Aktivierung von AP-1 durch Expression der MAP-Kinase Phosphatase-1 (MKP-1) abgeschwächt (Lesch et al., 2015). Die Fragestellung war hier nun, ob eine Überexpression von MKP-1 die Hochregulation der IL-8-Promotoraktivität beeinträchtigt. In Abbildung 31A kann man sehen, dass in HEK293-Zellen, die aktivierte TRPM3-Kanäle exprimieren, die Aktivität des IL-8-Promotors in Gegenwart von MKP-1 fast auf Basalwerte reduziert war. Diese Daten zeigen, dass aktive nukleäre MAP-Kinasen erforderlich sind, um die Transkription des IL-8-Gens nach Stimulation von TRPM3-Kanälen zu aktivieren.

3.4.6. Die MAP-Kinase ERK1/2 wirkt als Signaltransduktor zwischen aktivierten TRPM3-Kanälen und dem IL-8-Gen

MKP-1 ist eine nukleäre Phosphatase, die die MAP-Kinasen ERK, p38 und c-Jun N-terminale Proteinkinase dephosphoryliert und dadurch inaktiviert (Shapiro and Ahn, 1998; Slack et al., 2001). Kürzlich wurde gezeigt, dass die Stimulation von TRPM3-Kanälen die Phosphorylierung von ERK1/2 induziert (Lesch et al., 2017), was darauf hinweist, dass die Aktivierung von ERK1/2 Teil der TRPM3-induzierten Signalisierungskaskade ist. Inhalt der vorliegenden Arbeit war es daher zu beurteilen, ob ERK1/2 ein Signaltransduktor ist, der aktivierte TRPM3-Kanäle mit dem IL-8-Gen verbindet. Unter Verwendung eines pharmakologischen Ansatzes wurden die mit Pregnenolonsulfat stimulierten TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen mit PD98059 behandelt, um den ERK1/2-Signalweg zu inhibieren. Abbildung 31B zeigt, dass die Inkubation der Zellen mit dieser Verbindung die Hochregulation der IL-8-Promotoraktivität effizient blockieren konnte. Diese Daten wurden durch Experimente unter Verwendung der RNA-Interferenztechnik bestätigt, um die Konzentrationen von ERK1 und ERK2 in den Zellen zu reduzieren. Die Wirksamkeit dieser shRNAs wurde bereits gezeigt (Lesch et al., 2017; (Hong et al., 2009). Ich habe die ERK1/2-spezifischen shRNAs funktionell in HEK293-Zellen getestet, die eine bedingt aktive Form von B-Raf (Δ B-Raf:ER) exprimierten (Thiel et al., 2009) (Abbildung 31C). Die Stimulation dieser Zellen mit 4-OHT aktiviert den ERK-Signalweg, was zu einer erhöhten AP-1-Aktivität führt, wie kürzlich gezeigt wurde (Kaufmann et al., 2013). Abbildung 31C (linke Balken) zeigt, dass die Stimulation des ERK1/2-Signalwegs die IL-8-Promotoraktivität erhöhte. Die IL-8-Promotoraktivität war jedoch signifikant reduziert, wenn ERK1- und ERK2-spezifische shRNAs exprimiert wurden. Ich untersuchte dann, ob die Expression von ERK1/2-spezifischen shRNAs auch die IL-8-Promotor-regulierte Gentranskription in HEK293-Zellen, die aktivierte TRPM3-Kanäle exprimieren, abschwächte. Abbildung 20D zeigt, dass die Expression von ERK1/2-spezifischen shRNAs die durch Pregnenolonsulfat induzierte Transkription eines IL-8-Promotor-kontrollierten Reportergens in TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen fast vollständig blockierte. Daraus lässt sich schließen, dass ERK1/2 als Signaltransduktor fungiert, der durch Pregnenolonsulfat aktivierte TRPM3-Kanäle mit dem IL-8-Gen verbindet.

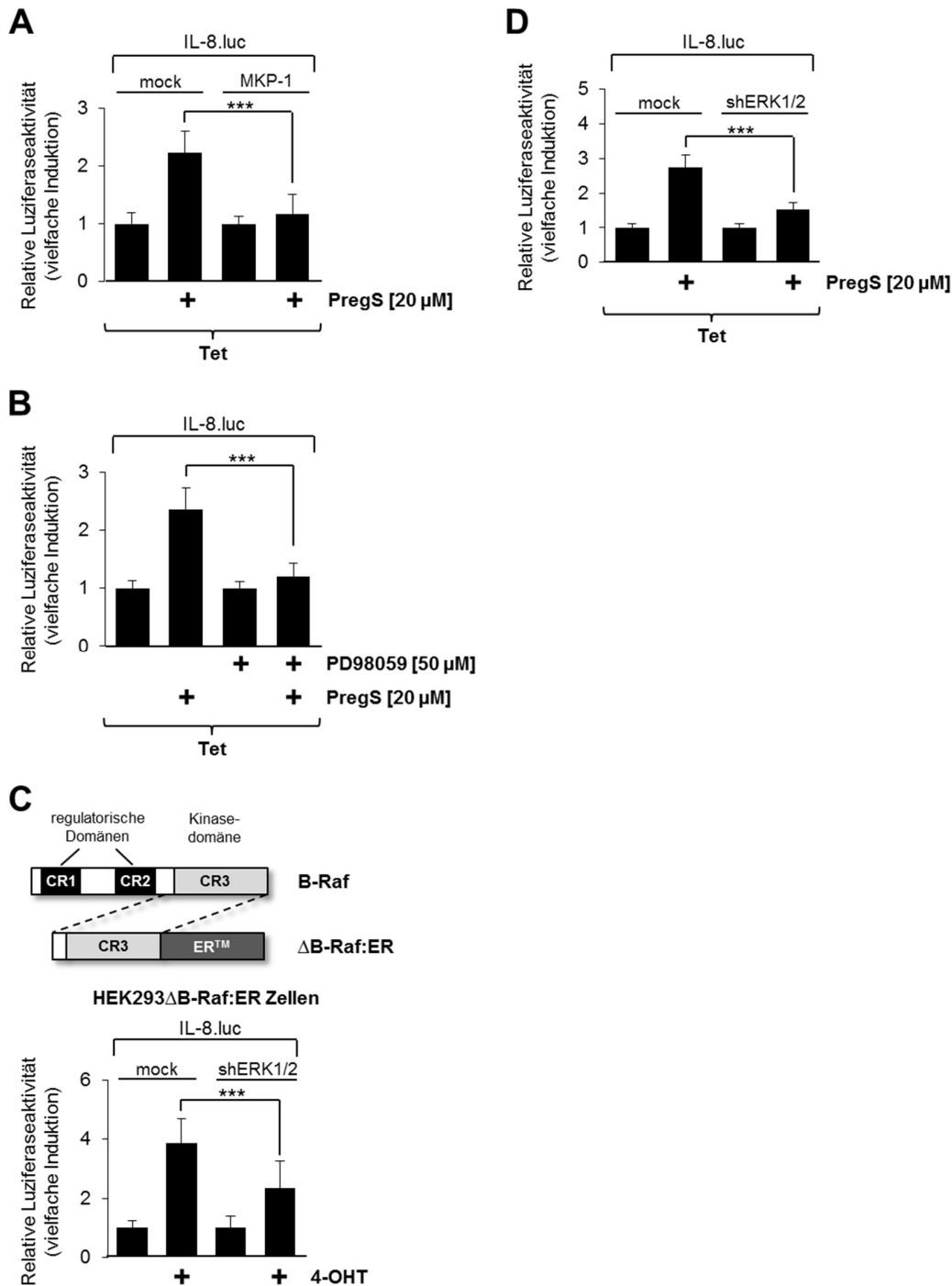


Abbildung 31 Die Proteinkinase ERK1/2 ist ein Signaltransduktor, der TRPM3-Kanäle mit dem IL-8-Gen verbindet. (A) HEK293-Zellen, die eine Tetrazyklin-induzierbare TRPM3-Expressionseinheit enthielten, wurden mit einem Lentivirus infiziert, der ein IL-8 Promotor-kontrolliertes Reportergen enthielt. Die Zellen wurden zusätzlich mit einem rekombinanten Lentivirus, der für MKP-1 kodiert oder mit einem Kontroll-Lentivirus (mock) infiziert. Die Zellen wurden in serumreduziertem Medium in Gegenwart von Tetrazyklin inkubiert und mit Pregnenolonsulfat stimuliert (PregS, 20 μM, 24 h). (B) HEK293-Zellen, die eine Tetrazyklin-induzierbare TRPM3-Expressionseinheit enthielten, wurden mit

einem rekombinanten Lentivirus infiziert, der das vom IL-8-Promotor kontrollierte Luziferase-Reportergen (IL-8.luc) enthielt. Die Zellen wurden für 24 h in Medium mit 0,05% Serum und Tetrazyklin (1 µg / ml) inkubiert und 3 h mit PD98059 (50 µM) vorinkubiert. Die Stimulation der Zellen mit Pregnenolonsulfat (PregS, 20 µM) wurde 24 H lang in Gegenwart von PD98059 durchgeführt. (C) Modularer Aufbau von B-Raf und der bedingt aktiven Form Δ B-Raf:ER. HEK293/ Δ B-Raf:ER-Zellen wurden mit einem Lentivirus infiziert, der ein Reportergen unter der Kontrolle des IL-8-Promotors (IL-8.luc) kodiert. Die Zellen wurden zusätzlich mit Lentiviren infiziert, die ERK1- und ERK2-spezifische shRNAs kodierten. Der Vektor pLL3.7 wurde verwendet, um ein Kontroll-Lentivirus (mock) zu erzeugen. Die Stimulation der Zellen wurde 24 H lang mit 4-OHT (100 nM) durchgeführt. (D) HEK293-Zellen, die eine Tetrazyklin-induzierbare TRPM3-Expressionseinheit enthielten, wurden mit einem Lentivirus infiziert, der IL-8.luc enthielt. Die Zellen wurden zusätzlich mit einem Kontroll-Lentivirus oder mit Lentiviren infiziert, die für ERK1- und ERK2-spezifische shRNAs kodierten. Die Zellen wurden serumreduziert, mit Tetrazyklin behandelt und mit Pregnenolonsulfat (PregS, 20 µM) für 24 h stimuliert. Zellextrakte wurden präpariert und zur Messung der Luziferase-Aktivitäten und Proteinkonzentrationen verwendet. Drei unabhängige Experimente, die in vierfacher Ausführung durchgeführt wurden, und Daten, die gezeigt werden, sind Mittelwerte +/- Standardabweichung (***, P < 0.001).

4. Diskussion

4.1. CIM2016 reguliert die Gentranskription in TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen

Der Transient Receptor Potential Melastatin 3 (TRPM3)-Kanal ist ein Ca^{2+} -permeabler Kationenkanal, dessen Stimulation einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auslöst. TRPM3-Kanäle sind noch relativ unbekannt, aber es wurden bereits mehrere Verbindungen als TRPM3-spezifische Agonisten beschrieben. In den meisten dieser Studien wurde der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Zellen und der anschließende Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration als Indikator für aktivierte TRPM3-Kanäle genutzt. Experimente mit kultivierten Neuronen und neuronalen Zelllinien zeigten jedoch, dass der Zustrom von Ca^{2+} -Ionen in die Zellen nicht immer ausreicht, um eine intrazelluläre Signalkaskade zu induzieren, die zu Veränderungen des Genexpressionsmusters führt (Gallin and Greenberg, 1995; Deisseroth et al., 1998; West et al., 2001). In meiner Masterarbeit habe ich die Fähigkeit von mutmaßlichen TRPM3-Aktivatoren untersucht, Gentranskription zu induzieren. Es zeigte sich, dass Pregnenolonsulfat ein starker Aktivator der TRPM3-vermittelten Gentranskription ist, während andere potentielle TRPM3-Liganden (Nifedipin, D-Erythro-Sphingosin) entweder keine oder TRPM3-unabhängige Wirkungen auf die Gentranskription zeigten. Diese Verbindungen induzieren einen Anstieg von intrazellulärem Ca^{2+} , jedoch reicht das Ca^{2+} -Signal nicht aus, um eine intrazelluläre Signalkaskade zu induzieren, die das Genexpressionsmuster der Zellen verändert. Kürzlich wurde eine synthetische Verbindung mit der Bezeichnung CIM0216 beschrieben, deren Wirksamkeit bei der Erzeugung eines Ca^{2+} -Einstroms über TRPM3-Kanäle die von Pregnenolonsulfat weit übertraf (Held et al., 2015a). In einem Teil meiner Arbeit beschäftige ich mich daher mit der Frage, ob CIM0216 durch die Stimulation von TRPM3-Kanälen auch ein potenter Aktivator der Gentranskription ist.

Die Resultate meiner Arbeit zeigen, dass sowohl CIM0216 als auch Pregnenolonsulfat starke Aktivatoren der AP-1-regulierten Gentranskription über TRPM3 sind. Darüber hinaus erhöhten beide Verbindungen das Transkriptionsaktivierungspotential von c-Jun und c-Fos. Ein Vergleich der Effizienz von CIM0216 und Pregnenolonsulfat zur Induktion der Gentranskription zeigte, dass Pregnenolonsulfat bei der Aktivierung von AP-1 stärker ist und eine ähnliche Aktivität wie CIM0216 bei der Stimulierung des Transkriptionsaktivierungspotentials von c-Jun und c-Fos aufweist.

Die CIM0216-induzierte Gentranskription wurde durch Knock-down von TRPM3 oder Behandlung mit Mefenaminsäure, einem TRPM3-Inhibitor, abgeschwächt. Diese Beobachtung zeigt, dass CIM0216 seine Wirkung über TRPM3 erzeugt. Jedoch war CIM0216 im Vergleich zu Pregnenolonsulfat ähnlich oder weniger in der Lage, die TRPM3-vermittelte Gentranskription zu aktivieren, was nahelegt, dass Pregnenolonsulfat immer noch der bevorzugte Ligand ist, um das Genexpressionsmuster via TRPM3 zu verändern.

4.2. c-Fos ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor in der PregS-induzierten TRPM3-Signalkaskade

Das c-Fos-Protein ist ein Transkriptionsfaktor, der einen zentralen "Kern", eine basische Leucin-Zipper (bZIP)-Domäne, für die DNA-Bindung und Dimerisierung enthält. Die Transaktivierungsdomäne befindet sich am C-Terminus. c-Fos dimerisiert mit bZIP-Proteinen aus der Jun-Familie von Transkriptionsfaktoren und bildet so den AP-1-Transkriptionsfaktorkomplex. Eine gezielte Inaktivierung des c-Fos-Gens in transgenen Mäusen führte zu lebensfähigen Mäusen, die wachstumsstabil waren und denen Osteoklasten fehlten. Im Nervensystem wird die c-Fos-Expression durch neuronale Aktivität induziert. Dementsprechend wird häufig eine Hochregulierung der c-Fos-Immunreaktivität als indirekter Marker zur Identifizierung von aktivierten Neuronen verwendet. Eine Eliminierung der c-Fos-Expression im Hippocampus zeigte, dass c-Fos für die neuronale Erregbarkeit und das Überleben essentiell ist. Die mutierten Mäuse zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen stärkere kaininsäure-induzierte Anfälle, erhöhte neuronale Erregbarkeit und neuronalen Zelltod (Zhang et al., 2002). Die Expression des c-Fos-Gens wird auf verschiedenen Wegen induziert, was zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt. Der Weg des Ca^{2+} -Einstroms spielt hier eine Schlüsselrolle bei der Selektion, welche Signaltransduktoren und Transkriptionsfaktorkomplexe aktiviert werden, um eine Hochregulation der c-Fos-Expression auszulösen.

Ein Ziel meiner Arbeit war es, die intrazelluläre Signalkaskade zu analysieren, die den Ca^{2+} -Einstrom über TRPM3-Kanäle mit einer Hochregulation der c-Fos-Expression und -Aktivität verbindet.

Die Verbindung zwischen einem Anstieg des zytosmatischen Ca^{2+} und einer Hochregulation der c-Fos-Gentranskription erfolgt durch Proteinkinasen und MAP-Kinasen (MAPKs). PKC- und Ca^{2+} -/Calmodulin-abhängige Proteinkinasen wurden als Signaltransduktoren beschrieben (Johnson et al., 1997; Dolmetsch et al., 2001; Ely et al., 2011; Glidewell-Kenney et al., 2014). Die

in meiner Arbeit beschriebenen Experimente beleuchten die Bedeutung von MAPKs bei der Regulation der c-Fos-Expression durch eine TRPM3-induzierte Signalkaskade. Ich konnte zeigen, dass die Überexpression von MKP-1 oder MKP-5, Enzymen, die MAPKs im Zellkern dephosphorylieren und inaktivieren, eine PregS-induzierte Transkription eines vom c-Fos-Promotor kontrollierten Reportergens abschwächen. So fungieren die Phosphatasen MKP-1 und MKP-5 als nukleare Sperren, die die durch PregS-Stimulation von TRPM3-Kanälen induzierten Signalkaskaden unterbrechen, wie auch bereits für andere Signalwege gezeigt wurde (Rössler et al., 2008; Rössler and Thiel, 2009) (Mayer et al., 2011; Thiel and Rössler, 2011; Thiel et al., 2012; Thiel and Rössler, 2014); (Kaufmann et al., 2013). Zukünftige Experimente sollten Klarheit darüber bringen, welche der MAPKs tatsächlich erforderlich sind, um die c-Fos-Promotoraktivität nach dem Einstrom von Ca^{2+} -Ionen über aktivierte TRPM3-Kanäle zu stimulieren.

Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die Transkription eines CRE-kontrollierten Reportergens in Insulinomazellen nach PregS-Behandlung reguliert wird (Müller et al., 2011) und das CRE-Element daher als PregS-responsives Element fungiert. Da die Phosphorylierung von CREB und die Stimulation der CRE-vermittelten Gentranskription auch in verschiedenen Zelltypen nach der Öffnung von Ca^{2+} -Kanälen des L-Typs induziert wird (Thompson et al., 1995; Rajadhyaksha et al., 1999), zeigten die Ergebnisse der Insulinomastudie nicht eindeutig, dass die Stimulation von TRPM3-Kanälen für die Aktivierung von Genen mit CRE-Elementen im Promotor in PregS-stimulierten Zellen verantwortlich ist.

Mit HEK293 Zellen als zelluläres Modellsystem konnte ich zeigen, dass eine Stimulation der Zellen mit PregS die Transkription eines Reportergens, das ausschließlich vom CRE-Element, das aus dem menschlichen c-Fos-Gen stammte, kontrolliert wurde. Somit ist eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration über die Stimulation von TRPM3- oder L-Typspannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen ausreichend, um die Transkription von CRE-haltigen Genen zu aktivieren. Daher verbindet das CRE nicht nur erhöhte cAMP-Konzentrationen mit verbesserter c-Fos-Promotor-Aktivität, sondern vermittelt auch die Wirkung erhöhter Ca^{2+} -Niveaus bei der Transkription. Das CRE-Element innerhalb des c-Fos-Promotors wurde daher als Ca^{2+} -responsives Element bezeichnet (Sheng et al., 1990). Die Deletion dieser Sequenz innerhalb des c-Fos-Promotors löste die Reaktionsfähigkeit auf erhöhte cAMP-Spiegel innerhalb der Zelle vollständig auf, die Fähigkeit von TRPM3 exprimierenden HEK293-Zellen, auf PregS-Stimulation zu reagieren blieb erhalten. So fungieren neben dem CRE-Element auch andere Ca^{2+} -responsive genetische Elemente als Reaktionselemente für den durch Aktivierung von TRPM3 induzierten Signalweg.

Zusätzlich zum CRE wurde das Serum Response Element (SRE) des c-Fos-Gens als zweites Element in Verbindung mit Ca^{2+} -Signalwegen in den Zellen identifiziert (Lee and Gilman, 1994;

Misra et al., 1994; Xia et al., 1996) (Johnson et al., 1997). Tatsächlich wurde die Molekularbiologie der SRE-vermittelten Gentranskription in der Analyse des c-Fos-Gens aufgeklärt (Cahill et al., 1995; Treisman, 1995). Im Nervensystem induziert ein Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels, entweder durch Aktivierung von Neurotransmitter-Rezeptoren (z.B. NMDA-Rezeptoren) oder durch Stimulation von L-Typ-spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen, die SRE-vermittelte Transkription des c-Fos-Gens (Misra et al., 1994; Xia et al., 1996). Das SRE besteht aus der Bindestelle für den Serum-Response-Faktor (SRF), die die Konsensussequenz CC[A/T]6GG (die CARG-Box) besitzt, und aus TCF (ternary complex factor)-Bindestellen neben der CARG-Box mit der Ets-Konsensus-Kernsequenz GGAA/T. Die Mutationsanalyse des c-Fos-Promotors ergab, dass die SRF-Stelle notwendig ist, um den TRPM3-Signalweg mit einer verbesserten c-Fos-Promotoraktivität zu verbinden. Die benachbarte TCF-Bindestelle konnte ohne negative Effekte auf die Kopplung von Stimulus und Gentranskription mutiert werden.

In ähnlicher Weise erfordert die Aktivierung des c-Fos-Promotors durch Stimulierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren den SRF, nicht aber die Bindung von TCFs (Hill and Treisman, 1995);(Ely et al., 2011), was indiziert, dass das Ca^{2+} , entweder durch Aktivierung von spannungsgesteuerten oder ionotropen Ca^{2+} -Kanälen oder über den IP_3/IP_3 -Rezeptor-Signalweg, unterschiedliche Signalmoleküle zur Hochregulation der c-Fos-Expression aktiviert. In meiner Masterarbeit konnte ich zeigen, dass die TRPM3-Aktivierung das Transkriptionsaktivierungspotential des TCFs Elk-1 reguliert (Lesch et al., 2014), einem der wichtigsten MAPK-Substrate, das intrazelluläre Signalkaskaden mit SRE-vermittelter Transkription verbindet. Außerdem konnte ich und andere Arbeiten zeigen, dass eine dominant-negative Mutante von Elk-1 die TRPM3-induzierte Transkription von Reportergenen unter der Kontrolle des Egr-1-, c-Fos- oder des Kollagenase-Promotor verminderte (Mayer et al., 2011; Lesch et al., 2015b). Somit stellt Elk-1 ein Zielmolekül der PregS-induzierten Signalkaskade nach Aktivierung von TRPM3 dar. Da eine TCF-Aktivierung, zusammen mit einem SRF-Dimer, erforderlich ist, um die Transkription über das SRE zu aktivieren, könnten andere TCF-Bindestellen innerhalb des c-Fos-Promotors die Mutation der Ets-Bindestelle in 5'-Richtung der CARG-Box kompensieren. Alternativ kann Elk-1 über Protein-Protein-Wechselwirkung mit dem SRF an den c-Fos-Promotor geleitet werden, wie es vor kurzem für die GnRH-induzierte Aktivierung der c-Fos-Expression in Gonadotropen (Ely et al., 2011) oder der Neurokinin B-stimulierten c-Fos-Transkription in immortalisierten GnRH-Neuronen (Glidewell-Kenney et al., 2014) beschrieben wurde. Diese Beobachtungen würden die biologische Wirkung der in meiner Arbeit beschriebenen Elk-1-Mutante REST/Elk-1ΔC erklären, welche die B-Domäne von Elk-1 noch besitzt und dadurch die Elk-1-SRF-Interaktion stört. Die Regulation der c-Fos-Gentranskription durch TCF erklärt auch bisher veröffentlichte Daten, die zeigen, dass die TCF-

Aktivierung für die Verbindung der TRPM3-Stimulation mit einer verbesserten AP-1-vermittelten Gentranskription entscheidend ist (Lesch et al., 2015b).

Eine Mutationsanalyse des c-Fos-Promotors ergab, dass die AP-1-Bindestelle, zusätzlich zum CRE-Element und der CARG-Box, die Reaktionsfähigkeit auf eine Erhöhung des zytoplasmatischen Ca^{2+} -Spiegels infolge einer TRPM3-Aktivierung gewährt. Es wurde gezeigt, dass diese Stelle die c-Fos-Gentranskription nach Stimulation mit EGF oder Phorbol ester vermittelt (Fisch et al., 1989). Zusätzlich kontrolliert die AP-1-Bindestelle in T-Zellen die Induktion von c-Fos-mRNA durch intrazelluläres Ca^{2+} (Lee and Gilman, 1994). Unter Verwendung einer dominant-negativen Mutante konnte ich beweisen, dass diese Stelle zur Hochregulation der Transkription des Reportergens beiträgt, das vom c-Fos-Promotor in HEK293-Zellen, die aktivierte TRPM3-Kanäle exprimieren, kontrolliert wird.

Diese Experimente verdeutlichen die Bedeutung des bZIP-Proteins c-Jun innerhalb der TRPM3-induzierten Signalkaskade. Ursprünglich wurde AP-1 als Heterodimer von c-Jun und c-Fos beschrieben. c-Jun ist an der Regulierung der c-Fos-Expression beteiligt und reguliert auch seine eigene Expression über AP-1-Bindestellen innerhalb der c-Jun-Genregulationsregion (Thiel and Rössler, 2011). Darüber hinaus unterstützen die Experimente meiner Arbeit frühere Beobachtungen, dass c-Jun als Ca^{2+} -responsiver Transkriptionsaktivator fungiert (Cruzalegui et al., 1999; Müller et al., 2011).

Zusammenfassend kann man sagen, dass dieser Teil meiner Arbeit als erste Studie Signalmoleküle charakterisierte, die erforderlich sind, um die c-Fos-Expression infolge des Ca^{2+} -Einstroms in den Zellen über aktivierte TRPM3-Kanäle zu regulieren. Ich konnte zeigen, dass die Aktivierung von MAPKs essentiell dafür ist, eine Verbindung zwischen einem Anstieg des zytoplasmatischen Ca^{2+} über TRPM3-Kanäle und einer verbesserten c-Fos-Promotoraktivität herstellen zu können. Im Zellkern erfordert die c-Fos-Expression nach der Stimulation von TRPM3-exprimierenden Zellen mit Pregnenolonsulfat drei Ca^{2+} -responsive Elemente, das CRE, die CARG-Box und die AP-1-Bindestelle (Abbildung 32). Hierbei sind die Transkriptionsfaktoren CREB, c-Jun und SRF involviert.

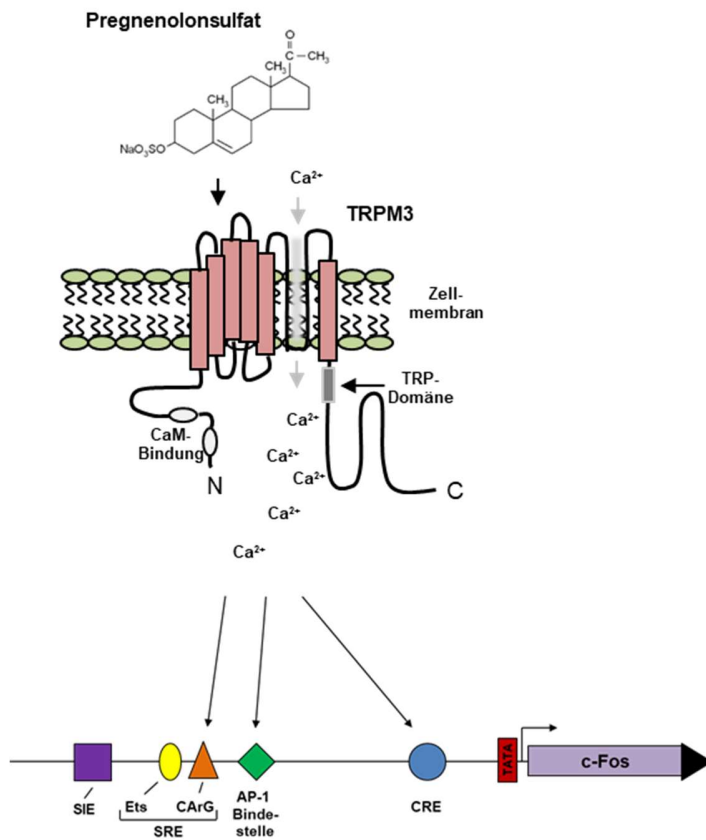


Abbildung 32 Schematische Darstellung der c-Fos-Promoter-Regulation nach TRPM3-Aktivierung durch Pregnenolonsulfat (PregS). Um PregS-responsive Elemente innerhalb des c-Fos-Genpromotors nach TRPM3-Aktivierung zu identifizieren, habe ich den molekularen Weg, der zur c-Fos-Genexpression durch PregS führt, analysiert. Das c-Fos-Gen kodiert für einen basischen Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktor und wird durch eine Vielzahl von Signalmolekülen reguliert. Ich analysierte in das Chromatin integrierte c-Fos-Promotor/Luciferase-Reportergene, in denen Transkriptionsfaktor-Bindestellen durch Punktmutationen oder Deletionsmutagenese zerstört wurden. Die Mutation der Bindestellen für Serum-Response-Faktor (SRF), Aktivator-Protein-1 (AP-1) und cAMP-Response-Element-Bindeprotein (CREB) reduzierten die Reportergen-Transkription nach Stimulation der Zellen mit PregS signifikant. Inaktivierung der Bindungsstellen für STAT (SIE = SIS-inducible element) oder ternäre Komplexfaktoren (Ets) beeinflusste die PregS-regulierte c-Fos-Promotoraktivität über TRPM3 nicht. Somit enthält der c-Fos-Promotor drei PregS-responsive Elemente: das cAMP-Response-Element (CRE) und die Bindestellen für SRF und AP-1.

Meine Experimente mit einer dominant-negativen Mutante von Elk-1 deuten zusätzlich auf eine wichtige Rolle von TCFs bei der Regulation der c-Fos-Gentranskription in HEK293-Zellen, die aktivierte TRPM3-Kanäle exprimieren. Die Stimulation von c-Fos-Expression und -Aktivität durch PregS-induzierte TRPM3-Aktivierung verbindet TRPM3 mit den biologischen Funktionen des AP-1-Transkriptionsfaktors, der an der Regulation von Proliferation, Transformation, Differenzierung und programmiertem Zelltod beteiligt ist (Shaulian and Karin, 2002).

4.3. Rolle von Elk-1 in der TRPM3-vermittelten Signaltransduktion

Kürzlich wurde gezeigt, dass die Stimulation von TRPM3-Kanälen das transkriptionelle Aktivierungspotential des ternären Komplexfaktors (TCF) Elk-1 erhöhte. Ein weiteres Ziel meiner Arbeit war es daher, intrazelluläre Signaltransduktoren zwischen der TRPM3-Signalkaskade und der Stimulation von Elk-1 zu identifizieren. Elk-1 ist von besonderem Interesse, da es einen Konvergenzpunkt für intrazelluläre Signalkaskaden darstellt, die durch Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone und Neurotransmitter initiiert werden und kontrolliert eine Vielzahl von biologischen Funktionen, einschließlich der Regulation von Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Transkription und Zellmigration (Besnard et al., 2011; Kasza, 2013). TRPM3-Kanäle fungieren als Ca^{2+} -durchlässige Kationenkanäle (Wagner et al., 2008; Majeed et al., 2010). Dementsprechend erfordert die Stimulation der Transkription über die Transkriptionsfaktoren Egr-1 und AP-1 eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in PregS-stimulierten TRPM3-exprimierenden Zellen (Mayer et al., 2011; Lesch et al., 2015b).

Meine Arbeit zeigt, dass der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Zellen wesentlich ist, um das transkriptionale Aktivierungspotential von Elk-1 in TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen, die mit Pregnenolonsulfat stimuliert worden waren, zu erhöhen. Meine Daten identifizieren Elk-1 als Ca^{2+} -sensitiven Transkriptionsfaktor. In Neuronen wurde eine Zunahme der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration mit der Transkription von SRE-regulierten Genen korreliert, während ein Anstieg des nuklearen Ca^{2+} für die CREB-vermittelte Transkription von cAMP-Response-Element-regulierten Genen erforderlich ist (Hardingham et al., 1997). Diese Schlussfolgerung basierte auf einer Einzelzellkernmikroinjektion eines nicht diffundierbaren Ca^{2+} -Puffers. Ich wählte einen biochemischen Ansatz und exprimerte das Ca^{2+} -bindende Protein Parvalbumin entweder im Zellkern oder im Zytosol, um Ca^{2+} -Signale in diesen Kompartimenten zu reduzieren. Die Ergebnisse dieses Experimentes zeigen, dass eine Pregnenolonsulfat/TRPM3-induzierte Hochregulation des transkriptionalen Aktivierungspotentials von Elk-1 einen Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} erforderte, unabhängig von Änderungen der nuklearen Ca^{2+} -Konzentration.

Diese Beobachtung wurde durch Experimente, die die Hemmung des zytoplasmatischen Enzyms MAP-Kinase-Kinase mit der Verbindung PD98059 beinhalten, weiter bekräftigt. Die Phosphorylierung und Aktivierung der MAP-Kinase-Kinase führt zur Phosphorylierung und somit zur Aktivierung von ERK, dem Schlüsselenzym des ERK-Signalwegs. Meine Arbeit zeigt, dass die Hemmung der MAP-Kinase-Kinase die Signalkaskade, die TRPM3-Kanäle mit der Elk-1-Aktivität verbindet, abschwächte. Diese Daten wurden durch genetische Experimente mit der Expression von shRNAs, die gegen beide Formen von ERK, ERK1 und ERK2, gerichtet waren,

bestätigt. Das Transkriptionsaktivierungspotential von Elk-1 wurde unter diesen Bedingungen nach Stimulation von TRPM3-Kanälen mit Pregnenolonsulfat signifikant reduziert.

Darüber hinaus habe ich gezeigt, dass nukleare MAP-Kinasen erforderlich sind, um die Signalkaskade fortzusetzen. Die Überexpression von MKP-1, einem Kern-Enzym, das ERK und andere MAP-Kinasen dephosphoryliert (Shapiro and Ahn, 1998), führte zu einer vollständigen Unterbrechung der Signalkaskade. Zusammen zeigen diese Daten, dass ERK als Signaltransduktor zwischen aktivierten TRPM3-Kanälen und der Elk-1-Aktivität fungiert.

Ein Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in das Zytosol kann zur Aktivierung der Ca^{2+} /Calmodulin-regulierten Proteinphosphatase Calcineurin führen, von der bekannt ist, dass sie Elk-1 dephosphoryliert und inaktiviert (Sugimoto et al., 1997; Tian and Karin, 1999; Sieber et al., 2007). In meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass die Expression einer konstitutiv aktiven Calcineurin A-Mutante die Pregnenolonsulfat/TRPM3-induzierte Aktivierung von Elk-1 abschwächte. Dadurch konnte ich die Hypothese aufstellen, dass Calcineurin als eine negative Rückkopplungsschleife fungiert, um die Signalkaskade, die die TRPM3-Stimulation mit einer verbesserten Transkriptionsaktivität von Elk-1 verbindet, zu hemmen.

4.4. Das Interleukin-8-Gen ist ein Zielgen der TRPM3-vermittelten Signalkaskade

Stimulation der Ca^{2+} -durchlässigen TRPM3-Kanäle aktiviert den Transkriptionsfaktor AP-1 (Müller et al., 2011; Lesch et al., 2014; Lesch et al., 2015b; Lesch et al., 2017). AP-1 bindet an regulatorische Regionen von nachgeschalteten Zielgenen und aktiviert die Transkription dieser Gene. Die Genprodukte dieser Zielgene induzieren Veränderungen in der Biochemie der Zellen als Folge der TRPM3-Stimulation. Um die intrazellulären Funktionen der TRPM3-Stimulation zu verstehen, ist es daher wichtig, die nachgeschalteten Zielgene von AP-1 und anderen stimulusresponsiven Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, die in Folge der TRPM3-Stimulation aktiviert werden. Bei der Suche nach AP-1-responsiven Genen wurde das IL-8-Gen analysiert, da viele extrazelluläre Signalmoleküle, einschließlich Zytokine, reaktive Sauerstoffspezies und Liganden von Plasmamembranrezeptoren die Transkription des IL-8-Gens regulieren. Ich konnte das IL-8-Gen als ein nachgeschaltetes Gen des Pregnenolonsulfat/TRPM3 induzierten Signalwegs identifizieren.

Auf genregulatorischer Ebene benötigen viele Signalmoleküle, die eine Steigerung der IL-8-Gentranskription induzieren, entweder die AP-1- oder NF- κ B-Bindestelle des IL-8-Promotors oder

auch beide. Meine Ergebnisse demonstrieren, dass die AP-1-Bindestelle des IL-8-Gens als Pregnenolonsulfat-responsives Element wirkt und die PregS-induzierte Aktivierung von AP-1 mit erhöhter IL-8-Promotoraktivität verbindet. Die Mutation der NF- κ B-Bindestelle des IL-8-Promotors hatte keine Auswirkung auf die durch den IL-8-Promotor regulierte Reportergentranskription in HEK293-Zellen, die aktivierte TRPM3-Kanäle exprimieren. Dies steht im Gegensatz zur Existenz von Signalkaskaden, die durch Gastrin in menschlichen Magenkrebszellen, durch TNF α in humanen Atemwegsepithelzellen oder durch bcl-xL-Überexpression in menschlichen Gliomzellen induziert werden, wobei NF- κ B essentiell für die Stimulation der IL-8-Gentranskription ist (Li et al., 2002; Gabellini et al., 2008; Subramaniam et al., 2008).

Wurde AP-1 zunächst als Heterodimer der bZIP-Proteine cJun und c-Fos beschrieben (Chiu et al., 1988), identifizierte man später c-Jun- und c-Fos-homologe Proteine in AP-1-Komplexen. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass ATF-Proteine wie ATF2 mit Proteinen der c-Jun-Familie dimerisieren und einen funktionellen AP-1-Transkriptionsfaktor darstellen. Meine Daten zeigen, dass c-Jun und ATF2 erforderlich sind, um den IL-8-Promotor in HEK293-Zellen zu stimulieren, die aktivierte TRPM3-Kanäle exprimieren. Darüber hinaus legt meine Arbeit dar, dass das bZIP-Protein c-Fos auch Teil der Signalkaskade zwischen TRPM3 und dem IL-8-Gen ist.

Zudem wurde kürzlich gezeigt, dass die Expression einer dominant-negativen Mutante von Elk-1 die Aktivierung von AP-1 in stimulierten TRPM3-exprimierenden HEK293-Zellen verhinderte (Lesch et al., 2015b). Die Elk-1-Mutante milderte die durch TRPM3 induzierte Hochregulation der c-Fos-Expression durch Interferieren mit dem serum response element innerhalb des c-Fos-Gens. Die Tatsache, dass c-Fos, c-Jun und ATF2 die IL-8-Gentranskription regulieren, stimmt mit der Beobachtung überein, dass die TRPM3-Stimulation das Transkriptionsaktivierungspotential dieser bZIP-Proteine erhöht (Lesch et al., 2015b).

Genetische und pharmakologische Experimente zeigten, dass die Proteinkinase ERK1/2 als Signaltransduktor für die Verbindung der PregS-Stimulation von TRPM3-Kanälen mit dem IL-8-Gen fungiert. ERK1/2 wird in Pregnenolonsulfat-stimulierten HEK293-Zellen, die TRPM3-Kanäle exprimieren, phosphoryliert und aktiviert (Lesch et al., 2017). Experimente, die eine Überexpression der nuklearen Phosphatase MKP-1 einschließen, zeigen, dass im Kern zur Aktivierung des IL-8-Promotors phosphoryliertes ERK1/2 erforderlich ist.

Die Stimulation von TRPM3-Kanälen aktiviert den stimulus-responsiven Transkriptionsfaktor AP-1. Meine Arbeit legt dar, dass das IL-8-Gen als ein nachgeschaltetes Zielgen für die durch die Aktivierung von TRPM3-Kanälen ausgelöste Signalkaskade fungiert. Die Daten zeigen, dass die AP-1-Bindestelle des IL-8-Gens ein Pregnenolonsulfat-responsives Element darstellt, was die TRPM3-Kanalaktivierung mit dem IL-8-Gen verbindet. Die bZIP-Proteine c-Jun, c-Fos und ATF2

wurden als essentielle Bestandteile des AP-1-Transkriptionsfaktor-Komplexes identifiziert und regulieren die Aktivierung der IL-8-regulierten Gentranskription nach Stimulation der TRPM3-Kanäle. Schließlich wurde die Proteinkinase ERK1/2 als Signaltransduktor identifiziert, der die TRPM3-Kanalaktivierung mit dem IL-8-Gen verbindet. Der Signalweg von der TRPM3-Stimulation bis zur Transkription des IL-8-Gens ist in Abbildung 33 dargestellt.

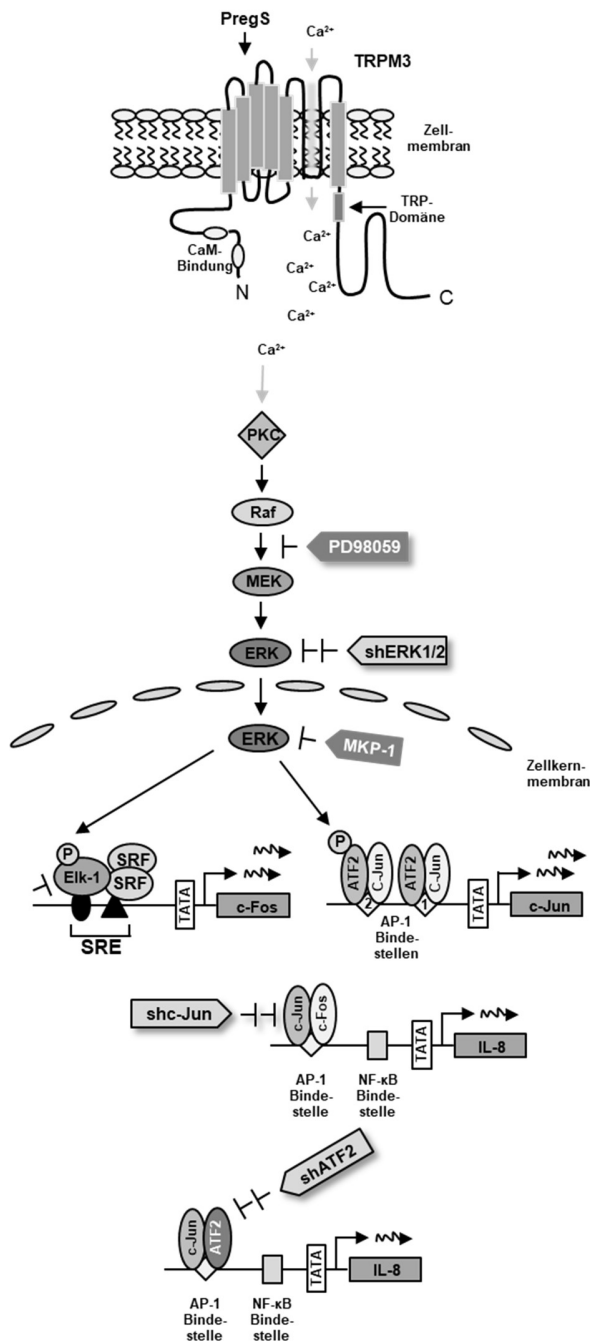


Abbildung 33 Signalkaskade, die die Aktivierung von TRPM3-Kanälen durch PregS mit der IL-8-Gentranskription verbindet. TRPM3-Kanäle werden durch Pregnenolonsulfat aktiviert. Die zytosolische Ca²⁺-Konzentration wird durch einen Einstrom von Ca²⁺-Ionen von außen in die Zellen erhöht. Dieser Anstieg des

intrazellulären Ca^{2+} löst die Aktivierung von ERK1/2 aus, die anschließend in den Zellkern transloziert wird. Die Phosphorylierung und Aktivierung von ERK1/2 ist in Gegenwart der Verbindung PD98059 beeinträchtigt. Die Expression von short hairpin RNAs, spezifisch für ERK1 und ERK2, reduziert die Konzentration dieser Kinasen im Zytosol. Im Kern dephosphoryliert und inaktiviert MKP-1 ERK1/2. Das nukleäre ERK1/2 aktiviert die Transkription der c-Jun- und c-Fos-Gene, was zu einer Hochregulierung der Biosynthese beider Transkriptionsfaktoren führt, die den AP-1-Transkriptionsfaktorkomplex bilden. Zusätzlich werden c-Jun, c-Fos und ATF2 phosphoryliert, was zu einer Hochregulation ihrer Transkriptionsaktivierungspotenziale führt. AP-1, entweder als c-Jun/c-Fos-Dimer oder als c-Jun/ATF2-Dimer, bindet an die AP-1-Bindestelle innerhalb des IL-8-Gens und aktiviert dessen Transkription.

5. Ausblick

Die Entdeckung von Pregnenolonsulfat als ein Ligand von TRPM3-Kanälen hat die Forschung, die Signaltransduktion und Funktion von TRPM3 untersucht, verstärkt. Neuartige synthetische Agonisten und Antagonisten sowie von Pflanzen abgeleitete TRPM3-Blocker erweitern den Werkzeugkasten zur Analyse der TRPM3-Kanalfunktion. Darüber hinaus ist das TRPM3-defiziente transgene Mausmodell ein ausgezeichnetes In-vivo-Testsystem für die vorgeschlagenen Funktionen von TRPM3-Kanälen. Die am besten charakterisierte Funktion der TRPM3-Kanäle beruht auf ihrer Rolle als Nozizeptor-Kanäle im somatosensorischen System, das bei der Übertragung akuter und chronischer Schmerzen eine Rolle spielt. In somatosensorischen Neuronen arbeiten TRPM3-Kanäle zusammen mit TRPV1-Kanälen beim Nachweis schädlicher Hitze. Während TRPV1-Antagonisten schwere Nebenwirkungen einschließlich der Induktion von Hyperthermie haben, wurde gezeigt, dass die Verabreichung von TRPM3-hemmenden Flavanonen die Reaktion auf schädliche Hitze in Mäusen abschwächt, ohne die Körperkerntemperatur zu verändern (Straub et al., 2013a). In Übereinstimmung damit wurde bei Mäusen nach subkutaner Injektion von Pregnenolonsulfat keine Hyperthermie induziert (Vriens et al., 2011). Basierend auf diesen Tatsachen wurde postuliert, dass TRPM3 ein wichtiges therapeutisches Ziel für eine analgetische Therapie ist, wobei die nachteiligen Wirkungen von TRPV1-Inhibitoren vermieden werden (Straub et al., 2013a; Held et al., 2015a). Aus diesem Grund werden dringend spezielle TRPM3-Kanalblocker benötigt. Diese Verbindungen wären auch wertvolle Werkzeuge, um die Funktion von TRPM3-Kanälen in anderen Geweben und Zelltypen in vivo aufzuklären. Von besonderem Interesse wäre die Aufklärung von TRPM3 als neues Ziel in der Tumorthherapie, wie bereits vorgeschlagen wurde (Cost and Czyzyk-Krzeska, 2015). Auf molekularer Ebene wurde gezeigt, dass die Stimulation von TRPM3-Kanälen Stimulus-responsive Transkriptionsfaktoren aktiviert, die die Transkription von nachgeschalteten Zielgenen wie dem Pdx-1-kodierenden Gen in pankreatischen Betazellen und dem CGRP-Gen in somatosensorischen Neuronen hochregulieren. Ein Ziel für zukünftige Forschungen wäre die Identifizierung von Zielgenen in TRPM3-exprimierenden Geweben. Diese Strategie wird helfen, neue gewebespezifische Funktionen von TRPM3-Kanälen zu entschlüsseln.

6. Literaturverzeichnis

1. Al-Sarraj, A., Day, R.M., and Thiel, G. (2005). Specificity of transcriptional regulation by the zinc finger transcription factors Sp1, Sp3, and Egr-1. *Journal of cellular biochemistry* 94, 153-167.
2. Angel, P., and Karin, M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochimica et biophysica acta* 1072, 129-157.
3. Arnette, D., Gibson, T.B., Lawrence, M.C., January, B., Khoo, S., McGlynn, K., Vanderbilt, C.A., and Cobb, M.H. (2003). Regulation of ERK1 and ERK2 by glucose and peptide hormones in pancreatic beta cells. *The Journal of biological chemistry* 278, 32517-32525.
4. Bauer, I., Al Sarraj, J., Vinson, C., Larsen, R., and Thiel, G. (2007). Interleukin-1beta and tetradecanoylphorbol acetate-induced biosynthesis of tumor necrosis factor alpha in human hepatoma cells involves the transcription factors ATF2 and c-Jun and stress-activated protein kinases. *Journal of cellular biochemistry* 100, 242-255.
5. Behrens, M.M., Strasser, U., Koh, J.Y., Gwag, B.J., and Choi, D.W. (1999). Prevention of neuronal apoptosis by phorbol ester-induced activation of protein kinase C: blockade of p38 mitogen-activated protein kinase. *Neuroscience* 94, 917-927.
6. Benbrook, D.M., and Jones, N.C. (1994). Different binding specificities and transactivation of variant CRE's by CREB complexes. *Nucleic acids research* 22, 1463-1469.
7. Besnard, A., Galan-Rodriguez, B., Vanhoutte, P., and Caboche, J. (2011). Elk-1 a transcription factor with multiple facets in the brain. *Frontiers in neuroscience* 5, 35.
8. Bohmann, D., Bos, T.J., Admon, A., Nishimura, T., Vogt, P.K., and Tjian, R. (1987). Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science (New York, N.Y.)* 238, 1386-1392.
9. Brat, D.J., Bellail, A.C., and van Meir, E.G. (2005). The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro-oncology* 7, 122-133.
10. Brown, R.L., Xiong, W.-H., Peters, J.H., Tekmen-Clark, M., Strycharska-Orczyk, I., Reed, B.T., Morgans, C.W., and Duvoisin, R.M. (2015). TRPM3 expression in mouse retina. *PloS one* 10, e0117615.
11. Burns, J.C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M., and Yee, J.K. (1993). Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 8033-8037.

12. Cahill MA, Janknecht R, Nordheim A (1995). Signal uptake by the c-fos serum response element. In *Inducible gene expression Vol 2*. Ed Baeuerle PA, Birkhäuser, Boston/Basel/Berlin, pp 39-72.
13. Cameron, K., Bartle, E., Roark, R., Fanelli, D., Pham, M., Pollard, B., Borkowski, B., Rhoads, S., Kim, J., and Rocha, M., et al. (2012). Neurosteroid binding to the amino terminal and glutamate binding domains of ionotropic glutamate receptors. *Steroids* 77, 774-779.
14. Carlezon, W.A., Duman, R.S., and Nestler, E.J. (2005). The many faces of CREB. *Trends in neurosciences* 28, 436-445.
15. Chang, L., and Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37-40.
16. Chen, L., Cai, W., Chen, L., Zhou, R., Furuya, K., and Sokabe, M. (2010). Modulatory metaplasticity induced by pregnenolone sulfate in the rat hippocampus: a leftward shift in LTP/LTD-frequency curve. *Hippocampus* 20, 499-512.
17. Chiu, R., Boyle, W.J., Meek, J., Smeal, T., Hunter, T., and Karin, M. (1988). The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* 54, 541-552.
18. Choi, K.-C., Lee, Y.S., Lim, S., Choi, H.K., Lee, C.-H., Lee, E.-K., Hong, S., Kim, I.-H., Kim, S.-J., and Park, S.H. (2006). Smad6 negatively regulates interleukin 1-receptor-Toll-like receptor signaling through direct interaction with the adaptor Pellino-1. *Nature immunology* 7, 1057-1065.
19. Chrivia, J.C., Kwok, R.P., Lamb, N., Hagiwara, M., Montminy, M.R., and Goodman, R.H. (1993). Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 365, 855-859.
20. Ciurtin, C., Majeed, Y., Naylor, J., Sukumar, P., English, A.A., Emery, P., and Beech, D.J. (2010). TRPM3 channel stimulated by pregnenolone sulphate in synovial fibroblasts and negatively coupled to hyaluronan. *BMC Musculoskeletal Disorders* 11, 111.
21. Clapham, D.E., Runnels, L.W., and Strübing, C. (2001). The TRP ion channel family. *Nature reviews. Neuroscience* 2, 387-396.
22. Cost, N.G., and Czyzyk-Krzeska, M.F. (2015). Regulation of autophagy by two products of one gene: TRPM3 and miR-204. *Molecular & cellular oncology* 2, e1002712.
23. Cruzalegui, F.H., Hardingham, G.E., and Bading, H. (1999). c-Jun functions as a calcium-regulated transcriptional activator in the absence of JNK/SAPK1 activation. *The EMBO Journal* 18, 1335-1344.
24. Curran, T., and Franza, B.R. (1988). Fos and Jun: the AP-1 connection. *Cell* 55, 395-397.

25. Deisseroth, K., Heist, E.K., and Tsien, R.W. (1998). Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons. *Nature* 392, 198-202.
26. Déríjard, B., Hibi, M., Wu, I.H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M., and Davis, R.J. (1994). JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76, 1025-1037.
27. Dixit, V.M., Marks, R.M., Sarma, V., and Prochownik, E.V. (1989). The antimitogenic action of tumor necrosis factor is associated with increased AP-1/c-jun proto-oncogene transcription. *The Journal of biological chemistry* 264, 16905-16909.
28. Dolmetsch, R.E., Pajvani, U., Fife, K., Spotts, J.M., and Greenberg, M.E. (2001). Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science (New York, N.Y.)* 294, 333-339.
29. Duan, L., and Cobb, M.H. (2010). Calcineurin increases glucose activation of ERK1/2 by reversing negative feedback. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 22314-22319.
30. DuBridge, R.B., Tang, P., Hsia, H.C., Leong, P.M., Miller, J.H., and Calos, M.P. (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Molecular and cellular biology* 7, 379-387.
31. Eferl, R., and Wagner, E.F. (2003). AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nature reviews. Cancer* 3, 859-868.
32. Ekici, M., Keim, A., Rössler, O.G., Hohl, M., and Thiel, G. (2012). Chromatin structure and expression of the AMPA receptor subunit Glur2 in human glioma cells: major regulatory role of REST and Sp1. *Journal of cellular biochemistry* 113, 528-543.
33. Ely, H.A., Mellon, P.L., and Coss, D. (2011). GnRH induces the c-Fos gene via phosphorylation of SRF by the calcium/calmodulin kinase II pathway. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 25, 669-680.
34. Fisch, T.M., Prywes, R., and Roeder, R.G. (1989). An AP1-binding site in the c-fos gene can mediate induction by epidermal growth factor and 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate. *Molecular and cellular biology* 9, 1327-1331.
35. Freund, A., Jolivel, V., Durand, S., Kersual, N., Chalbos, D., Chavey, C., Vignon, F., and Lazennec, G. (2004). Mechanisms underlying differential expression of interleukin-8 in breast cancer cells. *Oncogene* 23, 6105-6114.
36. Frühwald, J., Camacho Londoño, J., Dembla, S., Mannebach, S., Lis, A., Drews, A., Wissenbach, U., Oberwinkler, J., and Philipp, S.E. (2012). Alternative splicing of a protein domain indispensable for function of transient receptor potential melastatin 3 (TRPM3) ion channels. *The Journal of biological chemistry* 287, 36663-36672.

37. Gabellini, C., Castellini, L., Trisciuglio, D., Kracht, M., Zupi, G., and Del Bufalo, D. (2008). Involvement of nuclear factor-kappa B in bcl-xL-induced interleukin 8 expression in glioblastoma. *Journal of Neurochemistry* 107, 871-882.
38. Gallin, W.J., and Greenberg, M.E. (1995). Calcium regulation of gene expression in neurons: the mode of entry matters. *Current opinion in neurobiology* 5, 367-374.
39. Gille, H., Sharrocks, A.D., and Shaw, P.E. (1992). Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter. *Nature* 358, 414-417.
40. Glidewell-Kenney, C.A., Trang, C., Shao, P.P., Gutierrez-Reed, N., Uzo-Okereke, A.M., Coss, D., and Mellon, P.L. (2014). Neurokinin B induces c-fos transcription via protein kinase C and activation of serum response factor and Elk-1 in immortalized GnRH neurons. *Endocrinology* 155, 3909-3919.
41. Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology* 36, 59-74.
42. Grimm, C., Kraft, R., Sauerbruch, S., Schultz, G., and Harteneck, C. (2003). Molecular and functional characterization of the melastatin-related cation channel TRPM3. *The Journal of biological chemistry* 278, 21493-21501.
43. Gupta, S., Campbell, D., Dérijard, B., and Davis, R.J. (1995). Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science (New York, N.Y.)* 267, 389-393.
44. Hai, T., and Curran, T. (1991). Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 3720-3724.
45. Hall, D.P., Cost, N.G., Hegde, S., Kellner, E., Mikhaylova, O., Stratton, Y., Ehmer, B., Abplanalp, W.A., Pandey, R., and Biesiada, J., et al. (2014). TRPM3 and miR-204 establish a regulatory circuit that controls oncogenic autophagy in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer cell* 26, 738-753.
46. Ham, J., Eilers, A., Whitfield, J., Neame, S.J., and Shah, B. (2000). c-Jun and the transcriptional control of neuronal apoptosis. *Biochemical pharmacology* 60, 1015-1021.
47. Hardingham, G.E., Chawla, S., Johnson, C.M., and Bading, H. (1997). Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature* 385, 260-265.
48. Hashiramoto, A., Mizukami, H., and Yamashita, T. (2006). Ganglioside GM3 promotes cell migration by regulating MAPK and c-Fos/AP-1. *Oncogene* 25, 3948-3955.
49. Held, K., Kichko, T., Clercq, K. de, Klaassen, H., van Bree, R., Vanherck, J.-C., Marchand, A., Reeh, P.W., Chaltin, P., and Voets, T., et al. (2015a). Activation of TRPM3 by a potent

- synthetic ligand reveals a role in peptide release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, E1363-72.
50. Held, K., Voets, T., and Vriens, J. (2015b). TRPM3 in temperature sensing and beyond. *Temperature (Austin, Tex.)* 2, 201-213.
51. Hill, C.S., Marais, R., John, S., Wynne, J., Dalton, S., and Treisman, R. (1993). Functional analysis of a growth factor-responsive transcription factor complex. *Cell* 73, 395-406.
52. Hill, C.S., and Treisman, R. (1995). Differential activation of c-fos promoter elements by serum, lysophosphatidic acid, G proteins and polypeptide growth factors. *The EMBO Journal* 14, 5037-5047.
53. Hill, C.S., Wynne, J., and Treisman, R. (1994). Serum-regulated transcription by serum response factor (SRF): a novel role for the DNA binding domain. *The EMBO Journal* 13, 5421-5432.
54. Hipskind, R.A., and Nordheim, A. (1991). In vitro transcriptional analysis of the human c-fos proto-oncogene. *The Journal of biological chemistry* 266, 19572-19582.
55. Hirai, S., and Yaniv, M. (1989). Jun DNA-binding is modulated by mutations between the leucines or by direct interaction of fos with the TGACTCA sequence. *The New biologist* 1, 181-191.
56. Holakovska, B., Grycova, L., Jirku, M., Sulc, M., Bumba, L., and Teisinger, J. (2012). Calmodulin and S100A1 protein interact with N terminus of TRPM3 channel. *The Journal of biological chemistry* 287, 16645-16655.
57. Holendova, B., Grycova, L., Jirku, M., and Teisinger, J. (2012). PtdIns(4,5)P2 interacts with CaM binding domains on TRPM3 N-terminus. *Channels (Austin, Tex.)* 6, 479-482.
58. Hong, S.-K., Yoon, S., Moelling, C., Arthan, D., and Park, J.-I. (2009). Noncatalytic Function of ERK1/2 Can Promote Raf/MEK/ERK-mediated Growth Arrest Signaling*. *The Journal of biological chemistry* 284, 33006-33018.
59. Hurst, H.C. (1995). Transcription factors 1: bZIP proteins. *Protein profile* 2, 101-168.
60. Islam, M.S. (2011). TRP channels of islets. *Advances in experimental medicine and biology* 704, 811-830.
61. Jang, M.-K., Mierke, D.F., Russek, S.J., and Farb, D.H. (2004). A steroid modulatory domain on NR2B controls N-methyl-D-aspartate receptor proton sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 8198-8203.
62. Johannessen, M., Delghandi, M.P., Seternes, O.M., Johansen, B., and Moens, U. (2004). Synergistic activation of CREB-mediated transcription by forskolin and phorbol ester requires PKC and depends on the glutamine-rich Q2 transactivation domain. *Cellular signalling* 16, 1187-1199.

63. Johnson, C.M., Hill, C.S., Chawla, S., Treisman, R., and Bading, H. (1997). Calcium controls gene expression via three distinct pathways that can function independently of the Ras/mitogen-activated protein kinases (ERKs) signaling cascade. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 17, 6189-6202.
64. Johnson, P.F., Landschulz, W.H., Graves, B.J., and McKnight, S.L. (1987). Identification of a rat liver nuclear protein that binds to the enhancer core element of three animal viruses. *Genes & development* 1, 133-146.
65. Kar, P., and Parekh, A.B. (2015). Distinct spatial Ca²⁺ signatures selectively activate different NFAT transcription factor isoforms. *Molecular cell* 58, 232-243.
66. Karin, M. (1995). The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *The Journal of biological chemistry* 270, 16483-16486.
67. Karin, M., Liu, Z.g., and Zandi, E. (1997). AP-1 function and regulation. *Current opinion in cell biology* 9, 240-246.
68. Kasza, A. (2013). Signal-dependent Elk-1 target genes involved in transcript processing and cell migration. *Biochimica et biophysica acta* 1829, 1026-1033.
69. Kaufmann, A., Keim, A., and Thiel, G. (2013). Regulation of immediate-early gene transcription following activation of Gα(q)-coupled designer receptors. *Journal of cellular biochemistry* 114, 681-696.
70. Kazi, J.U., and Soh, J.-W. (2008). Induction of the nuclear proto-oncogene c-fos by the phorbol ester TPA and v-H-Ras. *Molecules and cells* 26, 462-467.
71. Klose, C., Straub, I., Riehle, M., Ranta, F., Krautwurst, D., Ullrich, S., Meyerhof, W., and Harteneck, C. (2011). Fenamates as TRP channel blockers: mefenamic acid selectively blocks TRPM3. *British journal of pharmacology* 162, 1757-1769.
72. Kobayashi, T., Washiyama, K., and Ikeda, K. (2009). Pregnenolone sulfate potentiates the inwardly rectifying K channel Kir2.3. *PLoS one* 4, e6311.
73. Koga, K., Takaesu, G., Yoshida, R., Nakaya, M., Kobayashi, T., Kinjyo, I., and Yoshimura, A. (2009). Cyclic adenosine monophosphate suppresses the transcription of proinflammatory cytokines via the phosphorylated c-Fos protein. *Immunity* 30, 372-383.
74. Kohan, D.E. (2008). Progress in gene targeting: using mutant mice to study renal function and disease. *Kidney international* 74, 427-437.
75. Kostakis, E., Jang, M.-K., Russek, S.J., Gibbs, T.T., and Farb, D.H. (2011). A steroid modulatory domain in NR2A collaborates with NR1 exon-5 to control NMDAR modulation by pregnenolone sulfate and protons. *Journal of Neurochemistry* 119, 486-496.
76. Krügel, U., Straub, I., Beckmann, H., and Schaefer, M. (2017). Primidone inhibits TRPM3 and attenuates thermal nociception in vivo. *Pain* 158, 856-867.

77. Kuwahara, K., Wang, Y., McAnally, J., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., Hill, J.A., and Olson, E.N. (2006). TRPC6 fulfills a calcineurin signaling circuit during pathologic cardiac remodeling. *The Journal of clinical investigation* 116, 3114-3126.
78. Kwok, R.P., Lundblad, J.R., Chrivia, J.C., Richards, J.P., Bächinger, H.P., Brennan, R.G., Roberts, S.G., Green, M.R., and Goodman, R.H. (1994). Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* 370, 223-226.
79. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
80. Lamph, W.W., Wamsley, P., Sassone-Corsi, P., and Verma, I.M. (1988). Induction of proto-oncogene JUN/AP-1 by serum and TPA. *Nature* 334, 629-631.
81. Landschulz, W.H., Johnson, P.F., and McKnight, S.L. (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science (New York, N.Y.)* 240, 1759-1764.
82. Lee, G., and Gilman, M. (1994). Dual modes of control of c-fos mRNA induction by intracellular calcium in T cells. *Molecular and cellular biology* 14, 4579-4587.
83. Lee, N., Chen, J., Sun, L., Wu, S., Gray, K.R., Rich, A., Huang, M., Lin, J.-H., Feder, J.N., and Janovitz, E.B., et al. (2003). Expression and characterization of human transient receptor potential melastatin 3 (hTRPM3). *The Journal of biological chemistry* 278, 20890-20897.
84. Lesch, A., Hui, X., Lipp, P., and Thiel, G. (2015). Transient receptor potential melastatin-3 (TRPM3)-induced activation of AP-1 requires Ca²⁺ ions and the transcription factors c-Jun, ATF2, and ternary complex factor. *Molecular pharmacology* 87, 617-628.
85. Lesch, A., Rössler, O.G., and Thiel, G. (2017). Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase, c-Jun N-Terminal Protein Kinase, and Calcineurin Regulate Transient Receptor Potential M3 (TRPM3) Induced Activation of AP-1. *Journal of cellular biochemistry* 118, 2409-2419.
86. Lesch, A., Rubil, S., and Thiel, G. (2014). Activation and inhibition of transient receptor potential TRPM3-induced gene transcription. *British journal of pharmacology* 171, 2645-2658.
87. Li, A., Dubey, S., Varney, M.L., Dave, B.J., and Singh, R.K. (2003). IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 170, 3369-3376.
88. Li, J., Kartha, S., Iasovskaia, S., Tan, A., Bhat, R.K., Manaligod, J.M., Page, K., Brasier, A.R., and Hershenov, M.B. (2002). Regulation of human airway epithelial cell IL-8 expression by MAP kinases. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 283, L690-9.

89. Ling, Y., West, A.G., Roberts, E.C., Lakey, J.H., and Sharrocks, A.D. (1998). Interaction of transcription factors with serum response factor. Identification of the Elk-1 binding surface. *The Journal of biological chemistry* 273, 10506-10514.
90. Liu, Q., Li, A., Tian, Y., Wu, J.D., Liu, Y., Li, T., Chen, Y., Han, X., and Wu, K. (2016). The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer. *Cytokine & growth factor reviews* 31, 61-71.
91. Livingstone, C., Patel, G., and Jones, N. (1995). ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain. *The EMBO Journal* 14, 1785-1797.
92. Lois, C., Hong, E.J., Pease, S., Brown, E.J., and Baltimore, D. (2002). Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science (New York, N.Y.)* 295, 868-872.
93. Majeed, Y., Agarwal, A.K., Naylor, J., Seymour, V.A.L., Jiang, S., Muraki, K., Fishwick, C.W.G., and Beech, D.J. (2010). Cis-isomerism and other chemical requirements of steroidal agonists and partial agonists acting at TRPM3 channels. *British journal of pharmacology* 161, 430-441.
94. Majeed, Y., Bahnasi, Y., Seymour, V.A.L., Wilson, L.A., Milligan, C.J., Agarwal, A.K., Sukumar, P., Naylor, J., and Beech, D.J. (2011). Rapid and contrasting effects of rosiglitazone on transient receptor potential TRPM3 and TRPC5 channels. *Molecular pharmacology* 79, 1023-1030.
95. Majeed, Y., Tumova, S., Green, B.L., Seymour, V.A.L., Woods, D.M., Agarwal, A.K., Naylor, J., Jiang, S., Picton, H.M., and Porter, K.E., et al. (2012). Pregnenolone sulphate-independent inhibition of TRPM3 channels by progesterone. *Cell calcium* 51, 1-11.
96. Mayer, S.I., Mannebach, S., Endo, T., and Thiel, G. (2011). Signal transduction of pregnenolone sulfate in insulinoma cells: activation of Egr-1 expression involving TRPM3, voltage-gated calcium channels, ERK, and ternary complex factors. *The Journal of biological chemistry* 286, 10084-10096.
97. Mayer, S.I., and Thiel, G. (2009). Calcium influx into MIN6 insulinoma cells induces expression of Egr-1 involving extracellular signal-regulated protein kinase and the transcription factors Elk-1 and CREB. *European journal of cell biology* 88, 19-33.
98. McBride, K., and Nemer, M. (1998). The C-terminal domain of c-fos is required for activation of an AP-1 site specific for jun-fos heterodimers. *Molecular and cellular biology* 18, 5073-5081.
99. Misra, R.P., Bonni, A., Miranti, C.K., Rivera, V.M., Sheng, M., and Greenberg, M.E. (1994). L-type voltage-sensitive calcium channel activation stimulates gene expression by a serum response factor-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry* 269, 25483-25493.
100. Montminy, M.R., and Bilezikjian, L.M. (1987). Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature* 328, 175-178.

101. Montminy, M.R., Sevarino, K.A., Wagner, J.A., Mandel, G., and Goodman, R.H. (1986). Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 6682-6686.
102. Morgan, J.I., and Curran, T. (1991). Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annual review of neuroscience* 14, 421-451.
103. Müller, I., Endo, T., and Thiel, G. (2010). Regulation of AP-1 activity in glucose-stimulated insulinoma cells. *Journal of cellular biochemistry* 110, 1481-1494.
104. Müller, I., Lipp, P., and Thiel, G. (2012). Ca²⁺ signaling and gene transcription in glucose-stimulated insulinoma cells. *Cell calcium* 52, 137-151.
105. Müller, I., Rössler, O.G., and Thiel, G. (2011a). Pregnenolone sulfate activates basic region leucine zipper transcription factors in insulinoma cells: role of voltage-gated Ca²⁺ channels and transient receptor potential melastatin 3 channels. *Molecular pharmacology* 80, 1179-1189.
106. Naldini, L., Blömer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M., and Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science (New York, N.Y.)* 272, 263-267.
107. Naylor, J., Li, J., Milligan, C.J., Zeng, F., Sukumar, P., Hou, B., Sedo, A., Yuldasheva, N., Majeed, Y., and Beri, D., et al. (2010). Pregnenolone sulphate- and cholesterol-regulated TRPM3 channels coupled to vascular smooth muscle secretion and contraction. *Circulation research* 106, 1507-1515.
108. Naylor, J., Milligan, C.J., Zeng, F., Jones, C., and Beech, D.J. (2008). Production of a specific extracellular inhibitor of TRPM3 channels. *British journal of pharmacology* 155, 567-573.
109. Nilius, B., and Flockerzi, V. (2014). Mammalian transient receptor potential (TRP) cation channels. Preface. *Handbook of experimental pharmacology* 223, v-vi.
110. Ning, Y., Manegold, P.C., Hong, Y.K., Zhang, W., Pohl, A., Lurje, G., Winder, T., Yang, D., LaBonte, M.J., and Wilson, P.M., et al. (2011). Interleukin-8 is associated with proliferation, migration, angiogenesis and chemosensitivity in vitro and in vivo in colon cancer cell line models. *International journal of cancer* 128, 2038-2049.
111. Nishizuka, Y. (1984). The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 308, 693-698.
112. Nomura, N., Zu, Y.L., Maekawa, T., Tabata, S., Akiyama, T., and Ishii, S. (1993). Isolation and characterization of a novel member of the gene family encoding the cAMP response element-binding protein CRE-BP1. *The Journal of biological chemistry* 268, 4259-4266.

113. Parker, D., Ferreri, K., Nakajima, T., LaMorte, V.J., Evans, R., Koerber, S.C., Hoeger, C., and Montminy, M.R. (1996). Phosphorylation of CREB at Ser-133 induces complex formation with CREB-binding protein via a direct mechanism. *Molecular and cellular biology* 16, 694-703.
114. Pawson, C.T., and Scott, J.D. (2010). Signal integration through blending, bolstering and bifurcating of intracellular information. *Nature structural & molecular biology* 17, 653-658.
115. Pedersen, S.F., Owsianik, G., and Nilius, B. (2005). TRP channels: an overview. *Cell calcium* 38, 233-252.
116. Przibilla, J., Dembla, S., Rizun, O., Lis, A., Jung, M., Oberwinkler, J., Beck, A., and Philipp, S.E. (2018). Ca²⁺-dependent regulation and binding of calmodulin to multiple sites of Transient Receptor Potential Melastatin 3 (TRPM3) ion channels. *Cell calcium* 73, 40-52.
117. Pulverer, B.J., Kyriakis, J.M., Avruch, J., Nikolakaki, E., and Woodgett, J.R. (1991). Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* 353, 670-674.
118. Radhakrishnan, I., Pérez-Alvarado, G.C., Parker, D., Dyson, H.J., Montminy, M.R., and Wright, P.E. (1997). Solution structure of the KIX domain of CBP bound to the transactivation domain of CREB: a model for activator: coactivator interactions. *Cell* 91, 741-752.
119. Rajadhyaksha, A., Barczak, A., Macías, W., Leveque, J.-C., Lewis, S.E., and Konradi, C. (1999). L-Type Ca²⁺ Channels Are Essential for Glutamate-Mediated CREB Phosphorylation and c-fos Gene Expression in Striatal Neurons. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 19, 6348-6359.
120. Rauscher, F.J., Sambucetti, L.C., Curran, T., Distel, R.J., and Spiegelman, B.M. (1988). Common DNA binding site for Fos protein complexes and transcription factor AP-1. *Cell* 52, 471-480.
121. Reddy, S.P.M., and Mossman, B.T. (2002). Role and regulation of activator protein-1 in toxicant-induced responses of the lung. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 283, L1161-78.
122. Rivera, V.M., Miranti, C.K., Misra, R.P., Ginty, D.D., Chen, R.H., Blenis, J., and Greenberg, M.E. (1993). A growth factor-induced kinase phosphorylates the serum response factor at a site that regulates its DNA-binding activity. *Molecular and cellular biology* 13, 6260-6273.
123. Roesler, W.J., Vandenbark, G.R., and Hanson, R.W. (1988). Cyclic AMP and the induction of eukaryotic gene transcription. *The Journal of biological chemistry* 263, 9063-9066.
124. Rössler, O.G., Henss, I., and Thiel, G. (2008). Transcriptional response to muscarinic acetylcholine receptor stimulation: regulation of Egr-1 biosynthesis by ERK, Elk-1, MKP-1, and calcineurin in carbachol-stimulated human neuroblastoma cells. *Archives of biochemistry and biophysics* 470, 93-102.

125. Rössler, O.G., and Thiel, G. (2009). Thrombin induces Egr-1 expression in fibroblasts involving elevation of the intracellular Ca^{2+} concentration, phosphorylation of ERK and activation of ternary complex factor. *BMC molecular biology* 10, 40.
126. Rubinson, D.A., Dillon, C.P., Kwiatkowski, A.V., Sievers, C., Yang, L., Kopinja, J., Rooney, D.L., Zhang, M., Ihrig, M.M., and McManus, M.T., et al. (2003). A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nature genetics* 33, 401-406.
127. Rusnak, F., and Mertz, P. (2000). Calcineurin: form and function. *Physiological reviews* 80, 1483-1521.
128. Ryseck, R.P., and Bravo, R. (1991). c-JUN, JUN B, and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of FOS proteins. *Oncogene* 6, 533-542.
129. Sághy, É., Szőke, É., Payrits, M., Helyes, Z., Börzsei, R., Erostyák, J., Jánosi, T.Z., Sétáló, G., and Szolcsányi, J. (2015). Evidence for the role of lipid rafts and sphingomyelin in Ca^{2+} -gating of Transient Receptor Potential channels in trigeminal sensory neurons and peripheral nerve terminals. *Pharmacological research* 100, 101-116.
130. Sassone-Corsi, P., Ransone, L.J., and Verma, I.M. (1990). Cross-talk in signal transduction: TPA-inducible factor jun/AP-1 activates cAMP-responsive enhancer elements. *Oncogene* 5, 427-431.
131. Schiller, M., Böhm, M., Dennler, S., Ehrchen, J.M., and Mauviel, A. (2006). Mitogen- and stress-activated protein kinase 1 is critical for interleukin-1-induced, CREB-mediated, c-fos gene expression in keratinocytes. *Oncogene* 25, 4449-4457.
132. Schteingart, D.E., Giordano, T.J., Benitez, R.S., Burdick, M.D., Starkman, M.N., Arenberg, D.A., and Strieter, R.M. (2001). Overexpression of CXC chemokines by an adrenocortical carcinoma: a novel clinical syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86, 3968-3974.
133. Shapiro, P.S., and Ahn, N.G. (1998). Feedback regulation of Raf-1 and mitogen-activated protein kinase (MAP) kinase kinases 1 and 2 by MAP kinase phosphatase-1 (MKP-1). *The Journal of biological chemistry* 273, 1788-1793.
134. Sharrocks, A.D. (2001). The ETS-domain transcription factor family. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2, 827-837.
135. Shaulian, E., and Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nature cell biology* 4, E131-6.

136. Shaw, P.E., and Saxton, J. (2003). Ternary complex factors: prime nuclear targets for mitogen-activated protein kinases. *The international journal of biochemistry & cell biology* 35, 1210-1226.
137. Sheng, M., McFadden, G., and Greenberg, M.E. (1990). Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron* 4, 571-582.
138. Sheng, M., Thompson, M.A., and Greenberg, M.E. (1991). CREB: a Ca²⁺-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science (New York, N.Y.)* 252, 1427-1430.
139. Sieber, M., Karanik, M., Brandt, C., Blex, C., Podtschaske, M., Erdmann, F., Rost, R., Serfling, E., Liebscher, J., and Pätzelt, M., et al. (2007). Inhibition of calcineurin-NFAT signaling by the pyrazolopyrimidine compound NCI3. *European journal of immunology* 37, 2617-2626.
140. Sirven, A., Pflumio, F., Zennou, V., Titeux, M., Vainchenker, W., Coulombel, L., Dubart-Kupperschmitt, A., and Charneau, P. (2000). The human immunodeficiency virus type-1 central DNA flap is a crucial determinant for lentiviral vector nuclear import and gene transduction of human hematopoietic stem cells. *Blood* 96, 4103-4110.
141. Slack, D.N., Seternes, O.M., Gabrielsen, M., and Keyse, S.M. (2001). Distinct binding determinants for ERK2/p38alpha and JNK map kinases mediate catalytic activation and substrate selectivity of map kinase phosphatase-1. *The Journal of biological chemistry* 276, 16491-16500.
142. Smeal, T., Binetruy, B., Mercola, D.A., Birrer, M., and Karin, M. (1991). Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature* 354, 494-496.
143. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry* 150, 76-85.
144. Soni, H., and Adebisi, A. (2016). TRPC6 channel activation promotes neonatal glomerular mesangial cell apoptosis via calcineurin/NFAT and FasL/Fas signaling pathways. *Scientific Reports* 6.
145. Spohn, D., Rössler, O.G., Philipp, S.E., Raubuch, M., Kitajima, S., Griesemer, D., Hoth, M., and Thiel, G. (2010). Thapsigargin induces expression of activating transcription factor 3 in human keratinocytes involving Ca²⁺ ions and c-Jun N-terminal protein kinase. *Molecular pharmacology* 78, 865-876.
146. Stefano, L., Al Sarraj, J., Rössler, O.G., Vinson, C., and Thiel, G. (2006). Up-regulation of tyrosine hydroxylase gene transcription by tetradecanoylphorbol acetate is mediated by the

- transcription factors Ets-like protein-1 (Elk-1) and Egr-1. *Journal of Neurochemistry* 97, 92-104.
147. Stefano, L., Rössler, O.G., Griesemer, D., Hoth, M., and Thiel, G. (2007a). P2X(7) receptor stimulation upregulates Egr-1 biosynthesis involving a cytosolic Ca²⁺ rise, transactivation of the EGF receptor and phosphorylation of ERK and Elk-1. *Journal of cellular physiology* 213, 36-44.
148. Stefano, L., Rössler, O.G., Griesemer, D., Hoth, M., and Thiel, G. (2007b). P2X(7) receptor stimulation upregulates Egr-1 biosynthesis involving a cytosolic Ca²⁺ rise, transactivation of the EGF receptor and phosphorylation of ERK and Elk-1. *Journal of cellular physiology* 213, 36-44.
149. Steinmüller, L., Cibelli, G., Moll, J.R., Vinson, C., and Thiel, G. (2001). Regulation and composition of activator protein 1 (AP-1) transcription factors controlling collagenase and c-Jun promoter activities. *Biochemical Journal* 360, 599-607.
150. Steinmüller, L., and Thiel, G. (2003). Regulation of gene transcription by a constitutively active mutant of activating transcription factor 2 (ATF2). *Biological chemistry* 384, 667-672.
151. Straub, I., Krügel, U., Mohr, F., Teichert, J., Rizun, O., Konrad, M., Oberwinkler, J., and Schaefer, M. (2013a). Flavanones that selectively inhibit TRPM3 attenuate thermal nociception in vivo. *Molecular pharmacology* 84, 736-750.
152. Straub, I., Mohr, F., Stab, J., Konrad, M., Philipp, S.E., Oberwinkler, J., and Schaefer, M. (2013b). Citrus fruit and fabacea secondary metabolites potently and selectively block TRPM3. *British journal of pharmacology* 168, 1835-1850.
153. Struthers, R.S., Vale, W.W., Arias, C., Sawchenko, P.E., and Montminy, M.R. (1991). Somatotroph hypoplasia and dwarfism in transgenic mice expressing a non-phosphorylatable CREB mutant. *Nature* 350, 622-624.
154. Subramaniam, D., Ramalingam, S., May, R., Dieckgraefe, B.K., Berg, D.E., Pothoulakis, C., Houchen, C.W., Wang, T.C., and Anant, S. (2008). Gastrin-mediated interleukin-8 and cyclooxygenase-2 gene expression: differential transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Gastroenterology* 134, 1070-1082.
155. Sugimoto, T., Stewart, S., and Guan, K.L. (1997). The calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin is the major Elk-1 phosphatase. *The Journal of biological chemistry* 272, 29415-29418.
156. Sun, P., Enslin, H., Myung, P.S., and Maurer, R.A. (1994). Differential activation of CREB by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. *Genes & development* 8, 2527-2539.

157. Takeda, J., Maekawa, T., Sudo, T., Seino, Y., Imura, H., Saito, N., Tanaka, C., and Ishii, S. (1991). Expression of the CRE-BP1 transcriptional regulator binding to the cyclic AMP response element in central nervous system, regenerating liver, and human tumors. *Oncogene* 6, 1009-1014.
158. Thiel, G., Al Sarraj, J., and Stefano, L. (2005). cAMP response element binding protein (CREB) activates transcription via two distinct genetic elements of the human glucose-6-phosphatase gene. *BMC molecular biology* 6, 2.
159. Thiel, G., Ekici, M., and Rössler, O.G. (2009). Regulation of cellular proliferation, differentiation and cell death by activated Raf. *Cell communication and signaling : CCS* 7, 8.
160. Thiel, G., Lesch, A., and Keim, A. (2012). Transcriptional response to calcium-sensing receptor stimulation. *Endocrinology* 153, 4716-4728.
161. Thiel, G., Mayer, S.I., Müller, I., Stefano, L., and Rössler, O.G. (2010). Egr-1-A Ca⁽²⁺⁾-regulated transcription factor. *Cell calcium* 47, 397-403.
162. Thiel, G., and Rössler, O.G. (2011). Immediate-early transcriptional response to angiotensin II in human adrenocortical cells. *Endocrinology* 152, 4211-4223.
163. Thiel, G., and Rössler, O.G. (2014). Resveratrol stimulates AP-1-regulated gene transcription. *Molecular nutrition & food research* 58, 1402-1413.
164. Thiel, G., and Rössler, O.G. (2017). Resveratrol regulates gene transcription via activation of stimulus-responsive transcription factors. *Pharmacological research* 117, 166-176.
165. Thiel, G., Lietz, M., and Cramer, M. (1998). Biological activity and modular structure of RE-1-silencing transcription factor (REST), a repressor of neuronal genes. *The Journal of biological chemistry* 273, 26891-26899.
166. Thompson, M.A., Ginty, D.D., Bonni, A., and Greenberg, M.E. (1995). L-type voltage-sensitive Ca²⁺ channel activation regulates c-fos transcription at multiple levels. *The Journal of biological chemistry* 270, 4224-4235.
167. Tian, J., and Karin, M. (1999). Stimulation of Elk1 transcriptional activity by mitogen-activated protein kinases is negatively regulated by protein phosphatase 2B (calcineurin). *The Journal of biological chemistry* 274, 15173-15180.
168. Treisman, R. (1995). Journey to the surface of the cell: Fos regulation and the SRE. *The EMBO Journal* 14, 4905-4913.
169. Treisman, R., Marais, R., and Wynne, J. (1992). Spatial flexibility in ternary complexes between SRF and its accessory proteins. *The EMBO Journal* 11, 4631-4640.
170. Tsai, E.Y., Jain, J., Pesavento, P.A., Rao, A., and Goldfeld, A.E. (1996). Tumor necrosis factor alpha gene regulation in activated T cells involves ATF-2/Jun and NFATp. *Molecular and cellular biology* 16, 459-467.

171. van Dam, H., Duyndam, M., Rottier, R., Bosch, A., Vries-Smiths, L. de, Herrlich, P., Zantema, A., Angel, P., and van der Eb, A.J. (1993). Heterodimer formation of cJun and ATF-2 is responsible for induction of c-jun by the 243 amino acid adenovirus E1A protein. *The EMBO Journal* 12, 479-487.
172. Vinson, C., Myakishev, M., Acharya, A., Mir, A.A., Moll, J.R., and Bonovich, M. (2002). Classification of Human B-ZIP Proteins Based on Dimerization Properties. *Molecular and cellular biology* 22, 6321-6335.
173. Vinson, C.R., Sigler, P.B., and McKnight, S.L. (1989). Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science (New York, N.Y.)* 246, 911-916.
174. Vogt, P.K. (2001). Jun, the oncoprotein. *Oncogene* 20, 2365-2377.
175. Vriens, J., Held, K., Janssens, A., Tóth, B.I., Kerselaers, S., Nilius, B., Vennekens, R., and Voets, T. (2014). Opening of an alternative ion permeation pathway in a nociceptor TRP channel. *Nature chemical biology* 10, 188-195.
176. Vriens, J., Owsianik, G., Hofmann, T., Philipp, S.E., Stab, J., Chen, X., Benoit, M., Xue, F., Janssens, A., and Kerselaers, S., et al. (2011). TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat. *Neuron* 70, 482-494.
177. Wagner, T.F.J., Loch, S., Lambert, S., Straub, I., Mannebach, S., Mathar, I., Düfer, M., Lis, A., Flockerzi, V., and Philipp, S.E., et al. (2008). Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic beta cells. *Nature cell biology* 10, 1421-1430.
178. Waugh, D.J.J., and Wilson, C. (2008). The interleukin-8 pathway in cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 14, 6735-6741.
179. West, A.E., Chen, W.G., Dalva, M.B., Dolmetsch, R.E., Kornhauser, J.M., Shaywitz, A.J., Takasu, M.A., Tao, X., and Greenberg, M.E. (2001). Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 11024-11031.
180. Whitmarsh, A.J., and Davis, R.J. (1996). Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 74, 589-607.
181. Whitmarsh, A.J., Yang, S.H., Su, M.S., Sharrocks, A.D., and Davis, R.J. (1997). Role of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in the activation of ternary complex factors. *Molecular and cellular biology* 17, 2360-2371.
182. Wiggin, G.R., Soloaga, A., Foster, J.M., Murray-Tait, V., Cohen, P., and Arthur, J.S.C. (2002). MSK1 and MSK2 are required for the mitogen- and stress-induced phosphorylation of CREB and ATF1 in fibroblasts. *Molecular and cellular biology* 22, 2871-2881.

183. Wu, S., Singh, S., Varney, M.L., Kindle, S., and Singh, R.K. (2012). Modulation of CXCL-8 expression in human melanoma cells regulates tumor growth, angiogenesis, invasion, and metastasis. *Cancer medicine* 1, 306-317.
184. Xia, Z., Dudek, H., Miranti, C.K., and Greenberg, M.E. (1996). Calcium influx via the NMDA receptor induces immediate early gene transcription by a MAP kinase/ERK-dependent mechanism. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 16, 5425-5436.
185. Xing, J., Ginty, D.D., and Greenberg, M.E. (1996). Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science (New York, N.Y.)* 273, 959-963.
186. Yang, S.H., Yates, P.R., Whitmarsh, A.J., Davis, R.J., and Sharrocks, A.D. (1998). The Elk-1 ETS-domain transcription factor contains a mitogen-activated protein kinase targeting motif. *Molecular and cellular biology* 18, 710-720.
187. Zhang, J., Zhang, D., McQuade, J.S., Behbehani, M., Tsien, J.Z., and Xu, M. (2002). c-fos regulates neuronal excitability and survival. *Nature genetics* 30, 416-420.
188. Zhu, M.X. (2005). Multiple roles of calmodulin and other Ca⁽²⁺⁾-binding proteins in the functional regulation of TRP channels. *Pflugers Archiv: European journal of physiology* 451, 105-115.
189. Zufferey, R., Donello, J.E., Trono, D., and Hope, T.J. (1999). Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *Journal of Virology* 73, 2886-2892.

7. Publikationen und Poster

Publikationen

1. **Rubil S**, Rössler OG, Thiel G. CREB, AP-1, ternary complex factors and MAP kinases connect transient receptor potential melastatin-3 (TRPM3) channel stimulation with increased c-Fos expression. *Br J Pharmacol.* 2016 Jan;173(2):305-18.
2. **Rubil S**, Thiel G. Activation of gene transcription via CIM0216, a synthetic ligand of transient receptor potential melastatin-3 (TRPM3) channels. *Channels (Austin).* 2017 Jan 2;11(1):79-83.
3. Thiel G, **Rubil S**, Lesch A, Guethlein LA, Rössler OG. Transient receptor potential TRPM3 channels: Pharmacology, signaling, and biological functions. *Pharmacol Res.* 2017 Oct;124:92-99.
4. **Rubil S**, Lesch A, Mukaida N, Thiel G. Stimulation of transient receptor potential M3 (TRPM3) channels increases interleukin-8 gene promoter activity involving AP-1 and extracellular signal-regulated protein kinase. *Cytokine.* 2018 Mar;103:133-141.
5. Thiel G, Lesch A, **Rubil S**, Backes TM, Rössler OG. Regulation of Gene Transcription Following Stimulation of Transient Receptor Potential (TRP) Channels. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2018;335:167-189.
6. **Rubil S**, Thiel G. Stimulation of TRPM3 channels increases the transcriptional activation potential of Elk-1 involving cytosolic Ca²⁺, extracellular signal-regulated protein kinase, and calcineurin. *Eur J Pharmacol.* 2018 Dec 12;844:225-230.

im Rahmen der Masterarbeit:

7. Lesch A, **Rubil S**, Thiel G. Activation and inhibition of transient receptor potential TRPM3-induced gene transcription. *Br J Pharmacol.* 2014 May;171(10):2645-58.

Poster

- Sandra Rubil, Oliver Rößler, Gerald Thiel
Transient receptor potential melastatin-3 (TRPM3) channel stimulation increases c-Fos promoter activity, c-Fos expression, and the transcriptional activation potential of c-Fos
TRP 2015 - 3rd Leuven TRP symposium

8. Danksagung

In erster Linie danke ich Herrn Prof. Dr. Thiel für die spannende Fragestellung und die immer herzliche und äußerst hilfreiche Unterstützung während und nach meiner Zeit in seiner Arbeitsgruppe.

Herrn Prof. Dr. Schmitz möchte ich für seine Bereitschaft danken, als Zweitgutachter meine Dissertation zu beurteilen.

Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe Thiel, sowie allen ehemaligen Mitgliedern, für die schöne Zeit im Labor. Für viel Spaß und immer offene Ohren und helfende Hände. Insbesondere danke ich Oliver und Maxi, die ich auch nach meiner Laborzeit immer wieder besuchen durfte – wenn auch meine Kuchen-Schulden immernoch nicht beglichen sind ;-)

Oliver danke ich gesondert, für die Durchführung einiger kritischer Western Blots, was mir oft viel Ärger und Sorgen erspart hat.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich während meiner gesamten Ausbildung unterstützt haben und immer für mich da waren.

Ralph danke ich für seine Liebe, seine Unterstützung und immerwährende Geduld.

RESEARCH PAPER

CREB, AP-1, ternary complex factors and MAP kinases connect transient receptor potential melastatin-3 (TRPM3) channel stimulation with increased c-Fos expression

Correspondence

Dr Gerald Thiel, Department of Medical Biochemistry and Molecular Biology, Medical Faculty, Saarland University, Building 44, Homburg, D-66421, Germany. E-mail: gerald.thiel@uks.eu

Received

6 February 2015

Revised

08 October 2015

Accepted

14 October 2015

Sandra Rubil, Oliver G Rössler and Gerald Thiel

Department of Medical Biochemistry and Molecular Biology, Medical Faculty, Saarland University, Homburg, Germany

BACKGROUND AND PURPOSE

The rise in intracellular Ca^{2+} stimulates the expression of the transcription factor c-Fos. Depending on the mode of entry of Ca^{2+} into the cytosol, distinct signal transducers and transcription factors are required. Here, we have analysed the signalling pathway connecting a Ca^{2+} influx via activation of transient receptor potential melastatin-3 (TRPM3) channels with enhanced c-Fos expression.

EXPERIMENTAL APPROACH

Transcription of c-Fos promoter/reporter genes that were integrated into the chromatin via lentiviral gene transfer was analysed in HEK293 cells overexpressing TRPM3. The transcriptional activation potential of c-Fos was measured using a GAL4-c-Fos fusion protein.

KEY RESULTS

The signalling pathway connecting TRPM3 stimulation with enhanced c-Fos expression requires the activation of MAP kinases. On the transcriptional level, three Ca^{2+} -responsive elements, the cAMP-response element and the binding sites for the serum response factor (SRF) and AP-1, are essential for the TRPM3-mediated stimulation of the c-Fos promoter. Ternary complex factors are additionally involved in connecting TRPM3 stimulation with the up-regulation of c-Fos expression. Stimulation of TRPM3 channels also increases the transcriptional activation potential of c-Fos.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

Signalling molecules involved in connecting TRPM3 with the c-Fos gene are MAP kinases and the transcription factors CREB, SRF, AP-1 and ternary complex factors. As c-Fos constitutes, together with other basic region leucine zipper transcription factors, the AP-1 transcription factor complex, the results of this study explain TRPM3-induced activation of AP-1 and connects TRPM3 with the biological functions regulated by AP-1.

Abbreviations

AP-1, activator protein-1; bZIP, basic region leucine zipper; CREB, cAMP-response element-binding protein; SRE, serum response element; SRF, serum response factor; TCF, ternary complex factor; TPA, phorbol 12-myristate 13-acetate; TRP, transient receptor potential

Tables of Links

| TARGETS | |
|---------------------------------|----------------------------|
| Ion channels^a | Enzymes^b |
| TRPM3 channel | ERK |
| | HDAC1 |
| | JNK |
| | MAPKs |
| | p38 |

| LIGANDS |
|-----------------------|
| Forskolin |
| Pregnenolone sulphate |
| TPA |

These Tables list key protein targets and ligands in this article which are hyperlinked to corresponding entries in <http://www.guidetopharmacology.org>, the common portal for data from the IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY (Pawson *et al.*, 2014) and are permanently archived in the Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14 (^{a,b}Alexander *et al.*, 2013a,b).

Introduction

Transient receptor potential (TRP) proteins are cation channels that contain six transmembrane domains and a pore domain between the fifth and sixth transmembrane domains. The TRP melastatin-3 (TRPM3) protein is expressed in various tissues and functions as a Ca²⁺-permeable non-selective ion channel (Grimm *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003; Oberwinkler *et al.*, 2005; Wagner *et al.*, 2008; Naylor *et al.*, 2010; Wagner *et al.*, 2010; Vriens *et al.*, 2014). Many biological functions have been attributed to TRPM3 activation, including vascular smooth muscle cell contraction (Naylor *et al.*, 2010), glutamatergic transmission of cerebellar Purkinje cells (Zamudio-Bulcock *et al.*, 2011) and insulin secretion (Wagner *et al.*, 2008). However, TRPM3-deficient mice did not show alterations in resting blood glucose levels (Vriens *et al.*, 2011), suggesting that TRPM3 may play no or only a marginal role in controlling insulin secretion as previously suggested (Colsoul *et al.*, 2011; Thiel *et al.*, 2013). Instead, the analysis of TRPM3-deficient mice revealed that TRPM3 is a noxious heat sensor in somatosensory neurons (Vriens *et al.*, 2011). Recently, it has been shown that TRPM3 mutation underlies inherited cataracts and glaucoma (Bennett *et al.*, 2014), indicating that TRPM3 is associated with inherited ocular diseases in humans. The analysis of TRPM3-deficient mice argues against a major role for TRPM3 in visual processing in the outer retina (Brown *et al.*, 2015). Moreover, TRPM3 channel activation promotes growth of clear cell renal carcinoma (Hall *et al.*, 2014).

In our laboratory, we discovered that stimulation of endogenous TRPM3 channels with pregnenolone sulfate activates a signal cascade in insulinoma cells that leads to an up-regulation of gene transcription (Mayer *et al.*, 2011; Müller *et al.*, 2011). This observation was confirmed in HEK293 cells expressing a tetracycline-inducible TRPM3 transcription unit (Lesch *et al.*, 2014). Several transcription factors have been identified as responsive to TRPM3-initiated signalling, including activator protein 1 (AP-1), cAMP-response element-binding protein (CREB), Egr-1 and ternary complex factors (TCFs) (Mayer *et al.*, 2011; Müller *et al.*, 2011; Lesch *et al.*, 2014, 2015).

Here, we have analysed the signalling pathway leading to increased transcription of the c-Fos gene following stimulation of TRPM3 channels. The c-Fos gene encodes a basic region leucine zipper (bZIP) transcription factor that constitutes, together with proteins of the c-Jun and ATF families of transcription factors, the AP-1 transcription factor complex. The c-Fos gene is activated by a variety of extracellular signalling molecules, including G_s- and G_q-coupled receptor ligands, receptor tyrosine kinase ligands, phorbol ester, cytokines, calcium ionophores and others. The c-Fos gene thus functions as a point of convergence for many intracellular signalling cascades involving the transcription factors CREB, STAT, AP-1, serum response factor (SRF), and TCFs. In fact, many of these transcription factors have been characterized by analysing the regulation of c-Fos gene transcription. c-Fos expression is highly responsive to an increase in free cytoplasmic Ca²⁺. The nature of the Ca²⁺ source determines which genetic elements, transcription factors and protein kinases are required to activate c-Fos expression (Gallin and Greenberg, 1995). In previous studies, Ca²⁺ influx was induced either by activating voltage-gated Ca²⁺ channels, ionotropic NMDA receptors and G_q-coupled receptors or by adding Ca²⁺ ionophores to the cells (Sheng *et al.*, 1990; Lee and Gilman, 1994; Misra *et al.*, 1994; Thompson *et al.*, 1995; Xia *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 1997; Ely *et al.*, 2011; Glidewell-Kenney *et al.*, 2014). Here, we have identified the signalling molecules that connect TRPM3 Ca²⁺ channel stimulation with enhanced c-Fos expression. Previous studies from our laboratory showed that stimulation of endogenous TRPM3 channels in insulinoma cells or TRPM3-expressing HEK293 cells increases c-Fos promoter activity and expression (Müller *et al.*, 2011; Lesch *et al.*, 2014). The results of this study show that TRPM3-mediated up-regulation of c-Fos expression and activity requires the activation of MAPKs. At the transcriptional level, the cAMP-response element (CRE), the AP-1 and the SRF binding sites are essential genetic elements that connect TRPM3 stimulation with enhanced c-Fos expression.

Methods

Cell culture

HEK293 cells containing the human TRPM3 coding region under the control of a tetracycline-regulated promoter were kindly provided by David Beech and Yasser Majeed, University of Leeds, UK, and cultured as described previously (Naylor *et al.*, 2008). TRPM3 expression was induced by adding tetracycline ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany, # T7680, dissolved in water) to the culture medium containing 0.05% FBS for 24 h before the stimulation with putative TRPM3 activators. As a control, cells that had not received tetracycline were analysed. Stimulation with pregnenolone sulfate ($20 \mu\text{M}$, Sigma-Aldrich # P162, dissolved in DMSO) was performed for 24 h. Stimulation with phorbol 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA, $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, Calbiochem # 524400-1, dissolved in DMSO) or forskolin (Calbiochem, Cat # 344270, dissolved in DMSO) was performed in a medium containing 0.05% FBS, which lacked tetracycline.

Lentiviral gene transfer

The lentiviral transfer vectors pFUW-REST/Elk-1 Δ C, pFUW-REST/CREB, pFUW-c-Jun Δ N, pFUW-MKP-1, pFUW-MKP-5 and pFUW-GAL4-c-Fos have been described previously (Mayer *et al.*, 2008; Mayer and Thiel, 2009; Mayer *et al.*, 2009; Rössler and Thiel, 2009; Müller *et al.*, 2010; Spohn *et al.*, 2010; Thiel and Rössler, 2011, 2014; Thiel *et al.*, 2012). The viral particles were produced as previously described (Keim *et al.*, 2012).

Reporter assays

The lentiviral transfer vectors pFW-hc-Fos.luc, pFWc-Fos (CRE)⁴luc and pFW-UAS⁵Sp1²luc have been described elsewhere (Rössler *et al.*, 2008; Thiel and Rössler, 2011; Ekici *et al.*, 2012; Thiel *et al.*, 2012; Kaufmann *et al.*, 2013). The lentiviral transfer plasmid pFWc-Fos Δ TKluc, which encodes the luciferase reporter gene under the control of a minimal thymidine kinase (TK) promoter and a truncated human c-Fos promoter, was generated by subcloning a PacI/Eco47III fragment of the human c-Fos promoter, derived from plasmid pFW-hc-Fos.luc, in a lentiviral transfer vector upstream of the minimal TK promoter and the luciferase open reading frame. The mouse promoter/luciferase plasmids were kind gifts of Djurdjica Coss, UC San Diego (Ely *et al.*, 2011). Lentiviral transfer vectors were generated by cloning of HindIII/BglII fragments of these plasmids upstream of the luciferase reporter gene in a lentiviral transfer vector. Cell extracts were prepared using reporter lysis buffer (Promega, Mannheim, Germany) and analysed for luciferase activities as described previously (Thiel *et al.*, 2000). Luciferase activity was normalized to the protein concentration. Each experiment was performed at least three times in quadruplicate giving consistent results.

Western blots

Whole cell extracts and nuclear extracts were prepared as described previously (Kaufmann and Thiel, 2002). Proteins were separated by SDS-PAGE, blotted and incubated with antibodies directed against c-Fos (Santa Cruz, Heidelberg,

Germany, # sc-52) or histone deacetylase-1 (loading control). The M2 monoclonal antibody (Sigma-Aldrich # F3165) was used to detect FLAG-tagged proteins. Immunoreactive bands were detected via enhanced chemiluminescence as described previously (Spohn *et al.*, 2010; Mayer *et al.*, 2011). Quantification of Western blot data was performed with the ChemiDoc XRS+ imaging system from Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Germany), using the Quantity One 1-D analysis software.

Statistics

Statistical analysis was carried out by using Student's two-tailed *t*-test. Data shown are mean \pm SD from three to four independent experiments performed in quadruplicate. Statistical probability is expressed as **P* < 0.05, ***P* < 0.01 and ****P* < 0.001. Values were considered significant when *P* < 0.05.

Results

The steroid pregnenolone sulfate activates endogenous TRPM3 channels and L-type voltage-gated Ca²⁺ channels in insulinoma cells leading to an up-regulation of c-Fos promoter activity (Müller *et al.*, 2011). The stimulation of the c-Fos promoter was blocked in cells pretreated with the L-type Ca²⁺ channel blocker verapamil. To elucidate the signalling pathway connecting TRPM3 stimulation with enhanced c-Fos gene transcription, we used an engineered HEK293 cell line, in which TRPM3 expression is induced by adding tetracycline to the culture medium. As HEK293 cells do not express L-type voltage-gated Ca²⁺ channels (Wagner *et al.*, 2008; Majeed *et al.*, 2010), interference between TRPM3 and L-type voltage-gated Ca²⁺ channel signalling was avoided. HEK293 cells expressing TRPM3 are frequently used as a cellular model system to analyse TRPM3 stimulation and signalling (Grimm *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2008; Majeed *et al.*, 2010; Vriens *et al.*, 2014).

Pregnenolone sulfate triggers an up-regulation of c-Fos promoter/luciferase reporter gene transcription in HEK293 cells expressing TRPM3

We used lentiviral gene transfer to integrate either a human c-Fos promoter/luciferase reporter gene (hc-Fos.luc) or a murine c-Fos promoter/luciferase reporter gene (mc-Fos.luc) into the genome of the cells. The eukaryotic chromatin structure is repressive to transcription that requires accessibility to DNA. The implantation of the reporter genes into the chromatin ensured that these genes were packed into an ordered nucleosomal structure. In contrast, plasmids containing reporter genes that are introduced into the cells via transient transfection may be incompletely organized in comparison with cellular chromatin and thus resemble a prokaryotic gene organisation with a nonrestrictive transcriptional ground state. A schematic depiction of the integrated proviruses encoding the luciferase reporter gene under the control of the human or murine c-Fos regulatory regions is shown in Figure 1A. The landmark genetic elements within the c-Fos regulatory regions are indicated.

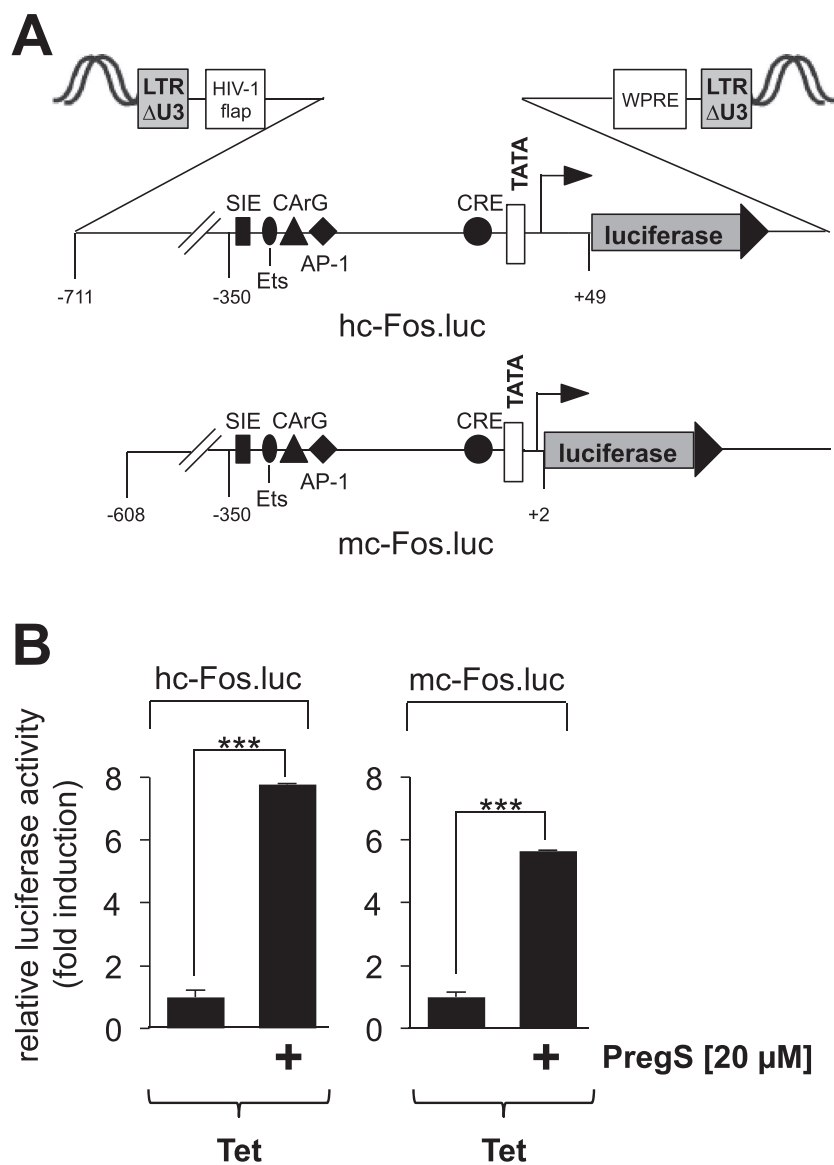


Figure 1

Stimulation of TRPM3 activates transcription of c-Fos promoter/luciferase reporter genes. (A) Schematic representation of integrated proviruses encoding a human c-Fos promoter/luciferase reporter gene (hc-Fos.luc) or a murine c-Fos promoter/luciferase reporter gene (mc-Fos.luc). The landmark transcription factor binding sites are depicted, including the SIS-inducible element (SIE), Ets, the CARG box, the AP-1 binding site, and the CRE. (B) HEK293 cells containing a tetracycline-inducible TRPM3 transcription unit were infected with recombinant lentiviruses encoding either a human c-Fos promoter/luciferase reporter gene (hc-Fos.luc) or a murine c-Fos promoter/luciferase reporter gene (mc-Fos.luc) respectively. The cells were serum starved for 24 h in the presence of tetracycline ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and then stimulated with pregnenolone sulfate (PregS, $20 \mu\text{M}$) for 24 h. Cell extracts were prepared and analysed for luciferase activities. Luciferase activity was normalized to the protein concentration. Data shown are mean \pm SD from three independent experiments performed in quadruplicate (** $P < 0.001$).

HEK293 cells containing a tetracycline-responsive TRPM3 expression cassette were infected with lentiviruses encoding one of the c-Fos promoter/luciferase reporter genes. Cells were treated with tetracycline to induce TRPM3 expression, serum starved for 24 h and stimulated with pregnenolone sulfate for 24 h. Figure 1B shows that pregnenolone sulfate stimulation of HEK293 cells expressing TRPM3 induced an up-regulation of c-Fos promoter-regulated reporter gene transcription.

Protein phosphatases MKP-1 and MKP-5 attenuate pregnenolone sulfate-induced activation of the c-Fos promoter and c-Fos expression in HEK293 cells expressing TRPM3

Several studies addressed the role of MAPKs in connecting a rise in the intracellular free Ca^{2+} concentration with enhanced c-Fos expression. The activation of ERK was important for neurons to induce gene transcription following activation of L-type Ca^{2+} channels (Dolmetsch *et al.*, 2001).

Likewise, stimulation of c-Fos expression via activation of nerve growth factor (NGF) or EGF receptors requires ERK (Johnson *et al.*, 1997). In contrast, ERK-independent stimulation of c-Fos gene transcription was observed in ionomycin-treated PC12 cells and in KCl/FPL64176-treated AtT20 cells (Johnson *et al.*, 1997). To assess the impact of ERK and other MAPKs as signal transducers for TRPM3, we overexpressed MAPK phosphatases (MKPs) in the cells. MKP-1, the enzyme that dephosphorylates and inactivates the MAPK ERK, p38 and JNK in the nucleus (Shapiro and Ahn, 1998; Slack *et al.*, 2001), reduced pregnenolone sulfate-induced up-regulation of Egr-1 expression in insulinoma cells (Mayer *et al.*, 2011) and the up-regulation of AP-1 activity in pregnenolone sulfate-stimulated HEK293 cells expressing TRPM3 (Lesch *et al.*, 2015). Therefore, we asked whether overexpression of MKP-1 attenuates the pregnenolone sulfate-induced transcription of c-Fos promoter/reporter genes as well. Figure 2A and B shows that reporter gene transcription was significantly reduced in pregnenolone sulfate-stimulated TRPM3-expressing HEK293 cells that had been infected with an MKP-1 encoding lentivirus. Moreover, reporter gene transcription was also reduced in cells expressing MKP-5, the enzyme that dephosphorylates and inactivates the MAPKs, p38 and JNK. Expression of either

MKP-1 or MKP-5 significantly reduced the up-regulation of c-Fos expression following stimulation of TRPM3 channels with pregnenolone sulfate (Figure 2C and D). Probably because of phosphorylation, c-Fos is visualized as a doublet band on western blots, as reported earlier (Monje *et al.*, 2003; Koga *et al.*, 2009; Kaufmann *et al.*, 2013). These data indicate that activation of MAPKs is essential to connect TRPM3 stimulation with enhanced c-Fos gene transcription and c-Fos expression.

The TRPM3-induced signalling cascade targets the CRE within the c-Fos promoter

The CRE within the c-Fos gene was the first identified genetic element that connects elevated intracellular Ca^{2+} levels with increased c-Fos transcription (Sheng *et al.*, 1990). This element was therefore termed 'calcium-response element' (CaRE). However, stimulation of c-Fos expression in T-cells does not require the CRE/CaRE (Lee and Gilman, 1994). Recently, we showed that treatment of insulinoma cells with pregnenolone sulfate leads to a significant up-regulation of CREB-mediated gene transcription (Müller *et al.*, 2011). The involvement of TRPM3 was verified in these experiments

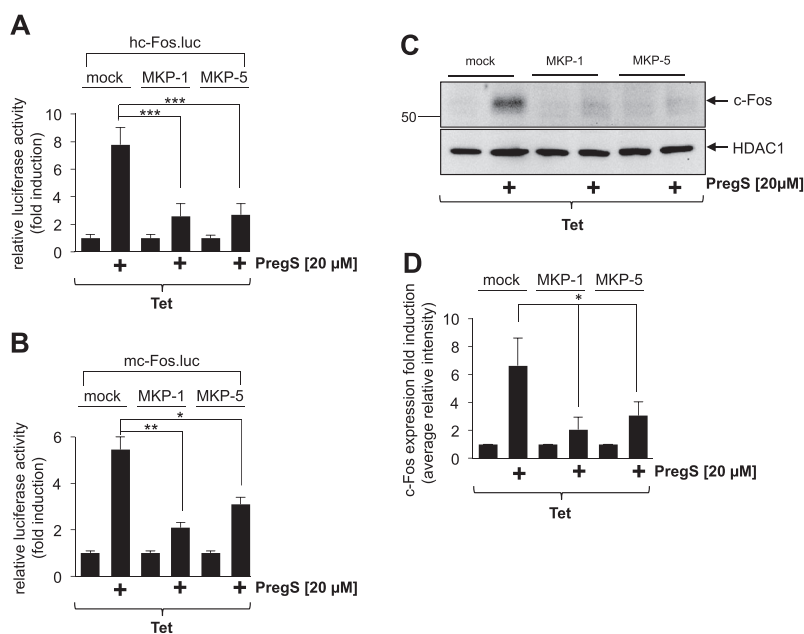


Figure 2

MAPKs connect TRPM3 activation with stimulation of c-Fos promoter activity and c-Fos expression. (A, B) HEK293 cells containing a tetracycline-inducible TRPM3 transcription unit were infected with a recombinant lentivirus containing the luciferase reporter gene under the control of either the human (A) or murine (B) c-Fos promoter. Cells were infected with a lentivirus encoding either MKP-1 or MKP-5. The transgenes were expressed under the control of the human ubiquitin-C promoter. As a control, cells were infected with a lentivirus generated with the lentiviral transfer plasmid pFUW (mock). The cells were serum starved for 24 h in the presence of tetracycline ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and then stimulated with pregnenolone sulfate (PregS, $20 \mu\text{M}$) for 24 h. Cell extracts were prepared and analysed for luciferase activities. Luciferase activity was normalized to the protein concentration. Data shown are mean \pm SD of three experiments performed in quadruplicate ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$). (C) Expression of either MKP-1 or MKP-5 attenuates c-Fos expression in pregnenolone sulfate-stimulated HEK293 cells expressing TRPM3. HEK293 cells containing a tetracycline-inducible TRPM3 transcription unit were infected with a recombinant lentivirus encoding either MKP-1 or MKP-5. As a control, cells were infected with lentiviral stocks prepared with the lentiviral transfer vector pFUW (mock). Cells were serum starved for 24 h in the presence of tetracycline ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and then stimulated with pregnenolone sulfate (PregS, $20 \mu\text{M}$). Nuclear extracts were prepared and subjected to western blot analysis using an antibody directed against c-Fos. The antibody directed against HDAC1 was used as a loading control. (D) Quantification of c-Fos expression. The intensity of the c-Fos signal was normalized to the intensity of the HDAC1 control. Data shown are mean \pm SD of three independent experiments ($*P < 0.05$).

via expression of a TRPM3-specific shRNA that significantly down-regulated TRPM3 expression. However, the pregnenolone sulfate-induced up-regulation of a CRE-controlled reporter gene was also impaired by pre-incubation of the cells with the L-type voltage-gated Ca^{2+} channel inhibitor verapamil (Müller *et al.*, 2011). Thus, both TRPM3 and voltage-gated Ca^{2+} channels are involved in regulating pregnenolone sulfate-induced CRE-mediated gene transcription in insulinoma cells. The previous experiments have shown that TRPM3 stimulation enhanced c-Fos gene transcription in HEK293 cells in the absence of L-type voltage-gated Ca^{2+} channels. Now, we asked the question whether the CRE within the c-Fos promoter functions as a pregnenolone sulfate-responsive element not only in insulinoma cells but also in HEK293 cells that lack L-type voltage-gated Ca^{2+} channels. First, we confirmed that a rise in the intracellular cAMP concentration stimulated transcription of c-Fos promoter/luciferase reporter genes (Figure 3A). We used the c-FosCRE⁴.luc reporter gene to measure CRE-regulated gene transcription, because transcription of this gene is only regulated by CREs (Figure 3B). Figure 3C shows that transcription of this CRE-controlled reporter gene was significantly stimulated in pregnenolone sulfate-treated HEK293 cells expressing TRPM3. As a control, we showed that this transcription unit is highly responsive to elevated cAMP levels in the cells

(Figure 3D). Thus, the CRE functions as CaRE within the c-Fos gene, when the intracellular Ca^{2+} concentration is elevated as a result of TRPM3 stimulation.

To corroborate this finding, we expressed a dominant-negative mutant of CREB, REST/CREB, in HEK293 cells containing a tetracycline-responsive TRPM3 expression unit. This mutant retains the bZIP domain of CREB but lacks the activation domains (Figure 4A). Nuclear proteins of mock-infected HEK293 cells or HEK293 infected with a REST/CREB encoding lentivirus were fractionated by SDS-PAGE, and the fusion protein was identified by Western blot analysis using antibodies targeting the FLAG epitope (Figure 4B). Next, we assessed the functional effects of REST/CREB expression on the pregnenolone sulfate-induced activation of the c-Fos promoter. Figure 4C shows that expression of REST/CREB significantly attenuated the up-regulation of c-Fos promoter/reporter gene transcription in pregnenolone sulfate-stimulated HEK293 cells that expressed TRPM3. In addition, expression of REST/CREB attenuated the up-regulation of c-Fos expression in HEK293 cells following activation of TRPM3 (Figure 4D and E). These data indicate that CREB is part of the signalling cascade that connects a rise in cytoplasmic Ca^{2+} via TRPM3 channel stimulation with enhanced c-Fos promoter activity and c-Fos expression.

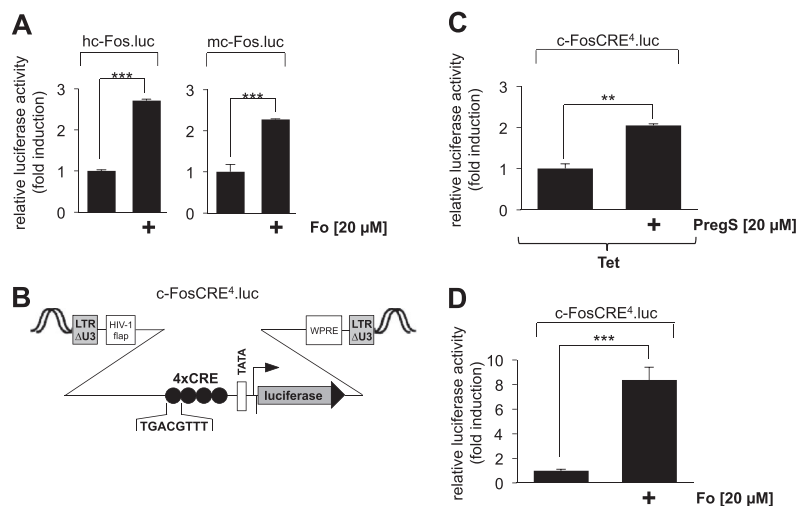


Figure 3

Stimulation of HEK293 cells expressing TRPM3 with pregnenolone sulfate induces transcription mediated by the CRE derived from the human c-Fos gene. (A) Up-regulation of c-Fos promoter activity by elevated intracellular cAMP concentrations. HEK293 cells containing a tetracycline-inducible TRPM3 transcription unit were infected with recombinant lentiviruses encoding a luciferase reporter gene under the control of the human (left panel) or murine (right panel) c-Fos promoter respectively. The cells were serum starved for 24 h and then stimulated with forskolin (Fo, 20 μM) for 24 h. Cell extracts were prepared and analysed for luciferase activities. Luciferase activity was normalized to the protein concentration. Data shown are mean ± SD from three independent experiments performed in quadruplicate ($***P < 0.001$). (B) Schematic representation of the integrated provirus encoding a c-Fos CRE/luciferase reporter gene. The regulatory region of the reporter gene contains a minimal promoter consisting of the human immunodeficiency virus TATA box, the adenovirus major late promoter initiator element and four copies of CRE derived from the human c-Fos gene. (C) HEK293 cells containing a tetracycline-inducible TRPM3 transcription unit were infected with recombinant lentiviruses containing the CRE/luciferase reporter gene c-FosCRE⁴.luc. The cells were serum starved for 24 h in the presence of tetracycline (1 μg·mL⁻¹) and then stimulated with pregnenolone sulfate (PregS, 20 μM) for 24 h. Cell extracts were prepared and analysed for luciferase activities. Luciferase activity was normalized to the protein concentration. Data shown are mean ± SD from three independent experiments performed in quadruplicate ($**P < 0.01$). (D) Cells were infected with recombinant lentiviruses encoding the reporter gene c-FosCRE⁴.luc, serum starved for 24 h and stimulated with Fo (20 μM) for 24 h. Cell extracts were prepared and analysed for luciferase activities. Luciferase activity was normalized to the protein concentration. Data shown are mean ± SD from three independent experiments performed in quadruplicate ($***P < 0.001$).

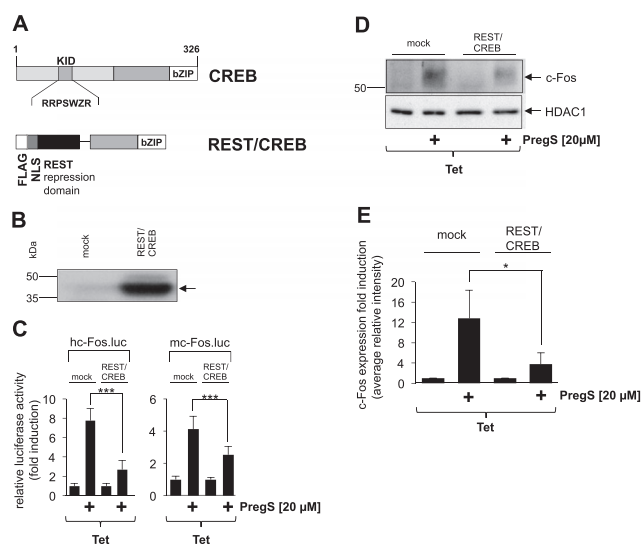


Figure 4

A dominant-negative CREB mutant attenuates the up-regulation of c-Fos promoter activity and c-Fos expression in HEK293 cells expressing activated TRPM3 channels. (A) Schematic representation of CREB and the dominant-negative mutant REST/CREB. The phosphorylation-dependent transcriptional activation domain of CREB [kinase-inducible domain (KID)] is depicted. The bZIP domain is located on the C-terminus. The mutant lacks the KID domain but retains the DNA-binding and dimerization domains. The mutant is expressed as a fusion protein together with a transcriptional repression domain derived from the transcriptional repressor REST. (B) Western blot analysis of HEK293 cells either mock infected or infected with recombinant lentiviruses encoding REST/CREB. Western blots were probed with an antibody against the FLAG tag. Molecular mass markers in kDa are shown on the left. (C) HEK293 cells containing a tetracycline-inducible transcription unit were double infected with a lentivirus encoding either human c-Fos promoter-controlled (left panel) or murine c-Fos promoter-controlled luciferase reporter gene (right panel) and with a lentivirus encoding REST/CREB. As a control, cells were infected with lentiviral stocks prepared with the lentiviral transfer vector pFUW (mock). The cells were serum starved for 24 h in the presence of tetracycline ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and then stimulated with pregnenolone sulfate (PregS, $20 \mu\text{M}$) for 24 h. Cell extracts were prepared and analysed for luciferase activities. Luciferase activity was normalized to the protein concentration. Data shown are mean \pm SD from three independent experiments performed in quadruplicate ($***P < 0.001$). (D) Expression of REST/CREB attenuates c-Fos expression in pregnenolone sulfate-stimulated HEK293 cells expressing TRPM3. HEK293 cells containing a tetracycline-inducible TRPM3 transcription unit were infected with a recombinant lentivirus encoding REST/CREB. As a control, cells were infected with lentiviral stocks prepared with the lentiviral transfer vector pFUW (mock). Cells were serum starved for 24 h in the presence of tetracycline ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and then stimulated with pregnenolone sulfate (PregS, $20 \mu\text{M}$). Nuclear extracts were prepared and subjected to western blot analysis using an antibody directed against the c-Fos protein. The antibody directed against HDAC1 was used as a loading control. (E) Quantification of c-Fos expression. The intensity of the c-Fos signal was normalized to the intensity of the HDAC1 control. Data shown are mean \pm SD from three independent experiments ($*P < 0.05$).

Mutational analysis of the murine c-Fos promoter identified the AP-1 site and the CArG box as pregnenolone sulfate-responsive elements

To test whether the CRE within the c-Fos promoter is the only pregnenolone sulfate-responsive genetic element, we deleted this sequence within the human c-Fos promoter. A schematic depiction of the integrated proviruses encoding the luciferase reporter gene under the control of the truncated human c-Fos regulatory region is shown in Figure 5A. Stimulation of HEK293 cells with forskolin revealed that transcription of a reporter gene under the control of the truncated c-Fos promoter is no longer responsive to elevated cAMP levels in the cells (Figure 5B). However, transcription of the truncated c-Fos promoter/luciferase reporter gene was still responsive to pregnenolone sulfate stimulation, as long as TRPM3 was expressed (Figure 5C). These data suggest that – in addition to the CRE – other Ca^{2+} -responsive genetic elements participate in the up-regulation of c-Fos expression following stimulation of TRPM3 with pregnenolone sulfate.

To identify other TRPM3-responsive elements, we analysed mutants of the murine c-Fos promoter, which contained base pair mutations of the SIS-inducible element, and the binding sites for TCFs (Ets), SRF (CArG box) and AP-1, respectively (Figure 5D). The results show that mutation of the binding sites for AP-1 and SRF significantly impaired pregnenolone sulfate-induced up-regulation of c-Fos promoter/luciferase gene transcription (Figure 5E). In contrast, mutation of the Ets site and the SIS-inducible element, which bind TCFs or STAT transcription factors, respectively, had no effect on the TRPM3-induced up-regulation of reporter gene transcription.

Expression of a dominant-negative mutant of the transcription factor Elk-1 reduces c-Fos promoter-regulated reporter gene transcription and c-Fos expression in HEK293 cells expressing activated TRPM3 channels

Previous experiments performed with insulinoma cells revealed that expression of a dominant-negative mutant of the TCF Elk-1, termed REST/Elk-1 ΔC , reduced c-Fos promoter

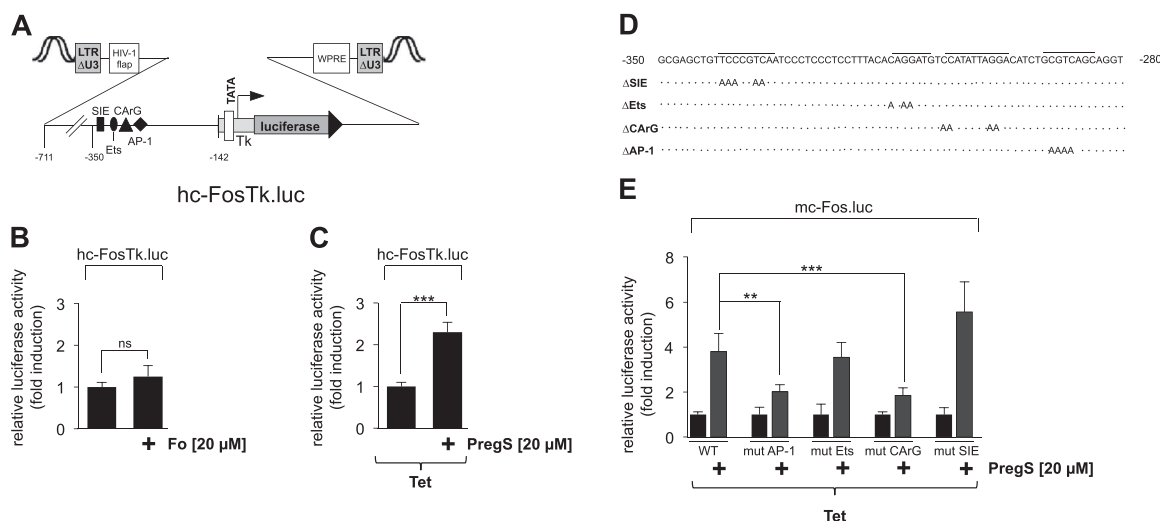


Figure 5

Mutational analysis identifies the AP-1 binding site and the CArG box as pregnenolone sulfate-responsive elements within the c-Fos promoter. (A) Schematic representation of the integrated provirus encoding a truncated c-Fos promoter/luciferase reporter gene lacking the CRE. (B) HEK293 cells containing a tetracycline-inducible TRPM3 transcription unit were infected with recombinant lentiviruses containing a luciferase reporter gene under the control of the truncated human c-Fos promoter. The cells were serum starved for 24 h and then stimulated with forskolin (Fo, 20 μM) for 24 h. Cell extracts were prepared and analysed for luciferase activities. Luciferase activity was normalized to the protein concentration. Data shown are mean ± SD from three independent experiments performed in quadruplicate (n.s., not significant). (C) HEK293 cells containing a tetracycline-inducible TRPM3 transcription unit were infected with a recombinant lentivirus containing the truncated human c-Fos promoter/luciferase reporter gene hc-FosTK.luc. The cells were serum starved for 24 h in the presence of tetracycline (1 μg·mL⁻¹) and then stimulated with pregnenolone sulfate (PregS, 20 μM) for 24 h. Cell extracts were prepared and analysed for luciferase activities. Luciferase activity was normalized to the protein concentration. Data shown are mean ± SD from three independent experiments performed in quadruplicate (***P < 0.001). (D) Sequence of the murine c-Fos promoter from -350 to -280, depicting mutated base pairs of the SIS-inducible element (SIE), Ets and SRF and AP-1 binding sites respectively. (E) HEK293 cells containing a tetracycline-inducible TRPM3 transcription unit were infected with recombinant lentiviruses encoding either the wild-type murine c-Fos promoter/luciferase reporter gene or one of the mutated murine c-Fos promoter/luciferase reporter genes. The cells were serum starved for 24 h in the presence of tetracycline (1 μg·mL⁻¹) and then stimulated with pregnenolone sulfate (PregS, 20 μM) for 24 h. Cell extracts were prepared and analysed for luciferase activities. Luciferase activity was normalized to the protein concentration. Data shown are mean ± SD from three independent experiments performed in quadruplicate (***P < 0.001).

activity following stimulation of endogenous TRPM3 channels with pregnenolone sulfate (Müller *et al.*, 2011). This mutant retains the DNA-binding and SRF interaction domains but lacks the C-terminal activation domain of Elk-1. REST/Elk-1ΔC additionally contains the N-terminal repression domain of the transcriptional repressor REST (Figure 6A). We expressed the mutant in HEK293 cells containing a tetracycline-responsive TRPM3 expression unit (Figure 6B) and assessed the impact of this mutant on the regulation of c-Fos promoter activity. The results show that expression of the mutant reduced the up-regulation of reporter gene transcription in pregnenolone sulfate-stimulated HEK293 cells expressing TRPM3 (Figure 6C). Thus, although the Ets binding site is not required for the up-regulation of c-Fos expression by pregnenolone sulfate/TRPM3 (Figure 5E), expression of the dominant-negative Elk-1 mutant, which binds to the Ets site of the c-Fos promoter and also retains the SRF binding domain, attenuates the pregnenolone sulfate-induced activation of the c-Fos promoter. In addition, expression of the Elk-1 mutant attenuated the up-regulation of c-Fos expression in HEK293 cells expressing activated TRPM3 channels (Figure 6D and E). These data indicate that Elk-1 is an important signalling molecule that connects TRPM3 stimulation with enhanced c-Fos promoter activity and c-Fos expression.

Expression of a dominant-negative mutant of the transcription factor c-Jun reduces c-Fos promoter-regulated reporter gene transcription and attenuates c-Fos expression in HEK293 cells expressing activated TRPM3 channels

The mutational analysis of the murine c-Fos promoter revealed that the AP-1 site within the promoter is involved in connecting TRPM3 stimulation with an increase in c-Fos promoter activity. We also recently showed that stimulation of TRPM3 channels with pregnenolone sulfate induces the biosynthesis of c-Jun in HEK293 cells expressing TRPM3 (Lesch *et al.*, 2014). To corroborate the role of c-Jun in the regulation of c-Fos promoter activity, we expressed the dominant-negative mutant c-JunΔN in HEK293 cells containing a tetracycline-inducible TRPM3 expression unit. The modular structure of c-Jun and the dominant-negative mutant of c-Jun, c-JunΔN, are depicted in Figure 7A. Figure 7B shows that expression of c-JunΔN significantly reduced c-Fos promoter-regulated reporter gene transcription in pregnenolone sulfate-stimulated HEK293 cells that expressed TRPM3 channels. Expression of c-JunΔN also attenuated the up-regulation of c-Fos expression in HEK293 cells expressing activated TRPM3 channels (Figure 7C and D). Thus, c-Jun is required to connect TRPM3 stimulation with enhanced c-Fos promoter activity and c-Fos expression.

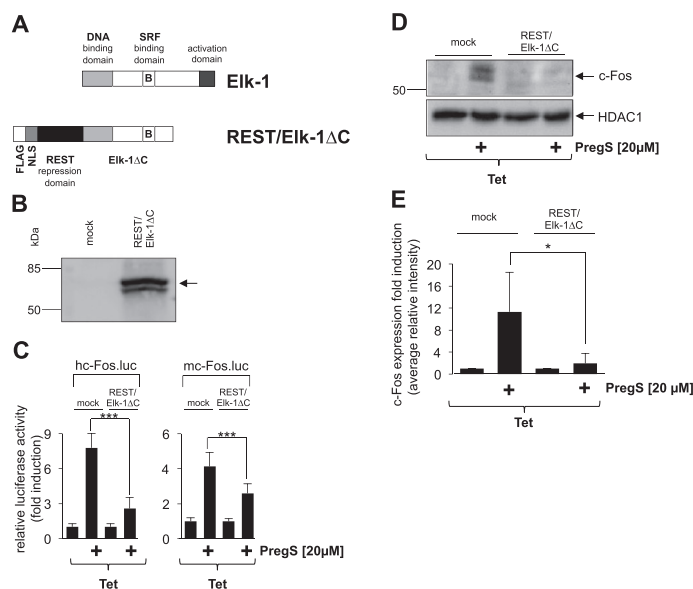


Figure 6

Expression of a dominant-negative mutant of Elk-1 attenuates the up-regulation of c-Fos promoter activity and c-Fos expression in HEK293 cells expressing activated TRPM3 channels. (A) Schematic representation of Elk-1 and the dominant-negative mutant REST/Elk-1ΔC. The DNA-binding domain of Elk-1 is located on the N-terminus. The transcriptional activation domain is located on the C-terminus. A regulatory domain lies within this transcriptional activation domain encompassing the key phosphoacceptor serine residues S383 and S389. Elk-1 binds with its B-domain to SRF, leading to the formation of the ternary Elk-1–SRF complex. The B-domain also couples the C-terminal phosphorylation of Elk-1 with enhanced DNA binding via the Ets domain. The dominant-negative mutant REST/Elk-1ΔC lacks the phosphorylation-regulated activation domain but retains the DNA-binding and SRF-binding domains. The mutant is expressed as a fusion protein together with a transcriptional repression domain of REST. (B) Western blot analysis of HEK293 cells that were either mock infected or infected with a recombinant lentivirus encoding REST/Elk-1ΔC. The Western blot was probed with an antibody against the FLAG tag. Molecular mass markers in kDa are shown on the left. (C) HEK293 cells were double infected with a lentivirus containing the luciferase reporter gene under the control of either the human (left panel) or murine (right panel) c-Fos promoter. In addition, cells were infected with a lentivirus encoding REST/Elk-1ΔC. As a control, cells were infected with lentiviral stocks prepared with the lentiviral transfer vector pFUW (mock). The cells were serum starved for 24 h in the presence of tetracycline ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and then stimulated with pregnenolone sulfate (PregS, $20 \mu\text{M}$) for 24 h. Cell extracts were prepared and analysed for luciferase activities. Luciferase activity was normalized to the protein concentration. Data shown are mean \pm SD from three independent experiments performed in quadruplicate ($***P < 0.001$). (D) Expression of REST/Elk-1ΔC attenuates c-Fos expression in pregnenolone sulfate-stimulated HEK293 cells expressing TRPM3. HEK293 cells containing a tetracycline-inducible TRPM3 transcription unit were infected with a recombinant lentivirus encoding REST/Elk-1ΔC. As a control, cells were infected with lentiviral stocks prepared with the lentiviral transfer vector pFUW (mock). Cells were serum starved for 24 h in the presence of tetracycline ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and then stimulated with pregnenolone sulfate (PregS, $20 \mu\text{M}$). Nuclear extracts were prepared and subjected to Western blot analysis using an antibody directed against the c-Fos protein. The antibody directed against HDAC1 was used as a loading control. (E) Quantification of c-Fos expression. The intensity of the c-Fos signal was normalized to the intensity of the HDAC1 control. Data shown are mean \pm SD of three experiments ($*P < 0.05$).

Stimulation of TRPM3 channels with pregnenolone sulfate increases the transcriptional activation potential of c-Fos

The previous experiments analysed the intracellular signalling molecules responsible for the up-regulation of c-Fos gene transcription following stimulation of TRPM3 channels. Now, we asked whether the transcriptional activation potential of c-Fos is increased under these conditions as well. We expressed a GAL4-c-Fos fusion protein in HEK293 cells containing a tetracycline-regulated TRPM3 transcription unit as a tool to examine the transcriptional activation potential of c-Fos (Figure 8A). In addition, we incorporated a GAL4-responsive reporter gene into the chromatin of the cells to measure the biological activity of the GAL4-c-Fos fusion protein. The transcriptional activation potential of c-Fos was increased in pregnenolone sulfate-stimulated HEK293 cells that expressed TRPM3, the GAL4-c-Fos fusion protein and the GAL4-responsive reporter gene (Figure 8C). As a control, we

stimulated the cells with either forskolin or TPA. In these experiments, cells were not treated with tetracycline, so that TRPM3 was not expressed. Figure 8D and E shows that while the phorbol ester TPA enhanced the transcriptional activation potential of c-Fos, forskolin treatment did not increase c-Fos activity.

Discussion

The c-Fos protein is a transcription factor that contains a central 'core', a basic region leucine zipper (bZIP) domain, for DNA binding and dimerization. The transactivation domain is located at the C-terminus. c-Fos dimerizes with bZIP proteins from the Jun family of transcription factors to generate the AP-1 transcription factor complex. Targeted inactivation of the c-Fos gene in transgenic mice resulted in viable mice that were growth retarded and lacked osteoclasts (Johnson

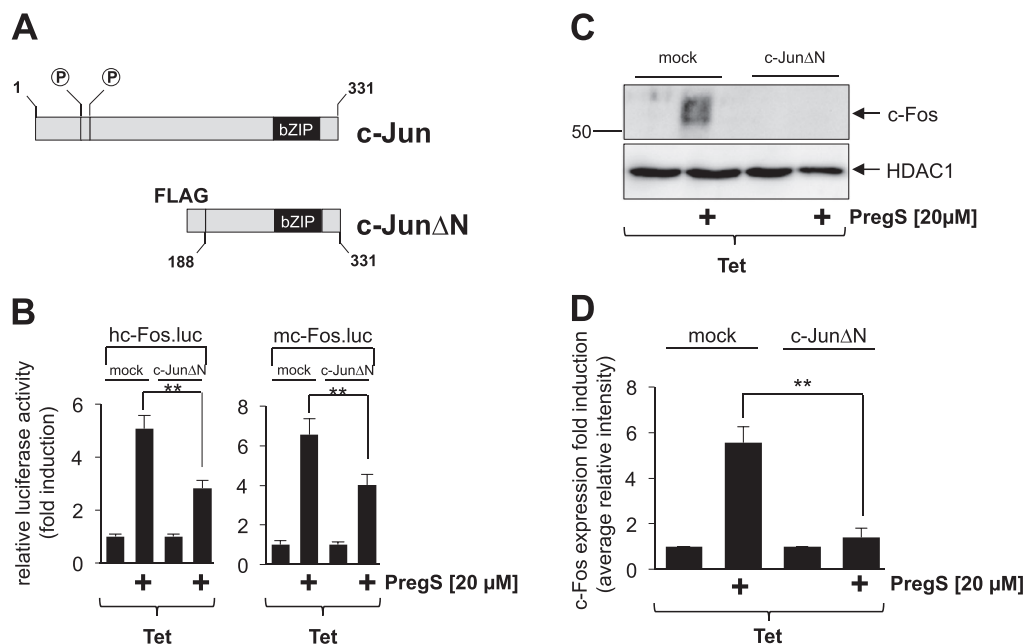


Figure 7

The transcription factor c-Jun connects TRPM3 activation with increased c-Fos promoter activity and c-Fos expression. (A) Modular structure of c-Jun and the dominant-negative form c-Jun Δ N. The mutant encompasses amino acid residues 188 to 331 of c-Jun, retaining the bZIP domain responsible for DNA binding and dimerization, but lacking the NH₂-terminal transcriptional activation domain. (B) HEK293 cells containing a tetracycline-inducible TRPM3 transcription unit were infected with a lentivirus encoding the luciferase reporter gene under the control of the human (left panel) or murine (right panel) c-Fos promoter. In addition, cells were infected with a lentivirus encoding the c-Jun mutant c-Jun Δ N. As a control, cells were infected with lentiviral stocks prepared with the lentiviral transfer vector pFUW (mock). The cells were serum starved for 24 h in the presence of tetracycline (1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and then stimulated with pregnenolone sulfate (PregS, 20 μM) for 24 h. Cell extracts were prepared and analysed for luciferase activities. Luciferase activity was normalized to the protein concentration. Data shown are mean \pm SD of three experiments performed in quadruplicate (** $P < 0.01$). (C) Expression of c-Jun Δ N attenuates c-Fos expression in pregnenolone sulfate-stimulated HEK293 cells expressing TRPM3. HEK293 cells containing a tetracycline-inducible TRPM3 transcription unit were infected with a recombinant lentivirus encoding c-Jun Δ N. As a control, cells were infected with lentiviral stocks prepared with the lentiviral transfer vector pFUW (mock). Cells were serum starved for 24 h in the presence of tetracycline (1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and then stimulated with pregnenolone sulfate (PregS, 20 μM). Nuclear extracts were prepared and subjected to Western blot analysis using an antibody directed against the c-Fos protein. The antibody directed against HDAC1 was used as a loading control. (D) Quantification of c-Fos expression. The intensity of the c-Fos signal was normalized to the intensity of the HDAC1 control. Data shown are mean \pm SD of three independent experiments (** $P < 0.01$).

et al., 1992). In the nervous system, c-Fos expression is induced by neuronal activity. Accordingly, an up-regulation of c-Fos immunoreactivity is frequently used as an indirect marker to identify activated neurons. Elimination of c-Fos expression in the hippocampus revealed that c-Fos is essential for neuronal excitability and survival. The mutant mice exhibited more severe kainic acid-induced seizures, increased neuronal excitability and neuronal cell death in comparison with wild-type mice (Zhang *et al.*, 2002).

Expression of the c-Fos gene is induced by various means, leading to an increase in the intracellular Ca²⁺ concentration. The route of Ca²⁺ entry plays a key role in selecting which signal transducers and transcription factor complexes are activated to trigger an up-regulation of c-Fos expression. The objective of this study was to investigate the intracellular signalling cascade connecting Ca²⁺ influx via TRPM3 channels with an up-regulation of c-Fos expression and activity. In various cell types, it has been shown that stimulation of L-type voltage-gated Ca²⁺ channels results in an up-regulation of c-Fos expression (Thompson *et al.*, 1995; Rajadhyaksha *et al.*, 1999; Jinnah *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2007). Thus, the use of insulinoma cells

as cellular model system, as previously used in our laboratory, would make it difficult to investigate the role of Ca²⁺ influx via TRPM3 channels on c-Fos expression, as the effects of pregnenolone sulfate on TRPM3 and L-type voltage-gated Ca²⁺ channels could not be distinguished. We therefore switched to an engineered HEK293 cell line that expresses TRPM3 but not L-type voltage-gated Ca²⁺ channels.

Recent experiments performed with insulinoma cells showed that both TRPM3 channels and L-type voltage-dependent Ca²⁺ channels are required to induce gene transcription following application of pregnenolone sulfate to the cells (Mayer *et al.*, 2011; Müller *et al.*, 2011). We therefore hypothesized that stimulation of TRPM3 with pregnenolone sulfate triggers the depolarization of the plasma membrane of insulinoma cells that, in turn, activates L-type voltage-gated Ca²⁺ channels. As a result, the influx of Ca²⁺ into the cells increases, which initiates an intracellular signalling cascade, leading to changes in the gene expression pattern of the cells.

The connection between a rise in cytoplasmic Ca²⁺ and an up-regulation of c-Fos gene transcription is accomplished by protein kinases, and MAPKs, PKC and Ca²⁺/calmodulin-

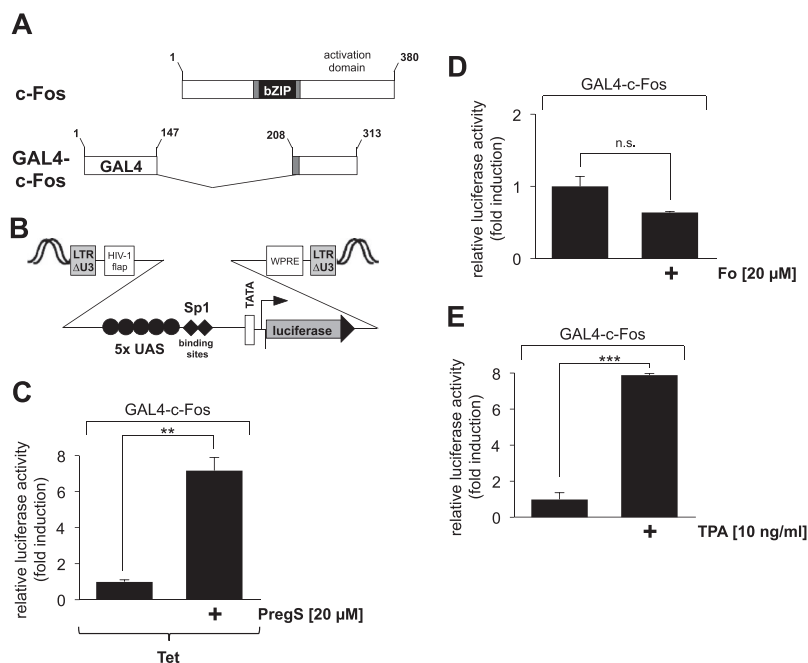


Figure 8

Stimulation of TRPM3 channels up-regulates the transcriptional activation potential of c-Fos. (A) Schematic representation of the modular structure of c-Fos and GAL4-c-Fos. The bZIP DNA-binding and dimerization domains are depicted. The transcriptional activation domain is localized on the C-terminus. The GAL4-c-Fos fusion protein lacks the bZIP domain but retains the C-terminal activation domain of c-Fos. The truncated c-Fos protein is expressed as a fusion protein together with the N-terminal DNA-binding domain of GAL4. (B) Schematic representation of the integrated provirus encoding a luciferase reporter gene under the control of the minimal promoter, consisting of five GAL4 binding sites [upstream activating sequence (UAS)], two Sp1 binding sites, a TATA box and an initiator element. (C) HEK293 cells containing a tetracycline-inducible TRPM3 expression unit were double infected with a lentivirus containing the GAL4-responsive luciferase reporter gene and a lentivirus encoding GAL4-c-Fos. The cells were serum starved for 24 h in the presence of tetracycline ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and then stimulated with pregnenolone sulfate (PregS, $20 \mu\text{M}$) for 24 h. Cell extracts were prepared and analysed for luciferase activities. Luciferase activity was normalized to the protein concentration. Data shown are mean \pm SD from three independent experiments performed in quadruplicate (** $P < 0.01$). (D, E) HEK293 cells containing a tetracycline-inducible TRPM3 expression unit were double infected with a lentivirus containing the GAL4-responsive luciferase reporter gene and a lentivirus encoding GAL4-c-Fos. The cells were serum starved for 24 h and then stimulated with either forskolin (Fo, $20 \mu\text{M}$) (D) or TPA ($10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) (E) for 24 h. Cell extracts were prepared and analysed for luciferase activities. Luciferase activity was normalized to the protein concentration. Data shown are mean \pm SD of three experiments performed in quadruplicate (n.s., not significant; ** $P < 0.01$).

dependent protein kinases have been proposed to function as signal transducers (Johnson *et al.*, 1997; Dolmetsch *et al.*, 2001; Ely *et al.*, 2011; Glidewell-Kenney *et al.*, 2014). The experiments described in this study shed light on the importance of MAPKs in the regulation of c-Fos expression by a TRPM3-induced signalling cascade. We showed that overexpression of either MKP-1 or MKP-5, enzymes that dephosphorylate and inactivate MAPKs in the nucleus, attenuated pregnenolone sulfate-induced transcription of a c-Fos promoter-controlled reporter gene. Thus, the nuclear phosphatases MKP-1 and MKP-5 function as nuclear shut-off devices, as shown for other signalling pathways (Rössler *et al.*, 2008; Rössler and Thiel, 2009; Mayer *et al.*, 2011; Thiel and Rössler, 2011, 2014; Thiel *et al.*, 2012; Kaufmann *et al.*, 2013), which interrupt the signalling cascades induced by pregnenolone sulfate stimulation of TRPM3 channels. Future work will elucidate which of the MAPKs are in fact required to stimulate c-Fos promoter activity following the influx of Ca^{2+} ions via activated TRPM3 channels.

Recently, we showed that transcription of a CRE-controlled reporter gene is up-regulated in insulinoma cells

following pregnenolone sulfate treatment (Müller *et al.*, 2011). We concluded that the CRE functions as a pregnenolone sulfate-response element. As phosphorylation of CREB and stimulation of CRE-mediated gene transcription are also induced in various cell types following opening of L-type Ca^{2+} channels (Thompson *et al.*, 1995; Rajadhyaksha *et al.*, 1999), the results of the insulinoma study did not unequivocally prove that TRPM3 stimulation is responsible for the activation of CRE-containing genes in pregnenolone sulfate-stimulated cells. Using HEK293 cells as a cellular model system that are devoid of L-type voltage-gated Ca^{2+} channels, we showed in this study that stimulation of the cells with pregnenolone sulfate up-regulated the transcription of a reporter gene that was controlled solely by the CRE derived from the human c-Fos gene. Thus, elevation of the intracellular Ca^{2+} concentration, via stimulation of either TRPM3 or L-type voltage-gated Ca^{2+} channels, is sufficient to activate transcription of CRE-containing genes. Hence, the CRE does not only connect elevated cAMP concentrations with enhanced c-Fos promoter activity but also mediates the effect of elevated Ca^{2+} levels upon transcription. The CRE within the c-Fos promoter has therefore been termed Ca^{2+} response

element (Sheng *et al.*, 1990). Deletion of this motif within the c-Fos promoter completely abolished the responsiveness to elevated cAMP levels within the cells, but the ability to respond to pregnenolone sulfate stimulation in TRPM3 expressing HEK293 cells was retained. Thus, in addition to the CRE, other Ca²⁺-responsive genetic elements function as response elements for the signalling pathway induced by activation of TRPM3.

In addition to the CRE, the SRE of the c-Fos gene has been identified as a second integrator of Ca²⁺ signalling pathways within the cells (Lee and Gilman, 1994; Misra *et al.*, 1994; Xia *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 1997). In fact, the molecular biology of SRE-mediated gene transcription was elucidated in the analysis of the c-Fos gene (Cahill *et al.*, 1995; Treisman, 1995). In the nervous system, a rise of intracellular Ca²⁺, either via activating neurotransmitter receptors (i.e. NMDA receptors) or by stimulating L-type voltage-gated Ca²⁺ channels, induces transcription of the c-Fos gene mediated by the SRE (Misra *et al.*, 1994; Xia *et al.*, 1996). The SRE is composed of the SRF binding site encompassing the consensus sequence CC[A/T]₆GG (the CArG box) and TCF binding sites adjacent to the CArG box with the Ets consensus core sequence GGAA/T. Mutational analysis of the c-Fos promoter revealed that the SRF site is necessary for connecting TRPM3 signalling with enhanced c-Fos promoter activity. The adjacent TCF binding site could be mutated without having any negative effect upon stimulus-transcription coupling. Similarly, activation of the c-Fos promoter by stimulating G protein-coupled receptors requires SRF, but not the binding of TCFs (Hill and Treisman, 1995; Ely *et al.*, 2011), indicating that Ca²⁺ influx into the cytosol either via activation of voltage-gated or ionotropic Ca²⁺ channels or via the IP₃/IP₃ receptor pathway activates distinct signalling molecules to up-regulate c-Fos expression. Recently, we showed that TRPM3 activation up-regulates the transcriptional activation potential of the TCF Elk-1 (Lesch *et al.*, 2014), one of the major MAPK substrates, that connects intracellular signalling cascades with SRE-mediated transcription. Moreover, we showed that a dominant-negative mutant of Elk-1 attenuated TRPM3-induced transcription of reporter genes under the control of either the Egr-1, c-Fos or the collagenase promoter (Mayer *et al.*, 2011; Lesch *et al.*, 2015; this study). Thus, Elk-1 is a target for the pregnenolone sulfate-induced signalling cascade via activation of TRPM3. As TCF activation is required, together with an SRF dimer, to activate transcription via the SRE, other cryptic TCF binding sites within the c-Fos promoter may compensate for the mutation of the Ets site 5' of the CArG box. Alternatively, Elk-1 may be recruited to the c-Fos promoter via protein-protein interaction with SRF, as described recently for the GnRH-induced activation of c-Fos expression in gonadotropes (Ely *et al.*, 2011) or the neurokinin B-stimulated c-Fos transcription in immortalized GnRH neurons (Glidewell-Kenney *et al.*, 2014). This scenario would explain the biological effects of the Elk-1 mutant REST/Elk-1ΔC reported in this study, which retains the B-domain of Elk-1 and therefore interfered with the Elk-1-SRF interaction. The regulation of c-Fos gene transcription by TCF also explains previously published data showing that TCF activation is essential to connect TRPM3 stimulation with enhanced AP-1-mediated gene transcription (Lesch *et al.*, 2015).

Mutational analysis of the c-Fos promoter revealed that the AP-1 binding site, in addition to the CRE and the CArG box, confers responsiveness to an increase in cytoplasmic Ca²⁺ as a result of TRPM3 activation. This site has been shown to mediate c-Fos gene transcription following stimulation with EGF or phorbol ester (Fisch *et al.*, 1989). In addition, in T-cells, the AP-1 site controls c-Fos mRNA induction by intracellular Ca²⁺ (Lee and Gilman, 1994). Using a dominant-negative approach, we have proved that this site contributes to the up-regulation of reporter gene transcription controlled by the c-Fos promoter in HEK293 cells expressing activated TRPM3 channels. These experiments shed light on the importance of the bZIP protein c-Jun within the TRPM3-induced signalling cascade. Originally, AP-1 was described as a heterodimer of c-Jun and c-Fos. c-Jun is involved in regulating c-Fos expression and also regulates its own expression via AP-1 binding sites within the c-Jun gene regulatory region (Thiel and Rössler, 2011; this study). In addition, our experiments support previous observations that c-Jun functions as a Ca²⁺-responsive transcriptional activator (Cruzalegui *et al.*, 1999; Müller *et al.*, 2011).

In summary, we present here the first study characterizing the signalling molecules required to up-regulate c-Fos expression as a result of Ca²⁺ entry in the cells via activated TRPM3 channels. This study shows that the activation of MAPKs is essential for connecting a rise in cytoplasmic Ca²⁺ via TRPM3 channels with enhanced c-Fos promoter activity. In the nucleus, c-Fos expression requires three Ca²⁺-responsive elements, the CRE, the CArG box and the AP-1 binding site, involving the transcription factors CREB, c-Jun and SRF following stimulation of TRPM3 expressing cells with pregnenolone sulfate. Experiments employing a dominant-negative mutant of Elk-1 additionally suggest an important role for TCFs in the regulation of c-Fos gene transcription in cells expressing activated TRPM3 channels. The stimulation of c-Fos expression and activity via pregnenolone sulfate-induced TRPM3 activation connects TRPM3 with the biological functions of the AP-1 transcription factor that is involved in the regulation of proliferation, transformation, differentiation and programmed cell death (Shaulian and Karin, 2002).

Acknowledgements

We thank David Beech and Yasser Majeed for their generous gift of HEK293 cells containing a tetracycline-regulated TRPM3 expression unit and Djurdjica Coss for the murine c-Fos promoter constructs. We thank Libby Guethlein for critical reading of the manuscript. This work was supported by Saarland University.

Author contributions

G. T. designed the research study, contributed essential reagents and wrote the manuscript. S. R. and O. G. R. did the experiments and G. T., O. G. R. and S. R. analysed the data.

Conflict of interest

None declared.

References

- Alexander SPH, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Sharman JL, Spedding M, *et al.* (2013a). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: ligand-gated ion channels. *Br J Pharmacol* 170: 1582–1606.
- Alexander SPH, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Sharman JL, Spedding M, *et al.* (2013b). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: enzymes. *Br J Pharmacol* 170: 1797–1867.
- Bennett TM, Mackay DS, Siegfried CJ, Shiels A (2014). Mutation of the melastatin-related cation channel, TRPM3, underlies inherited cataract and glaucoma. *PLoS One* 9: e104000.
- Brown RL, Xiong W-H, Peters JH, Tekmen-Clark M, Strycharska I, Reed BT, *et al.* (2015). TRPM3 expression in mouse retina. *PLoS One*. 10: e0117615
- Cahill MA, Janknecht R, Nordheim A (1995). Signal uptake by the *c-fos* serum response element. In: Baeuerle PA. *Inducible Gene Expression*, Vol. 2. Birkhäuser: Boston/Basel/Berlin, pp. 39–72.
- Colsoul B, Vennekens R, Nilius B (2011). Transient receptor potential cation channels in pancreatic beta cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 161: 87–110.
- Cruzalegui FH, Hardingham GE, Bading H (1999). c-Jun functions as a calcium-regulated transcriptional activator in the absence of JNK/SAPK1 activation. *EMBO J* 18: 1335–1344.
- Dolmetsch RE, Pajvani U, Fife K, Spotts JM, Greenberg ME (2001). Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science* 294: 333–339.
- Ekici M, Keim A, Rössler OG, Hohl M, Thiel G (2012). Chromatin structure and expression of the AMPA receptor subunit GluR2 in human glioma cells: major role of REST and Sp1. *J Cell Biochem* 113: 528–543.
- Ely HA, Mellon PL, Coss D (2011). GnRH induces the c-Fos gene via phosphorylation of SRF by the calcium/calmodulin kinase II pathway. *Mol Endocrinol* 25: 669–680.
- Fisch TM, Prywes R, Roeder RG (1989). An AP-1 binding site in the *c-fos* gene can mediate induction by epidermal growth factor and 12-*O*-tetradecanoyl phorbol-13-acetate. *Mol Cell Biol* 9: 1327–1331.
- Gallin WJ, Greenberg ME (1995). Calcium regulation of gene expression in neurons: the mode of entry matters. *Curr Opin Neurobiol* 5: 367–374.
- Glidewell-Kenney CA, Trang C, Shao PP, Gutierrez-Reed N, Uzo-Okereke AM, Coss D, *et al.* (2014). Neurokinin B induces *c-fos* transcription via protein kinase C and activation of serum response factor and Elk-1 in immortalized GnRH neurons. *Endocrinology* 155: 3909–3919.
- Grimm C, Kraft R, Sauerbruch S, Schulz G, Harteneck C (2003). Molecular and functional characterization of the melastatin-related cation channel TRPM3. *J Biol Chem* 278: 21493–21501.
- Hall DP, Cost NG, Hegde S, Kellner E, Mikhaylova O, Stratton Y, *et al.* (2014). TRPM3 and miR-204 establish a regulatory circuit that controls oncogenic autophagy in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Cell* 26: 738–753.
- Hill CS, Treisman R (1995). Differential activation of *c-fos* promoter elements by serum, lysophosphatidic acid, G proteins and polypeptide growth factors. *EMBO J* 14: 5037–5047.
- Jinnah HA, Egami K, Rao L, Shin M, Kasim S, Hess EJ (2003). Expression of c-Fos in the brain after activation of L-type calcium channels. *Dev Neurosci* 25: 403–411.
- Johnson CM, Hill CS, Chawla S, Treisman R, Bading H (1997). Calcium controls gene expression via three distinct pathways that can function independently of the Ras/mitogen-activated protein kinases (ERKs) signaling cascade. *J Neurosci* 15: 6189–6202.
- Johnson RS, Spiegelman BM, Papaionnou V (1992). Pleiotropic effects of a null mutation in the *c-fos* proto-oncogene. *Cell* 71: 577–586.
- Kaufmann A, Keim A, Thiel G (2013). Regulation of immediate-early gene transcription following activation of G α q-coupled designer receptors. *J Cell Biochem* 114: 681–696.
- Kaufmann K, Thiel G (2002). Epidermal growth factor and thrombin induced proliferation of immortalized human keratinocytes is coupled to the synthesis of Egr-1, a zinc finger transcriptional regulator. *J Cell Biochem* 85: 381–391.
- Keim A, Müller I, Thiel G (2012). Efficient genetic manipulation of 1321 N1 astrocytoma cells using lentiviral gene transfer. *J Neurosci Methods* 206: 138–142.
- Koga K, Takaesu G, Yoshida R, Nakaya M, Kobayashi T, Kinjyo I, *et al.* (2009). Cyclic adenosine monophosphate suppresses the transcription of proinflammatory cytokines via the phosphorylated c-Fos protein. *Immunity* 30: 372–383.
- Lee G, Gilman M (1994). Dual modes of control of *c-fos* mRNA induction by intracellular calcium in T cells. *Mol Cell Biol* 14: 4579–4587.
- Lee N, Chen J, Sun L, Wu S, Gray KR, Rich A, *et al.* (2003). Expression and characterization of human transient receptor potential melastatin 3 (hTRPM3). *J Biol Chem* 278: 20890–20897.
- Lesch A, Rubil S, Thiel G (2014). Activation and inhibition of transient receptor potential TRPM3-induced gene transcription. *Br J Pharmacol* 171: 2645–2658.
- Lesch A, Hui X, Lipp P, Thiel G (2015). Transient receptor potential melastatin-3 (TRPM3)-induced activation of AP-1 requires Ca²⁺ ions and the transcription factors c-Jun, ATF2, and ternary complex factor. *Mol Pharmacol* 87: 617–628.
- Majeed Y, Agarwal AK, Naylor J, Seymour VAL, Jiang S, Muraki K, *et al.* (2010). Cis-isomerism and other chemical requirements of steroid agonists and partial agonists acting at TRPM3 channels. *Br J Pharmacol* 161: 430–441.
- Mayer SI, Müller I, Mannebach S, Endo T, Thiel G (2011). Signal transduction of pregnenolone sulfate in insulinoma cells. Activation of Egr-1 expression involving TRPM3, voltage-gated calcium channels, ERK, and ternary complex factors. *J Biol Chem* 286: 10084–10096.
- Mayer SI, Rössler OG, Endo T, Charnay P, Thiel G (2009). Epidermal growth factor-induced proliferation of astrocytes requires Egr transcription factors. *J Cell Sci* 122: 3340–3350.
- Mayer SI, Thiel G (2009). Calcium influx into MIN6 insulinoma cells induces expression of Egr-1 involving extracellular signal-regulated protein kinase and the transcription factors Elk-1 and CREB. *Eur J Cell Biol* 88: 19–33.
- Mayer SI, Willars GB, Nishida E, Thiel G (2008). Elk-1, CREB, and MKP-1 regulate Egr-1 expression in gonadotropin-releasing hormone stimulated gonadotrophs. *J Cell Biochem* 105: 1267–1278.
- Misra RP, Bonni A, Miranti CK, Rivera VM, Sheng M, Greenberg ME (1994). L-type voltage-sensitive calcium channel activation

- stimulates gene expression by a serum response factor-dependent pathway. *J Biol Chem* 269: 25483–25493.
- Monje P, Marinissen MJ, Gutkind JS (2003). Phosphorylation of the carboxy-terminal transactivation domain of c-Fos by extracellular signal-regulated protein kinase mediates the transcriptional activation of AP-1 and cellular transformation induced by platelet-derived growth factor. *Mol Cell Biol* 23: 7030–7043.
- Müller I, Endo T, Thiel G (2010). Regulation of AP-1 activity in glucose-stimulated insulinoma cells. *J Cell Biochem* 110: 1481–1494.
- Müller I, Rössler OG, Thiel G (2011). Pregnenolone sulfate activates basic region leucine zipper transcription factors in insulinoma cells: role of voltage-gated Ca²⁺ channels and transient receptor potential melastatin 3 channels. *Mol Pharmacol* 80: 1179–1189.
- Naylor J, Li J, Milligan CJ, Zeng F, Sukumar P, Hou B, *et al.* (2010). Pregnenolone sulphate- and cholesterol-regulated channels coupled to vascular smooth muscle secretion and contraction. *Circ Res* 106: 1507–1515.
- Naylor J, Milligan CJ, Zeng F, Jones C, Beech DJ (2008). Production of a specific extracellular inhibitor of TRPM3 channels. *Br J Pharmacol* 155: 567–573.
- Oberwinkler J, Lis A, Giehl KM, Flockerzi V, Philipp SE (2005). Alternative splicing switches the divalent cation selectivity of TRPM3 channels. *J Biol Chem* 280: 22899–22906.
- Pawson AJ, Sharman JL, Benson HE, Faccenda E, Alexander SP, Buneman OP, *et al.* (2014). The IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY: an expert-driven knowledgebase of drug targets and their ligands. *Nucleic Acids Res* 42 (Database Issue): D1098–D1106.
- Rajadhyaksha A, Barczak A, Macias W, Leveque JC, Lewis SE, Konradi C (1999). L-type Ca²⁺ channels are essential for glutamate-mediated CREB phosphorylation and c-fos gene expression in striatal neurons. *J Neurosci* 19: 6348–6359.
- Rössler OG, Henß I, Thiel G (2008). Transcriptional response to muscarinic acetylcholine receptor stimulation: regulation of Egr-1 biosynthesis by Elk-1, ERK, MKP-1 and calcineurin in carbachol stimulated human neuroblastoma cells. *Arch Biochem Biophys* 470: 93–102.
- Rössler OG, Thiel G (2009). Thrombin induces Egr-1 expression in fibroblasts involving elevation of the intracellular Ca²⁺ concentration, phosphorylation of ERK and activation of ternary complex factor. *BMC Mol Biol* 10: 40.
- Shapiro PS, Ahn NG (1998). Feedback regulation of Raf-1 and mitogen-activated protein kinase (MAP) kinase kinase 1 and 2 by MAP kinase phosphatase-1 (MKP-1). *J Biol Chem* 273: 1788–1793.
- Shaulian E, Karin M (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 4: E131–E136.
- Sheng M, McFadden G, Greenberg ME (1990). Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron* 4: 571–582.
- Slack DN, Seternes O-M, Gabrielsen M, Keyse SM (2001). Distinct binding determinants for ERK2/p38 α and JNK MAP kinases mediate catalytic activation and substrate selectivity of MAP kinase phosphatase-1. *J Biol Chem* 276: 16491–16500.
- Spohn D, Rössler OG, Philipp SE, Raubuch M, Kitajima S, Griesemer D, *et al.* (2010). Thapsigargin induces expression of activating transcription factor 3 in human keratinocytes involving Ca²⁺ ions and c-Jun N-terminal protein kinase. *Mol Pharmacol* 78: 865–876.
- Thiel G, Kaufmann K, Magin A, Lietz M, Bach K, Cramer M (2000). The human transcriptional repressor protein NAB1: expression and biological activity. *Biochim Biophys Acta* 1493: 289–301.
- Thiel G, Lesch A, Keim A (2012). Transcriptional response to calcium-sensing receptor stimulation. *Endocrinology* 153: 4716–4728.
- Thiel G, Müller I, Rössler OG (2013). Signal transduction via TRPM3 in pancreatic β -cells. *J Mol Endocrinol* 50: R75–R83.
- Thiel G, Rössler OG (2011). Immediate-early transcriptional response to angiotensin II in human adrenocortical cells. *Endocrinology* 152: 4211–4223.
- Thiel G, Rössler OG (2014). Resveratrol stimulates AP-1-regulated gene transcription. *Mol Nutr Food Res* 58: 1402–1413.
- Thompson MA, Ginty DD, Bonni A, Greenberg ME (1995). L-type voltage-sensitive Ca²⁺ channel activation regulates c-fos transcription at multiple levels. *J Biol Chem* 270: 4224–4235.
- Teisman R (1995). Journey to the surface of the cell: Fos regulation and the SRE. *EMBO J* 14: 4905–4913.
- Vriens J, Held K, Janssens A, Tóth BI, Kerselaers S, Nilius B, *et al.* (2014). Opening of an alternative ion permeation pathway in a nociceptor TRP channel. *Nat Chem Biol* 10: 188–195.
- Vriens J, Owsianik G, Hofmann T, Philipp SE, Stab J, Chen X, *et al.* (2011). TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat. *Neuron* 70: 482–494.
- Wagner TF, Drews A, Loch S, Mohr F, Philipp SE, Lambert S, *et al.* (2010). TRPM3 channels provide a regulated influx pathway for zinc in pancreatic beta cells. *Pflugers Arch* 460: 755–765.
- Wagner TF, Loch S, Lambert S, Straub I, Mannebach S, Mathar I, *et al.* (2008). Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic beta cells. *Nat. Cell Biol.* 10: 1421–1430.
- Xia Z, Dudek H, Miranti CK, Greenberg ME (1996). Calcium influx via the NMDA receptor induces immediate early gene transcription by a MAP kinase/ERK-dependent mechanism. *J Neurosci* 16: 5425–5436.
- Zamudio-Bulcock PA, Everett J, Harteneck C, Valenzuela CF (2011). Activation of steroid-sensitive TRPM3 channels potentiates glutamatergic transmission of cerebellar Purkinje neurons from developing rats. *J Neurochem* 119: 474–485.
- Zhang J, Zhang D, McQuade JS, Behbehani M, Tsien JZ, Xu M (2002). c-fos regulates neuronal excitability and survival. *Nat Genet* 30: 416–420.
- Zhao R, Liu L, Rittenhouse AR (2007). Ca²⁺ influx through both L- and N-type Ca²⁺ channels increases c-fos expression by electrical stimulation of sympathetic neurons. *Eur J Neurosci* 25: 1127–1135.

ARTICLE ADDENDUM

Activation of gene transcription via CIM0216, a synthetic ligand of transient receptor potential melastatin-3 (TRPM3) channels

Sandra Rubil and Gerald Thiel

Department of Medical Biochemistry and Molecular Biology, Saarland University Medical Faculty, Homburg, Germany

ABSTRACT

Several compounds have been proposed to stimulate TRPM3 Ca^{2+} channels. We recently showed that stimulation of TRPM3 channels with pregnenolone sulfate activated the transcription factor AP-1, while other proposed TRPM3 ligands (nifedipine, D-erythro-sphingosine) exhibited either no or TRPM3-independent effects on gene transcription. Here, we have analyzed the transcriptional activity of CIM0216, a synthetic TRPM3 ligand proposed to have a higher potency and affinity for TRPM3 than pregnenolone sulfate. The results show that CIM0216 treatment of HEK293 cells expressing TRPM3 channels activated AP-1 and stimulated the transcriptional activation potential of c-Jun and c-Fos, 2 basic region leucine zipper transcription factors that constitute AP-1. CIM0216-induced gene transcription was attenuated by knock-down of TRPM3 or treatment with mefenamic acid, a TRPM3 inhibitor. CIM0216 was similarly or less capable in activating TRPM3-mediated gene transcription, suggesting that pregnenolone sulfate is still the ligand of choice for changing the gene expression pattern via TRPM3.

ARTICLE HISTORY

Received 22 June 2016
Accepted 22 June 2016

KEYWORDS

c-Fos; c-Jun; gene expression; lentivirus; TRPM3



Introduction

Transient receptor potential M3 (TRPM3) is a Ca^{2+} permeable cation channel and stimulation of TRPM3 triggers a rise in the intracellular Ca^{2+} concentration. We discovered that TRPM3 stimulation induces an intracellular signaling cascade that results in the activation of the stimulus-responsive transcription factors AP-1, c-Fos, c-Jun, CREB, Egr-1, and Elk-1.^{1–5} The natural ligands for TRPM3 channels are still unknown, but several compounds have been suggested to function as TRPM3-specific agonists. In most of these studies, the influx of Ca^{2+} ions into the cells and the subsequent rise in the intracellular Ca^{2+} concentration was used as an indication of activated TRPM3 channels. However, experiments with cultured neurons and neuronal cell lines revealed that the influx of Ca^{2+} ions into the cells is not always sufficient to induce an intracellular signaling cascade that leads to changes in the gene expression pattern.^{6–8} Recently, we compared the ability of putative activators of TRPM3 to induce gene transcription.³ The result revealed that pregnenolone sulfate is a powerful activator of TRPM3 mediated gene transcription, while other

proposed TRPM3 ligands (nifedipine, D-erythro-sphingosine) exhibited either no or TRPM3-independent effects on gene transcription. These compounds induce a rise in intracellular Ca^{2+} , but the Ca^{2+} signal is insufficient to induce an intracellular signaling cascade that changes the gene expression pattern of the cells. Recently, a synthetic compound termed CIM0216 has been described whose potency in generating a Ca^{2+} influx via TRPM3 channels greatly exceeded that of pregnenolone sulfate.⁹ We therefore asked whether CIM0216 is a potent activator of gene transcription as well, mediated by the stimulation of TRPM3 channels.

Results and discussion

As a sensor to measure AP-1 regulated transcription we used lentiviral gene transfer to implant a collagenase promoter/luciferase reporter gene into the chromatin of HEK293 cells that contain a tetracycline-inducible TRPM3 transcription unit (Fig. 1A). We tested several concentrations of CIM0216 (Fig. 1B) for induction of AP-1-responsive reporter gene transcription. As a control, we stimulated the cells with

CONTACT Gerald Thiel  gerald.thiel@uks.eu  Medical Biochemistry and Molecular Biology, Saarland University, Building 44, Homburg, Saarland, D-66421, Germany.

Addendum to: Lesch A, et al. Activation and inhibition of transient receptor potential TRPM3-induced gene transcription. *Br J Pharmacol* 2014; 171:2645–58; PMID: 24895737; <http://dx.doi.org/10.1111/bph.12524>.

© 2017 Taylor & Francis

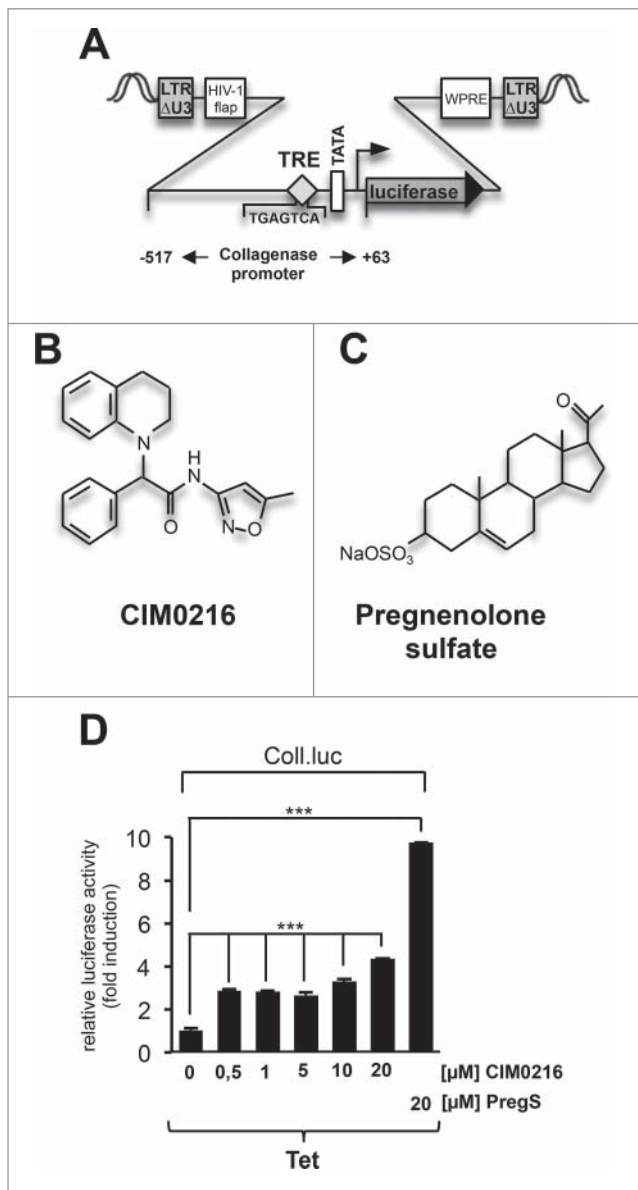


Figure 1. Stimulation of TRPM3 channels with either pregnenolone sulfate or CIM0216 activates AP-1. (A) Schematic representation of the integrated provirus containing the AP-1 responsive collagenase promoter/luciferase reporter gene (Coll.luc). The AP-1 binding site, termed the phorbol 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-responsive element (TRE), is depicted. The location of the woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element (WPRE) and the HIV flap element are shown. (B) CIM0216 (C) Pregnenolone sulfate. (D) HEK293 cells containing a tetracycline-inducible TRPM3 expression unit were infected with a recombinant lentivirus containing the collagenase promoter/luciferase reporter gene (Coll.luc). The cells were cultured for 24 hours in medium containing 0.05% serum in presence of tetracycline. Stimulation with CIM0216 (0.5–20 μM) or pregnenolone sulfate (20 μM) was performed with medium containing 0.05% serum for 24 hours. Cell extracts were prepared and analyzed for luciferase activities. Luciferase activity was normalized to the protein concentration. Data shown are mean ± SD of 3 experiments performed in quadruplicate; (★★★, $P < 0.001$).

pregnenolone sulfate (Fig. 1C). The results show that CIM0216 significantly stimulated transcription from the Coll.luc reporter gene. However, pregnenolone

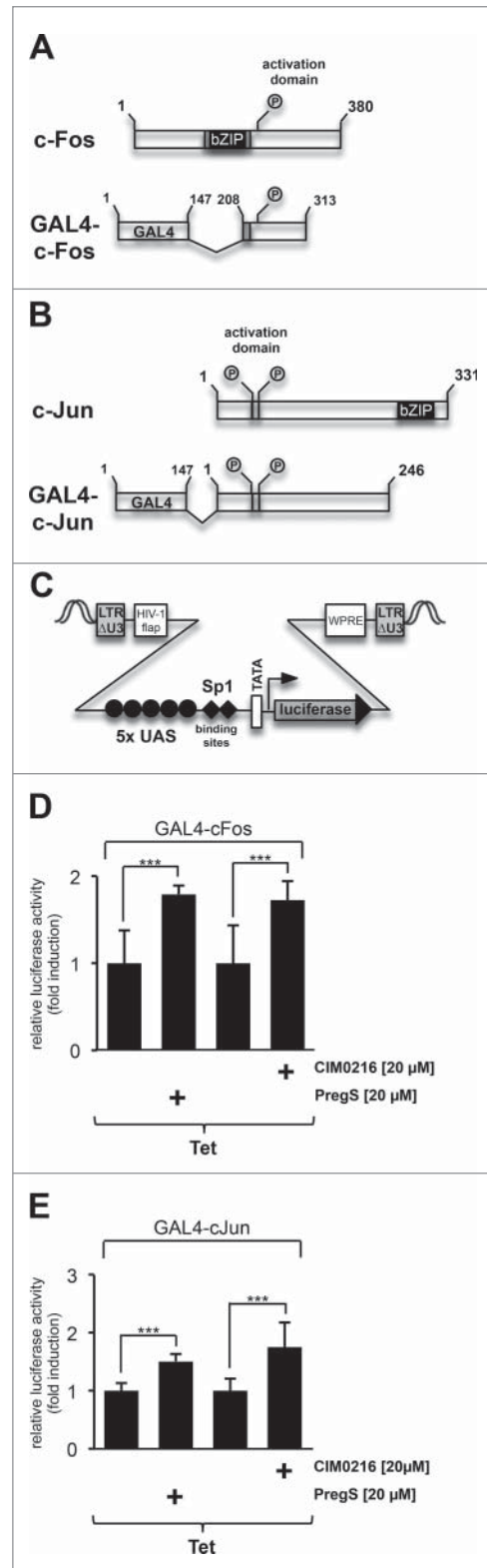


Figure 2. (For figure legend, see page 81)

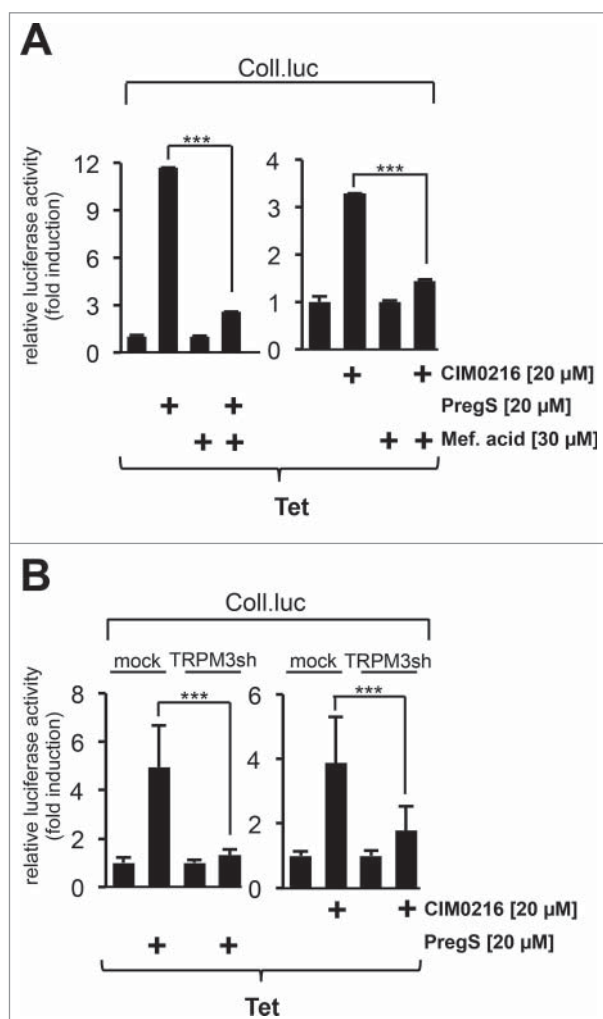


Figure 3. CIM0216 and pregnenolone sulfate are TRPM3 ligands. (A) HEK293 cells containing a tetracycline-inducible TRPM3 transcription unit were infected with recombinant lentiviruses encoding the collagenase promoter/luciferase reporter gene. The cells were serum-starved for 24 hours in the presence of tetracycline (1 $\mu\text{g/ml}$) and then stimulated with either CIM0216 (20 μM) or pregnenolone sulfate (PregS, 20 μM) in the presence or absence of mefenamic acid (Mef, 30 μM) for 24 hours. Cell extracts were prepared and analyzed for luciferase activities. Luciferase activity was normalized to the protein concentration. Data shown are mean \pm SD of 3 experiments performed in quadruplicate; (***, $P < 0.001$). (B) HEK293 cells containing a tetracycline-inducible TRPM3 transcription unit were infected with a lentivirus encoding the collagenase promoter/luciferase reporter gene (Coll.luc). In addition, cells were infected with a lentivirus encoding a TRPM3-specific shRNA. As a control, cells were infected with a lentivirus generated with the lentiviral transfer vector pLL3.7 (mock). The cells were serum-starved for 24 hours in the presence of tetracycline (1 $\mu\text{g/ml}$) and then stimulated with either CIM0216 (20 μM) or pregnenolone sulfate (PregS, 20 μM) for 24 hours as indicated. Cell extracts were prepared and analyzed for luciferase activities. Luciferase activity was normalized to the protein concentration. Data shown are mean \pm SD of 3 experiments performed in quadruplicate (***, $P < 0.001$).

sulfate was more than twice as potent as CIM0216 in upregulating AP-1 via TRPM3 channels (Fig. 1D).

Originally, the transcription factor AP-1 was identified as a dimer of the basic region leucine zipper transcription factors c-Fos and c-Jun. To measure the transcriptional activation potentials of c-Fos and c-Jun, fusion proteins were expressed consisting of the DNA binding domain of the yeast transcription factor GAL4 and the activation domains of c-Fos and c-Jun

that are regulated via phosphorylation (Fig. 2A, 2B). To measure the transcriptional response, we integrated a reporter gene into the genome that had GAL4 binding sites (termed UAS, upstream activation sequence) in its regulatory region (Fig. 2C). The results show that the transcriptional activation potential of c-Fos and c-Jun were significantly increased in TRPM3-expressing HEK293 cells that had been stimulated with either CIM0216 or pregnenolone sulfate (Fig. 2D, E).

Recently, we showed that the upregulation of AP-1 in pregnenolone sulfate-stimulated HEK293 cells expressing TRPM3 was almost completely blocked by the preincubation of the cells with mefenamic acid.³ Figure 3A shows that incubation of the cells with mefenamic acid attenuated CIM0216-induced AP-1 activation in HEK293 cells expressing TRPM3

Figure 2. (see previous page) Stimulation of TRPM3 channels with CIM0216 or pregnenolone sulfate upregulates the transcriptional activation potentials of c-Fos and c-Jun. (A, B) Schematic representation of the modular structure of c-Fos and GAL4-c-Fos (A) and c-Jun and GAL4-c-Jun (B). The bZIP DNA binding and the dimerization domains are depicted. The GAL4 fusion proteins lack the bZIP domain, but retain the C-terminal activation domain of c-Fos (GAL4-c-Fos), or the N-terminal activation domain of c-Jun (GAL4-c-Jun). The truncated c-Fos and c-Jun proteins are expressed as fusion proteins together with the N-terminal DNA binding domain of GAL4. (C) Schematic representation of the integrated provirus encoding a luciferase reporter gene under the control of the minimal promoter, consisting of 5 GAL4 binding sites (UAS, upstream activating sequence), 2 Sp1 binding sites, a TATA box and an initiator element. (D, E) HEK293 cells containing a tetracycline-inducible TRPM3 expression unit were double-infected with a lentivirus containing the GAL4-responsive luciferase reporter gene and a lentivirus encoding either GAL4-c-Fos (D) or GAL4-c-Jun (E). The cells were serum-starved for 24 hours in the presence of tetracycline (1 $\mu\text{g/ml}$) and then stimulated with either CIM0216 (20 μM) or pregnenolone sulfate (PregS, 20 μM) for 24 hours as indicated. Cell extracts were prepared and analyzed for luciferase activities. Luciferase activity was normalized to the protein concentration. Data shown are mean \pm SD of 3 experiments performed in quadruplicate (***, $P < 0.001$).

channels as well. Furthermore, expression of a TRPM3-specific shRNA significantly reduced AP-1 activity in TRPM3-expressing HEK293 cells following stimulation of the cells with either CIM0216 or pregnenolone sulfate (Fig. 3B). Thus, both CIM0216 and pregnenolone sulfate-induced gene transcription relies on the activation of TRPM3 channels.

Conclusion

The experiments show that CIM0216 and pregnenolone sulfate are powerful activators of AP-1-regulated gene transcription via TRPM3. Moreover, both compounds increased the transcriptional activation potential of c-Jun and c-Fos. A comparison of the efficiency of CIM0216 and pregnenolone sulfate to induce gene transcription revealed that pregnenolone sulfate is stronger in activating AP-1 and exhibits similar activity to CIM0216 in stimulating the transcriptional activation potential of c-Jun and c-Fos.

Materials and methods

Cell culture

HEK293 cells containing the human TRPM3 coding region under the control of a tetracycline-regulated promoter were kindly provided by David Beech and Yasser Majeed, University of Leeds, UK and cultured and stimulated as described.^{3,10} Stimulation with pregnenolone sulfate (20 μ M, Sigma-Aldrich # P162, dissolved in DMSO) or CIM0216 (1–20 μ M, Tocris # 5521, dissolved in DMSO) was performed for 24 hours.

Lentiviral gene transfer

The lentiviral transfer vector pFUW-GAL4-c-Fos has been described previously.¹¹ The GAL4-c-Jun expression plasmid pGAL4-c-Jun, expressing the amino acids 1–246 of c-Jun, was a kind gift of Michael Karin, University of California San Diego. To generate the lentiviral transfer vector pFUW-GAL4-c-Jun, plasmid pGAL4-c-Jun was cut with BamHI, filled in with the Klenow fragment of DNA polymerase I, and recut with HpaI. The fragment was cloned into plasmid pFUW-GAL4-NK10,¹² replacing the repression domain of NK10 with the phosphorylation-dependent activation domain of c-Jun. The lentiviral transfer vectors pLL-TRPM3, encoding a TRPM3-specific shRNA, has been described.^{1,4} The viral particles were produced as previously described^{13,14} by triple

transfection of 293T/17 cells with the *gag-pol-rev* packaging plasmid, the *env* plasmid encoding VSV glycoprotein, and the transfer vector.

Reporter assays

The lentiviral transfer vectors pFWColl.luc and pFW-UAS⁵Sp1²luc have been described elsewhere.^{12,15} Cell extracts were prepared using reporter lysis buffer (Promega, Mannheim, Germany) and analyzed for luciferase activities. Luciferase activity was normalized to the protein concentration. Each experiment was performed at least 3 times in quadruplicate giving consistent results.

Statistics

Statistical analysis were done by using the 2-tailed student's *t*-test. Data shown are mean \pm SD from 3 to 4 independent experiments performed in quadruplicate. Statistical probability is expressed as $P < 0.001$. Values were considered significant when $P < 0.05$.

Disclosure of potential conflicts of interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

We thank David Beech and Yasser Majeed for their generous gift of HEK293 cells containing a tetracycline-regulated TRPM3 expression unit. We thank Libby Guethlein for critical reading of the manuscript.

Funding

Funding was provided by Saarland University.

References

- [1] Mayer SI, Müller I, Mannebach S, Endo T, Thiel G. Signal transduction of pregnenolone sulfate in insulinoma cells. Activation of Egr-1 expression involving TRPM3, voltage-gated calcium channels, ERK, and ternary complex factors. *J Biol Chem* 2011; 286:10084–96; PMID:21257751; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.202697>
- [2] Müller I, Rössler OG, Thiel G. Pregnenolone sulfate activates basic region leucine zipper transcription factors in insulinoma cells: role of voltage-gated Ca²⁺ channels and transient receptor potential melastatin 3 channels. *Mol Pharmacol* 2011; 80:1179–89; PMID:21948387; <http://dx.doi.org/10.1124/mol.111.074781>
- [3] Lesch A, Rubil S, Thiel G. Activation and inhibition of transient receptor potential TRPM3-induced gene

- transcription. *Br J Pharmacol* 2014; 171:2645-58; PMID:24895737; <http://dx.doi.org/10.1111/bph.12524>
- [4] Lesch A, Hui X, Lipp P, Thiel G. Transient receptor potential melastatin-3 (TRPM3)-induced activation of AP-1 requires Ca^{2+} ions and the transcription factors c-Jun, ATF2, and ternary complex factor. *Mol Pharmacol* 2015; 87:617-28; PMID:25576487; <http://dx.doi.org/10.1124/mol.114.095695>
- [5] Rubil S, Rössler OG, Thiel G. CREB, AP-1, ternary complex factors and MAP kinases connect transient receptor potential melastatin-3 (TRPM3) channel stimulation with increased c-Fos expression. *Brit J Pharmacol* 2016; 173:305-18; <http://dx.doi.org/10.1111/bph.13372>
- [6] Gallin WJ, Greenberg ME. Calcium regulation of gene expression in neurons: the mode of entry matters. *Curr Opin Neurobiol* 1995; 5:367-74; PMID:7580160; [http://dx.doi.org/10.1016/0959-4388\(95\)80050-6](http://dx.doi.org/10.1016/0959-4388(95)80050-6)
- [7] Deisseroth K, Heist EK, Tsien RW. Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons. *Nature* 1998; 392:198-202; PMID:9515967; <http://dx.doi.org/10.1038/32448>
- [8] West AE, Chen WG, Dalva MB, Dolmetsch RE, Kornhauser JM, Shaywitz AJ, Takasu MA, Tao X, Greenberg ME. Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:11024-31; PMID:11572963; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.191352298>
- [9] Held K, Kichko T, De Clercq K, Klaassen H, Van Bree R, Vanherck JC, Marchand A, Reeh PW, Chaltin P, Voets T, et al. Activation of TRPM3 by a potent synthetic ligand reveals a role in peptide release. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112:E1363-72; PMID:25733887; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1419845112>
- [10] Naylor J, Milligan CJ, Zeng F, Jones C, Beech DJ. Production of a specific extracellular inhibitor of TRPM3 channels. *Brit J Pharmacol* 2008; 155:567-73; <http://dx.doi.org/10.1038/bjp.2008.283>
- [11] Thiel G, Rössler OG. Immediate-early transcriptional response to angiotensin II in human adrenocortical cells. *Endocrinology* 2011; 152:4211-23; <http://dx.doi.org/10.1210/en.2011-1243>
- [12] Ekici M, Keim A, Rössler OG, Hohl M, Thiel G. Chromatin structure and expression of the AMPA receptor subunit GluR2 in human glioma cells: major role of REST and Sp1. *J Cell Biochem* 2012; 113:528-43; PMID:21948504; <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.23376>
- [13] Keim A, Müller I, Thiel G. Efficient genetic manipulation of 1321N1 astrocytoma cells using lentiviral gene transfer. *J Neurosci Meth* 2012; 206:138-42; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2012.02.016>
- [14] Rössler OG, Thiel G. Regulation of gene transcription following stimulation of $G\alpha_q$ -coupled designer receptors. in: Thiel G (Ed.), *Designer receptors exclusively activated by designer drugs*, Humana Press New York, *Neuromethods* 2015; 108:49-60
- [15] Rössler OG, Henß I, Thiel G. Transcriptional response to muscarinic acetylcholine receptor stimulation: Regulation of Egr-1 biosynthesis by Elk-1, ERK, MKP-1 and calcineurin in carbachol stimulated human neuroblastoma cells. *Arch Biochem Biophys* 2008; 470:93-102; PMID:18061571; <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2007.11.008>



Stimulation of transient receptor potential M3 (TRPM3) channels increases interleukin-8 gene promoter activity involving AP-1 and extracellular signal-regulated protein kinase

Sandra Rubil^a, Andrea Lesch^a, Naofumi Mukaida^b, Gerald Thiel^{a,*}

^a Department of Medical Biochemistry and Molecular Biology, Saarland University Medical Faculty, D-66421 Homburg, Germany

^b Division of Molecular Bioregulation, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kakuma-machi, Kanazawa 920-1192, Japan

ARTICLE INFO

Keywords:

ATF2
c-Jun
ERK
Interleukin-8
MKP-1
TCF
TRPC6
TRPM3

ABSTRACT

Stimulation of Ca²⁺ permeable TRPM3 (transient receptor potential melastatin-3) channels with the steroid ligand pregnenolone sulfate activates stimulus-responsive transcription factors, including the transcription factor AP-1 (activator protein-1). As part of a search for AP-1-regulated target genes we analyzed the gene encoding interleukin-8 (IL-8) in HEK293 cells expressing TRPM3 channels. Here, we show that stimulation of TRPM3 channels activated transcription of an IL-8 promoter-controlled reporter gene that was embedded into the chromatin of the cells. Mutational analysis of the IL-8 promoter revealed that the AP-1 binding site of the IL-8 promoter was essential to connect TRPM3 stimulation with the transcription of the IL-8 gene. Genetic experiments revealed that the basic region leucine zipper proteins c-Jun and ATF2 and the ternary complex factor Elk-1 are essential to couple TRPM3 channel stimulation with the IL-8 gene. Moreover, we identified extracellular signal-regulated protein kinase (ERK1/2) as signal transducer connecting TRPM3 stimulation with enhanced transcription of the IL-8 gene. Furthermore, we show that stimulation of TRPC6 (transient receptor potential canonical-6) channels with its ligand hyperforin also increased IL-8 promoter activity, involving the AP-1 binding site within the IL-8 gene, suggesting that activation of IL-8 gene transcription may be a common theme following TRP channel stimulation.

1. Introduction

TRPM3 channels are Ca²⁺ permeable ion channels that play important roles in Ca²⁺ signaling and the regulation of Ca²⁺ homeostasis. TRPM3 contains six transmembrane domains. The pore domain is located between the fifth and sixth transmembrane domains. Stimulation of TRPM3 channels is correlated with numerous biological functions, e.g. tumorigenesis, vascular smooth muscle secretion and contraction, insulin secretion, glutamatergic transmission of cerebellar Purkinje neurons, and temperature and pain sensation [1]. Stimulation of TRPM3 channels leads to the transient activation of stimulus-responsive transcription factors [2–6] that bind to the regulatory region of delayed response genes and stimulate transcription of these genes. The gene products of these delayed response genes are ultimately responsible for the biochemical and physiological changes observed following cellular stimulation.

AP-1 (activator protein-1) is activated following stimulation of TRPM3 channels. AP-1 is a dimeric transcription factor that is constituted by proteins of the Fos, Jun and ATF families of transcription

factors. These basic region leucine zipper (bZIP) proteins dimerize using their leucine zipper domains and bind to the acidic DNA with their basic region. AP-1 is known to regulate cellular proliferation, transformation, differentiation, and apoptosis in a tissue-specific manner [7]. The fact that TRPM3 channel stimulation activates AP-1 indicates that TRPM3 is connected with the biological functions of AP-1 and the transcription of AP-1-regulated delayed response genes. As part of a search for delayed response genes of TRPM3-initiated AP-1 activation, we analyzed the gene encoding interleukin-8 (IL-8), also termed CXCL8. IL-8, a proinflammatory cytokine that belongs to the family of C-X-C chemokines, functions as a potent chemoattractant and neutrophil activator and has been connected with numerous inflammatory diseases. Many cell types express low levels of IL-8. IL-8 expression can be induced by cytokines, growth factors, bacterial endotoxin (LPS), and other stimuli.

Here, we show that the activity of the IL-8 promoter is increased following stimulation of TRPM3 channels, involving the AP-1 binding site and the bZIP proteins ATF2 and c-Jun. Impairment of ternary complex factor activity, which blocks expression of the bZIP protein c-

* Corresponding author at: Department of Medical Biochemistry and Molecular Biology, Saarland University, Building 44, D-66421 Homburg, Germany.
E-mail address: gerald.thiel@uks.eu (G. Thiel).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2017.09.020>

Received 3 May 2017; Received in revised form 7 September 2017; Accepted 20 September 2017

Available online 02 October 2017

1043-4666/ © 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

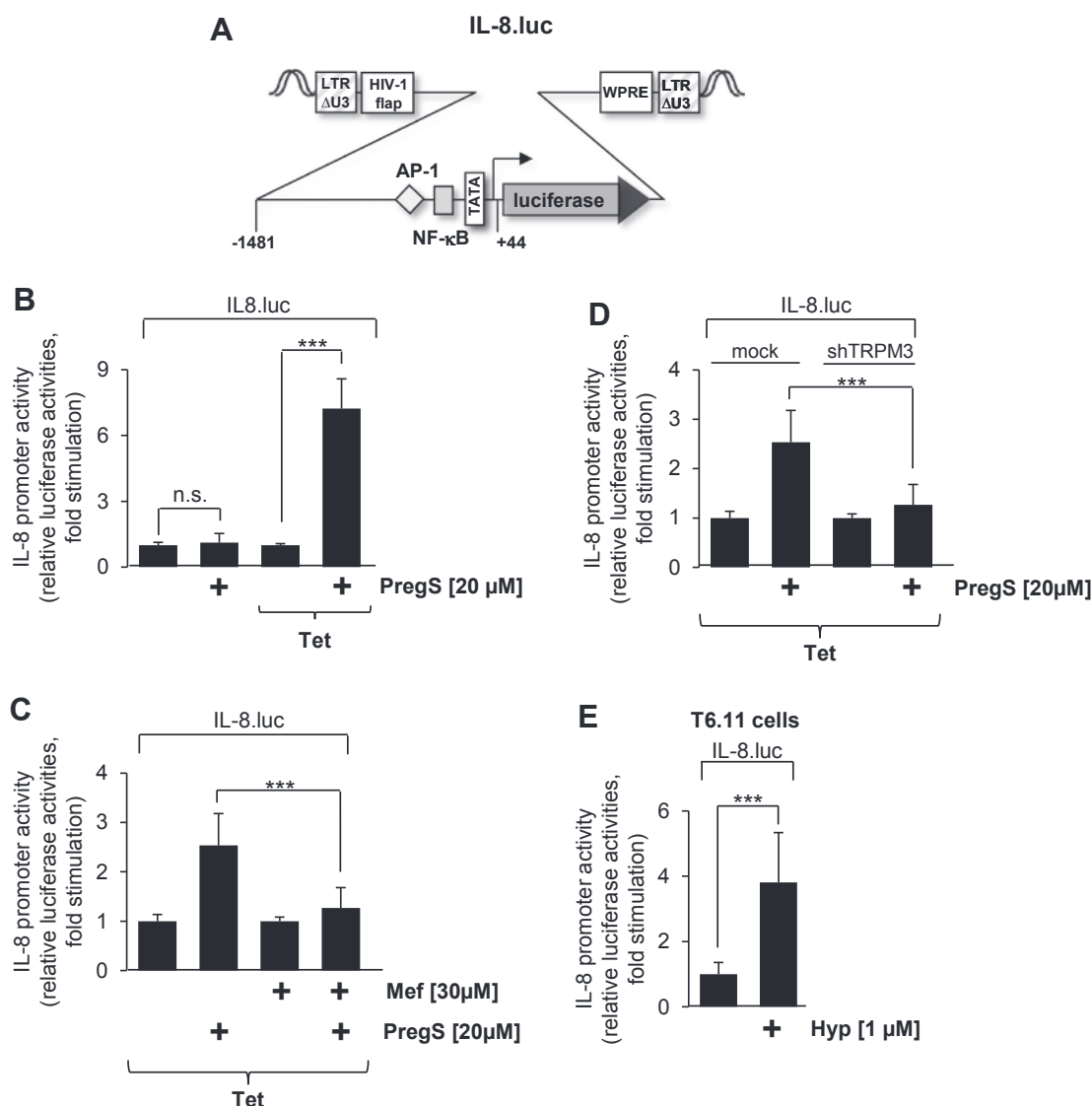


Fig. 1. The IL-8 gene functions as a delayed response gene for the TRPM3 and TRPC6-activated transcription factor AP-1. (A) Schematic representation of the provirus containing an IL-8 promoter/luciferase reporter gene. The promoter encompasses IL-8 gene sequences from -1481 to $+44$ and was inserted upstream of the luciferase open reading frame. The locations of the AP-1 and NF- κ B binding sites within the IL-8 promoter, and the WPRE and HIV flap element within the provirus are depicted. (B) HEK293 cells containing a tetracycline-inducible TRPM3 expression unit were infected with a recombinant lentivirus that encoded the IL-8 promoter/luciferase reporter gene (IL-8.luc). Cells were incubated for 24 h in medium containing 0.05% serum in the presence or absence of tetracycline ($1 \mu\text{g/ml}$). Cells were stimulated for 24 h with the TRPM3 ligand pregnenolone sulfate (PregS, $20 \mu\text{M}$). Cells were harvested, lysed and the extracts were used to measure the luciferase activities that were normalized to the protein concentrations. Three independent experiments performed in quadruplicate and data shown are mean \pm SD ($***$, $P < 0.001$). (C) HEK293/TRPM3 cells were infected with a recombinant lentivirus encoding the IL-8 promoter/luciferase reporter gene. Cells were serum-starved and treated with tetracycline for 24 h. Then, we stimulated the cells for 24 h with pregnenolone sulfate in the absence or presence of mefenamic acid (Mef, $30 \mu\text{M}$). Three independent experiments performed in quadruplicate and data shown are mean \pm SD ($***$, $P < 0.001$). (D) HEK293 cells containing a tetracycline-inducible TRPM3 expression unit were infected with a recombinant lentivirus containing an IL-8 promoter/luciferase reporter gene (IL-8.luc). Cells were also infected with a lentivirus encoding a short hairpin RNA specific for TRPM3. We also infected cells with a control lentivirus produced with the plasmid pLL3.7 (mock). The cells maintained for 24 h in medium containing 0.05% serum and tetracycline ($1 \mu\text{g/ml}$). Stimulation was performed for 24 h with pregnenolone sulfate (PregS, $20 \mu\text{M}$). We prepared extracts from the cells and measured the luciferase activities and the protein concentrations. Three independent experiments performed in quadruplicate and data shown are mean \pm SD ($***$, $P < 0.001$). (E) T6.11 cells, HEK293 cells that constitutively expressed TRPC6 channels, were infected with a recombinant lentivirus that contained the IL-8 promoter-controlled reporter gene. Cells were incubated for 24 h in medium containing 0.05% serum. Stimulation was performed for 16 h with hyperforin ($1 \mu\text{M}$). Cells were lysed and the luciferase activities and protein concentrations determined. Data shown are mean \pm SD of three independent experiments performed in quadruplicate ($***$, $P < 0.001$).

Fos, also interfered with the stimulation of IL-8 promoter-regulated gene transcription as a result of TRPM3 stimulation. In addition, we identified the protein kinase ERK1/2 as signal transducer that connects TRPM3 channel stimulation with increased transcription of the IL-8 gene. Finally, we show that stimulation of TRPC6 channels also activated the IL-8 promoter, involving the AP-1 binding site. Thus, activation of IL-8 gene transcription may be a common theme following TRP channel activation.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

As a cellular model system to analyze TRPM3 signaling HEK293 cells expressing TRPM3 channels have been frequently used. We obtained HEK293 cells with a tetracycline-inducible TRPM3 expression unit from D. Beech and Y. Majeed (University of Leeds, UK) [8]. Tetracycline ($1 \mu\text{g/ml}$, Sigma-Aldrich # T7680) was added to the culture medium to stimulate TRPM3 expression. Cells were maintained in

medium containing 0.05 % fetal bovine serum for 24 h. Stimulation with the TRPM3 ligand pregnenolone sulfate (20 μ M, Sigma # P162, dissolved in DMSO) was performed as described [4]. Mefenamic acid was purchased from Santa Cruz (# sc-205380). The compound was used at a concentration of 30 mM [4]. HEK293 cells expressing TRPC6 (T6.11 cells) [9] were a kind gift of A. Bouron (UMR CNRS Grenoble, France) with the permission of G. Boulay (Université de Sherbrooke, Canada). The cells were cultured and stimulated with hyperforin (1 μ M) as described [10]. Hyperforin was obtained from Dr. C. Erdelmeier from the Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany. HEK293 cells expressing a conditionally active mutant of B-Raf (Δ B-Raf:ER) were maintained and stimulated with 4-hydroxytamoxifen (4OHT, Sigma # H7904) as described [11]. PD98059 was purchased from Calbiochem (# S513000). Cells were pre-incubated for 3 h with this compound (50 μ M) before stimulation.

2.2. Lentiviral expression of short hairpin RNAs (shRNAs)

The lentiviral transfer vectors pLLTRPM3, pLL3.7c-Jun, pLL3.7ATF2, and pLLERK2, expressing TRPM3, c-Jun, ATF2, or ERK2-specific shRNAs have been described [2,5,12,13]. Plasmid pLLERK1, encoding an ERK1-specific shRNA under the control of the U6 promoter, was kindly provided by Jong-In Park from the Medical College of Wisconsin in Milwaukee, USA [14]. The viral particles were produced as described [15,16].

2.3. Reporter assays

Interleukin-8 (IL-8) promoter constructs -1481-luc, -133-luc, AP-1-mut-luc, and NF- κ B-mut-luc [17] were digested with XhoI and BglII. The fragments were cloned into a lentiviral vector upstream of the luciferase coding region, generating the lentiviral transfer plasmid pFWIL-8.luc, pFWIL-8(-133).luc, pFWIL-8(-133).luc Δ AP-1, and pFWIL-8(-133).luc Δ NF- κ B, respectively. Following stimulation, cell extracts of stimulated cells were prepared with reporter lysis buffer (Promega, Mannheim, Germany). Luciferase activities were measured and normalized to the protein concentration.

2.4. Western blots

Western blots were performed as described [5] using the M2 monoclonal antibody directed against the FLAG epitope (Sigma-Aldrich, # F3165).

2.5. Statistics

The two-tailed student's *t*-test was used for the statistical analyses. Statistical probability is expressed as ****P* < 0.001; ***P* < 0.01, and **P* < 0.05. We considered values significant when *P* < 0.05.

3. Results

3.1. Stimulation of TRPM3 channels with pregnenolone sulfate activates the interleukin-8 (IL-8) promoter

Stimulation of HEK293 cells expressing TRPM3 channels with the TRPM3 ligand pregnenolone sulfate increases the activity of AP-1 [3–5,13]. Pharmacological and genetic experiments revealed that expression of TRPM3 channels is necessary for connecting pregnenolone sulfate stimulation with enhanced transcription of AP-1-controlled genes [4,5]. Following activation, AP-1 binds to the regulatory region of delayed response genes and stimulates transcription of these genes. As part of a search for AP-1-responsive delayed response genes, we analyzed the IL-8 gene, encoding the chemokine IL-8. Fig. 1A shows the schematic depiction of a provirus containing an IL-8 promoter/luciferase reporter

gene. The reporter gene was integrated into the genome of the cells. In this way we ensured that the reporter gene was organized into a nucleosomal architecture. In contrast, plasmids introduced into the cells via transient transfection may rather have a prokaryotic nonrestrictive gene organisation [18,19]. TRPM3 signaling was analyzed with a HEK293 cell line, harboring a tetracycline-inducible TRPM3 expression unit [8]. The tetracycline-dependent expression of TRPM3 channels in these cells has been confirmed [4]. The endogenous ligands for TRPM3 are not yet identified. We therefore used pregnenolone sulfate as a pharmacological ligand for TRPM3 channels. Stimulation of TRPM3 channels with pregnenolone sulfate significantly increased transcription of a chromatin-embedded luciferase reporter gene under the control of the IL-8 promoter (Fig. 1B, right bars). Transcription of the IL-8 gene was not upregulated in cells that were not treated with tetracycline and therefore did not express TRPM3 channels (Fig. 1B, left bars).

Mefenamic acid is an *N*-phenyl-substituted anthranilic acid derivative that inhibits TRPM3-mediated Ca²⁺ entry in TRPM3-expressing HEK293 cells [20,21] and blocks TRPM3-mediated gene transcription [4]. Fig. 1C shows that mefenamic acid inhibited transcription of an IL-8 promoter/luciferase reporter gene in HEK293 cells expressing activated TRPM3 channels. Likewise, a reduction of TRPM3 concentration via expression of a TRPM3-specific short hairpin (sh) RNA attenuated pregnenolone sulfate-stimulated IL-8 promoter/luciferase reporter gene transcription (Fig. 1D). Together, these data indicate that expression of TRPM3 is required to activate IL-8 promoter-directed gene transcription by pregnenolone sulfate.

Hyperforin, the main ingredient of the medical plant *Hypericum perforatum*, induces transcription controlled by the IL-8 promoter in human intestinal epithelial cells [22]. Hyperforin has been identified as a pharmacological ligand of canonical TRPC6 channels [23], but recently, it has been proposed that hyperforin functions as a protonophore in a TRPC6-independent manner [24]. Two recent publications clearly showed that hyperforin-induced Ca²⁺ influx and signaling requires TRPC6 channels [10,25]. Stimulation of T6.11 cells, HEK293 cells that express TRPC6 channels [10], with hyperforin has been shown to activate AP-1 and to stimulate AP-1-controlled gene transcription [10]. We therefore stimulated T6.11 cells with hyperforin and analyzed IL-8 promoter activity. Fig. 1E shows that stimulation of TRPC6 channels with hyperforin significantly increased transcription of a chromatin-integrated IL-8 promoter/luciferase reporter gene.

3.2. The AP-1 site within the IL-8 promoter functions as pregnenolone sulfate and hyperforin response element

Fig. 2A shows the structure of proviruses containing truncated and mutated versions of IL-8 promoter-controlled reporter genes. We asked whether a truncated IL-8 promoter, encompassing 133 nucleotides upstream of the start site of transcription, was sufficient to promote reporter gene transcription in HEK293 cells following stimulation of TRPM3 channels. Fig. 2B shows that reporter gene transcription controlled by a truncated IL-8 promoter was significantly induced following activation of TRPM3 channels. Likewise, stimulation of TRPC6 expressing T6.11 cells with hyperforin increased transcription of the reporter gene, controlled by a truncated IL-8 promoter (Fig. 2C). The proximal promoter of the IL-8 gene contains binding sites for the transcription factors AP-1 and NF- κ B. We therefore analyzed IL-8 promoter reporter genes containing mutations of either the AP-1 or the NF- κ B site (Δ AP-1 and Δ NF- κ B, Fig. 2A). The results show that the AP-1 site is required to connect TRPM3 channels with transcriptional stimulation of an integrated IL-8 promoter controlled reporter gene (Fig. 2D). The mutational analysis of the IL-8 promoter identified the AP-1 site as pregnenolone sulfate-responsive element.

Next, we identified the hyperforin-response element within the IL-8 promoter. Reporter gene transcription was significantly attenuated in stimulated T6.11 cells following mutation of the AP-1 site within the IL-

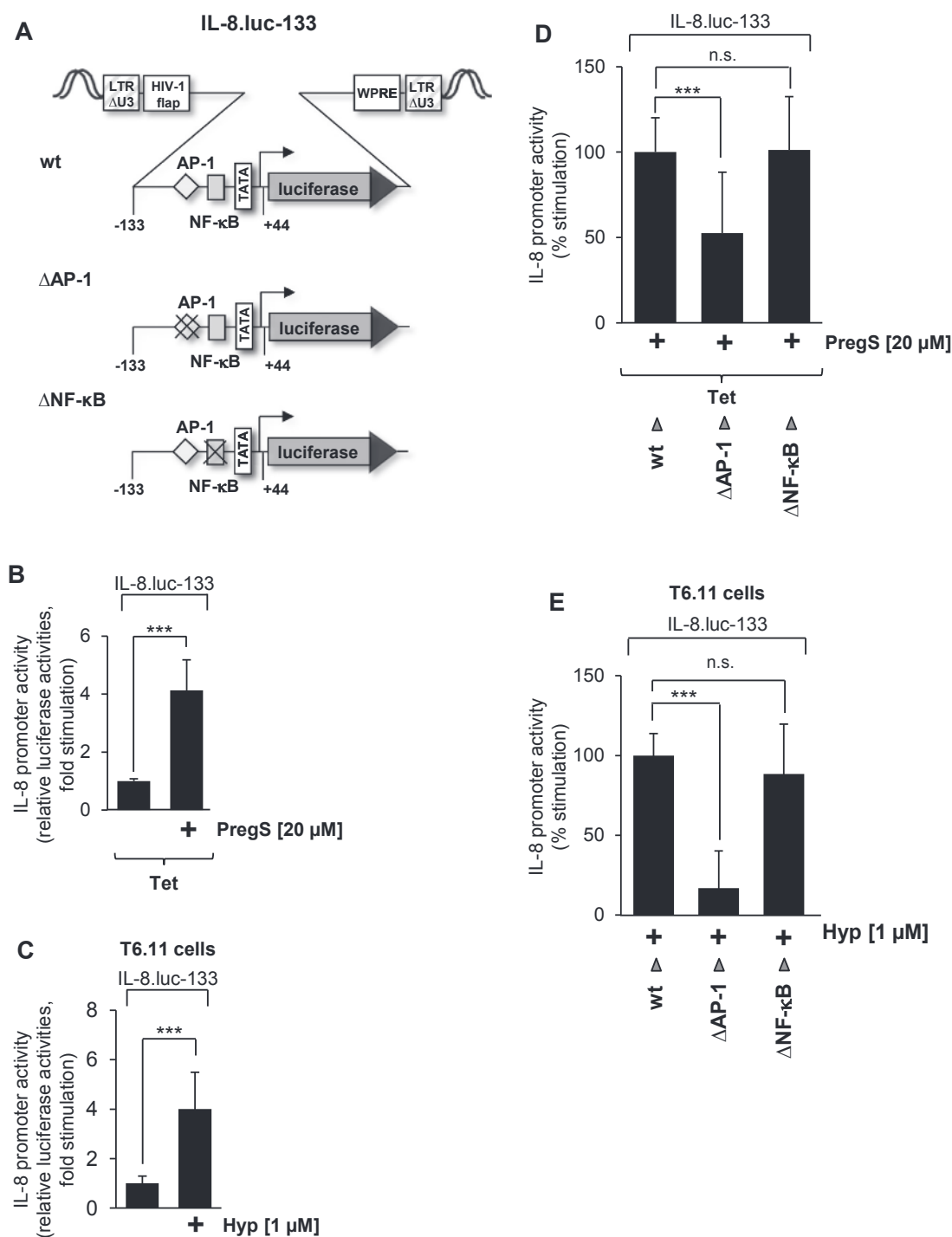


Fig. 2. Identification of the AP-1 site within the IL-8 gene regulatory region as a pregnenolone sulfate and hyperforin-responsive element. (A) Schematic representation of the proviruses containing truncated and mutated IL-8 promoter/luciferase reporter genes. The promoter encompasses IL-8 gene sequences from –133 to +44. The locations of the AP-1 and NF-κB binding sites and the inactivation of either site within the IL-8 promoter are depicted. (B, C) Transcriptional activity of a truncated IL-8 promoter/reporter gene in HEK293 cells expressing either activated TRPM3 or TRPC6 channels. HEK293 cells containing a tetracycline-inducible TRPM3 expression unit (B) or T6.11 cells expressing TRPC6 channels (C) were infected with a recombinant lentivirus containing a truncated IL-8 promoter/luciferase reporter gene (IL8-133.luc), encompassing IL-8 promoter sequences from –133 to +44. HEK293 cells containing a tetracycline-inducible TRPM3 expression unit were serum-starved, treated with tetracycline and stimulated with pregnenolone sulfate (PregS, 20 μM) as described in the legend to Fig. 1 (B). T6.11 cells were maintained for 24 h in medium containing 0.05 % serum. Stimulation with hyperforin (1 μM) was for 16 h (C). Luciferase activities and protein concentrations were determined. Three independent experiments performed in quadruplicate and data shown are mean \pm SD (***, $P < 0.001$). (D) HEK293 cells containing a tetracycline-inducible TRPM3 expression unit were infected with one of the lentiviruses containing the truncated or the truncated and mutated IL-8 promoter-controlled reporter genes. The cells were serum-starved, treated with tetracycline and stimulated with pregnenolone sulfate (PregS, 20 μM) as described in the legend to Fig. 1. (E) T6.11 cells were infected with recombinant lentiviruses encoding either the wild-type truncated IL-8 promoter/luciferase reporter gene or one of the mutated IL-8 promoter/luciferase reporter genes. The cells were serum-starved for 24 h and stimulated with hyperforin (1 μM) for 16 h. Luciferase activities and protein concentrations of the extracts were measured. Three independent experiments performed in quadruplicate and data shown are mean \pm SD (***, $P < 0.001$, n.s. not significant).

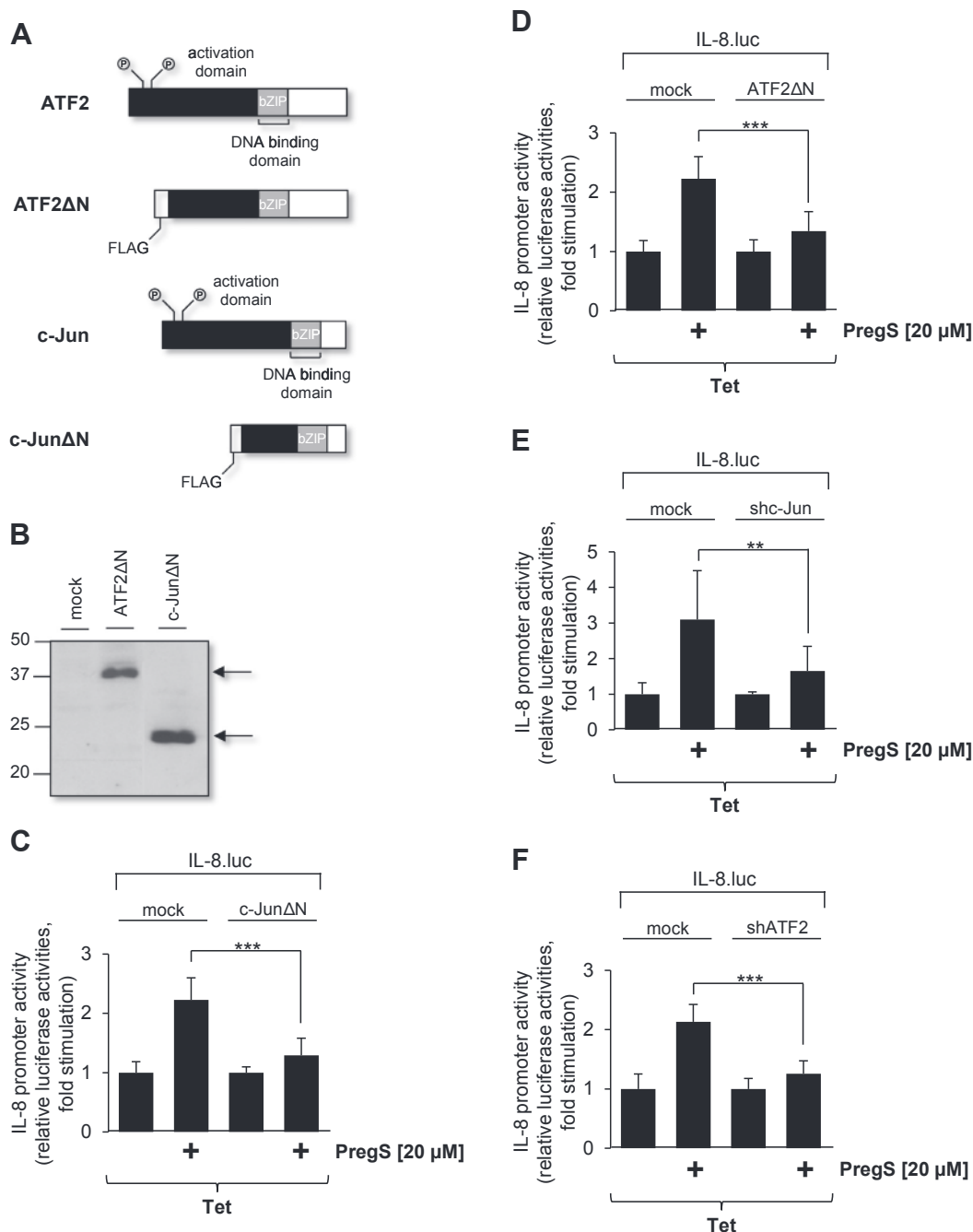


Fig. 3. c-Jun and ATF2 connect TRPM3 activation with IL-8 gene activation. (A) Modular structure of c-Jun and ATF2 and their dominant-negative mutants c-JunΔN and ATF2ΔN. (B) Expression of c-JunΔN and ATF2ΔN in HEK293 cells containing a tetracycline-inducible TRPM3 expression unit. Cells were infected with a control lentivirus generated with the pFUW vector (mock). The Western blot analysis was performed with an antibody directed against the FLAG epitope. (C, D) HEK293 cells containing a tetracycline-inducible TRPM3 expression unit were infected with a lentivirus encoding the IL-8/luciferase reporter gene (IL-8.luc). Cells were also infected with a lentivirus encoding either c-JunΔN (C) or ATF2ΔN (D). We used a lentivirus generated with the lentiviral transfer vector pFUW as a control (mock). The cells were serum-starved, treated with tetracycline and stimulated with pregnenolone sulfate (PregS, 20 μM) as described in the legend to Fig. 1. Cell extracts were prepared and the luciferase activities and protein concentrations were determined. Three independent experiments performed in quadruplicate and data shown are mean \pm SD (***, $P < 0.001$). (E, F) We infected HEK293 cells harboring a tetracycline-inducible TRPM3 expression unit with a lentivirus that contained an IL-8 promoter-controlled reporter gene (IL-8.luc). Cells were also infected with a lentivirus encoding either a c-Jun (E) or an ATF2-specific shRNA. Cells were infected with a lentivirus generated with the vector pLL3.7 as a control (mock). The cells were serum-starved in medium containing tetracycline and stimulated with pregnenolone sulfate (PregS, 20 μM) as described in the legend to Fig. 1. Three independent experiments performed in quadruplicate and data shown are mean \pm SD (**, $P < 0.01$).

8 promoter (Fig. 2E). Thus, the AP-1 site of the IL-8 gene is the hyperforin-responsive element. In contrast, mutation of the NF- κ B site had no effect on IL-8 promoter-regulated gene transcription in cells expressing either activated TRPM3 or TRPC6 channels (Fig. 2D and E).

3.3. The transcription factors c-Jun and ATF2 connect TRPM3 stimulation with increased IL-8 promoter activity

AP-1 is a dimeric transcription factor, composed of bZIP proteins of the Jun, Fos and ATF families of transcription factors. Recently, we showed that c-Jun and ATF2 are required for the activation of AP-1 via

TRPM3 [5]. We therefore asked whether c-Jun and ATF2 are also involved in the stimulation of the IL-8 promoter in TRPM3-expressing HEK293 cells that had been stimulated with pregnenolone sulfate. To analyze the roles of c-Jun and ATF2 in the regulation of TRPM3 channel-induced IL-8 gene transcription, we expressed dominant-negative mutants of either c-Jun or ATF2 (Fig. 3A). The mutants, termed c-Jun Δ N and ATF2 Δ N, lacked the transcriptional activation domains, but retained the bZIP domains, necessary for DNA binding and dimerization. Both mutants were expressed in the cells following lentiviral gene transfer, as shown in Fig. 3B. Next, we measured IL-8 promoter activity in TRPM3-expressing HEK293 cells, either in the presence or absence of the dominant-negative mutants. Fig. 3C and D show that expression of either c-Jun Δ N or ATF2 Δ N attenuated IL-8 promoter-regulated transcription in TRPM3-expressing HEK293 cells that had been stimulated with pregnenolone sulfate. These results indicate that stimulation of TRPM3 channels activated the IL-8 promoter involving c-Jun and ATF2 or dimerization partners of these proteins.

Next, we expressed c-Jun or ATF2-specific short hairpin RNAs in TRPM3-expressing HEK293 cells with the aim to directly prove an involvement of c-Jun and ATF2 in the signaling cascade connecting TRPM3 channels with the IL-8 gene. The biological activities of these shRNAs has been documented in previous publications [5,12,26]. Fig. 3E and F show that knockdown of either c-Jun or ATF2 significantly reduced IL-8 promoter activity in HEK293 cells expressing pregnenolone sulfate-stimulated TRPM3 channels. Together, we conclude that c-Jun and ATF2 are required to increase IL-8 promoter activity following stimulation of TRPM3 channels.

3.4. Ternary complex factors are required to connect TRPM3 stimulation with increased IL-8 promoter activity

Ternary complex factors bind together with a dimer of the serum response factor to the serum-response element which is found within the c-Fos gene regulatory region. The bZIP transcription factor c-Fos dimerizes with c-Jun and constitutes as a c-Fos/c-Jun dimer a functional AP-1 transcription factor complex. Recent data showed that expression of a mutant of the ternary complex factor Elk-1 blocked TRPM3-induced biosynthesis of c-Fos and TRPM3-induced stimulation of AP-1 [6]. To investigate the role of c-Fos within the TRPM3-induced signaling cascade that targets the IL-8 gene, we expressed a dominant negative mutant of Elk-1 (Fig. 4A) in HEK293 cells that harbored an inducible TRPM3-expression unit. As a result, the TRPM3-induced increase in IL-8 promoter activity was significantly reduced (Fig. 4B). These data suggest that c-Fos is also part of the signaling cascade that regulates the IL-8 gene following activation of TRPM3 channels.

3.5. Protein phosphatase MKP-1 attenuates pregnenolone sulfate-induced stimulation of the IL-8 gene promoter in HEK293 cells expressing TRPM3

In pregnenolone sulfate-stimulated TRPM3-expressing HEK293 cells, activation of AP-1 was attenuated by expression of MAP kinase phosphatase-1 (MKP-1) [5]. We therefore asked whether MKP-1 overexpression interferes with the upregulation of IL-8 promoter activity. Fig. 5A shows that in HEK293 cells expressing activated TRPM3 channels, the activity of the IL-8 promoter was almost at basal levels in the presence of MKP-1. These data indicate that active nuclear MAP kinases are required to activate transcription of the IL-8 gene following stimulation of TRPM3 channels.

3.6. The MAP kinase ERK1/2 functions as a signal transducer between activated TRPM3 channels and the IL-8 gene

MKP-1 is a nuclear phosphatase that dephosphorylates and thereby inactivates the MAP kinases ERK, p38 and c-Jun N-terminal protein kinase [27,28]. Recently, we showed that stimulation of TRPM3 channels induced the phosphorylation of ERK1/2 [13], indicating that

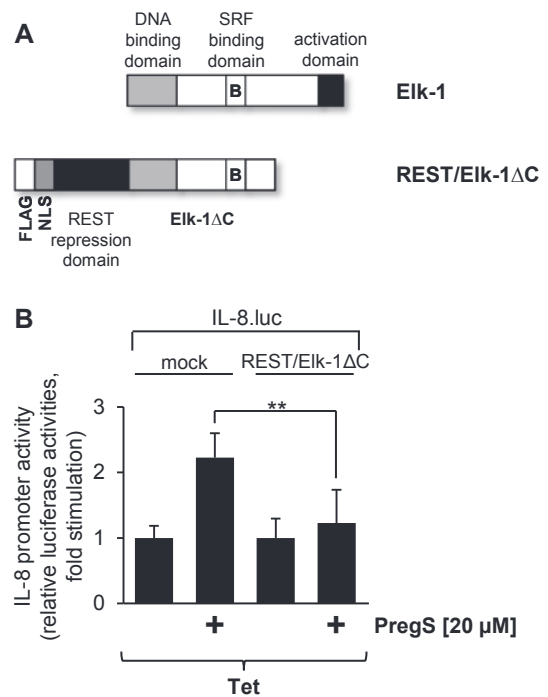


Fig. 4. Ternary complex factor controls IL-8 promoter activity following stimulation of TRPM3 channels. (A) Modular structure of Elk-1 and REST/Elk-1 Δ C, a dominant-negative mutant. (B) HEK293 cells containing a tetracycline-inducible TRPM3 expression unit were infected with lentivirus containing an IL-8 promoter-controlled reporter gene. Cells were additionally mock-infected or infected with a recombinant lentivirus encoding the Elk-1 mutant REST/Elk-1 Δ C. The cells were incubated in serum-reduced medium in the presence of tetracycline and stimulated with pregnenolone sulfate as described in the legend to Fig. 1. Luciferase activities and protein concentrations were measured. Three independent experiments performed in quadruplicate and data shown are mean \pm SD (**, $P < 0.01$).

activation of ERK1/2 is part of the TRPM3-induced signaling cascade. We therefore assessed whether ERK1/2 functions as signal transducer connecting TRPM3 channels with the IL-8 gene. Using a pharmacological approach, we treated the cells with PD98059 to inhibit the ERK1/2 signaling pathway. Fig. 5B shows that incubation of the cells with this compound efficiently blocked the upregulation of IL-8 promoter activity in pregnenolone sulfate-stimulated, TRPM3-expressing HEK293 cells.

These data were corroborated by experiments using the RNA interference technique to reduce the concentrations of ERK1 and ERK2 in the cells. The efficacy of these shRNAs have been shown [13,14]. We functionally tested the ERK1/2-specific shRNAs in HEK293 cells that expressed a conditionally active form of B-Raf (Δ B-Raf:ER) [29] (Fig. 5C). Stimulation of these cells with 4OHT activated the ERK signaling pathway, leading to increased AP-1 activity, as it has been shown recently [30]. Fig. 5C (left panels) shows that stimulation of the ERK1/2 signaling pathway increased IL-8 promoter activity. However, the IL-8 promoter activity was significantly reduced when ERK1 and ERK2 specific shRNAs were expressed. We then assessed whether expression of ERK1/2-specific shRNAs also attenuated IL-8 promoter-regulated gene transcription in HEK293 cells expressing activated TRPM3 channels. Fig. 5D shows that knockdown of ERK1/2 expression almost completely blocked pregnenolone sulfate-induced transcription of an IL-8 promoter-controlled reporter gene in TRPM3 expressing HEK293 cells. We conclude that ERK1/2 functions as signal transducer connecting TRPM3 channels with the IL-8 gene.

4. Discussion

Stimulation of the Ca²⁺ permeable TRPM3 or TRPC6 channels

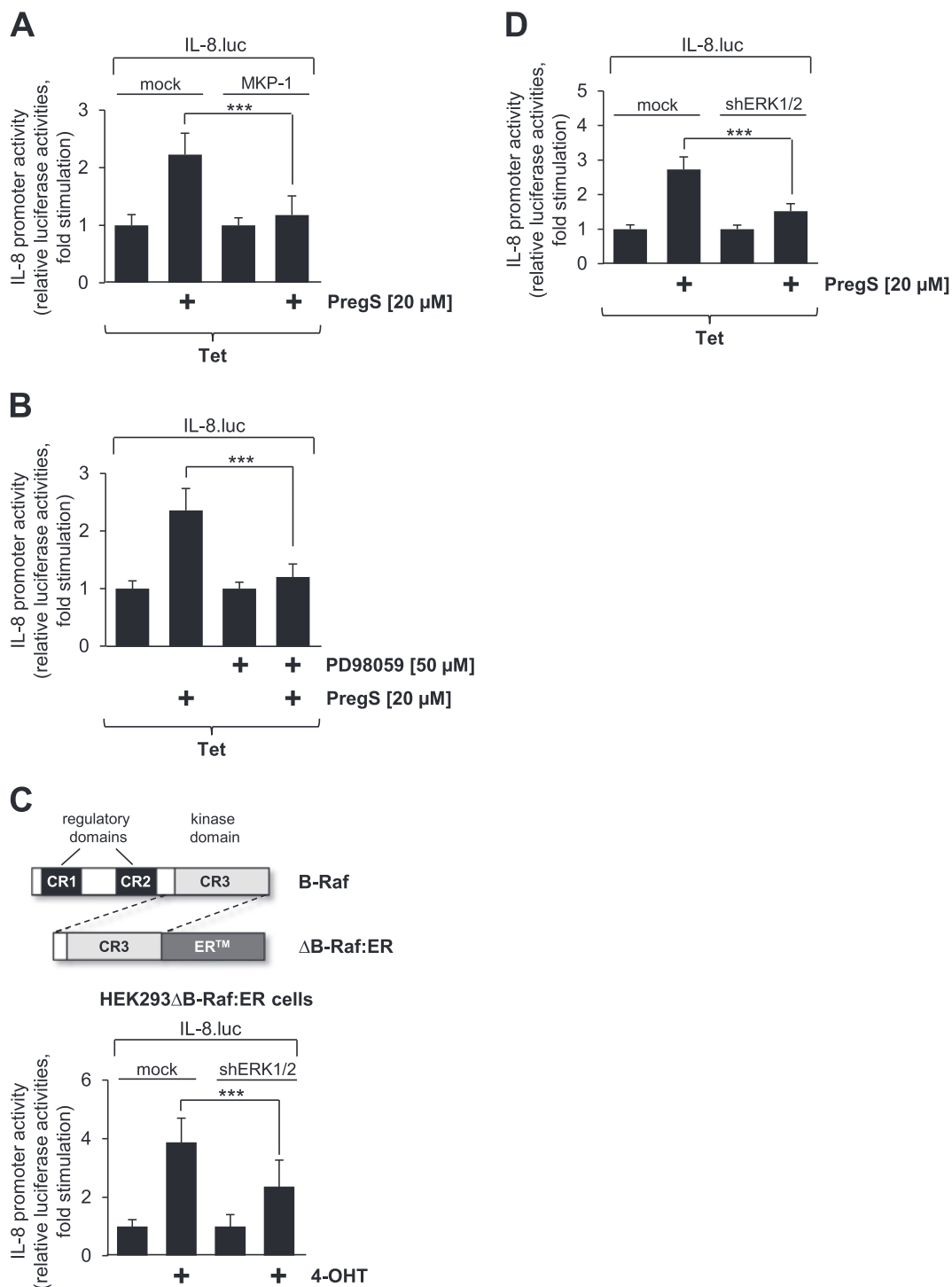


Fig. 5. The protein kinase ERK1/2 is the signal transducer that connects TRPM3 channels with the IL-8 gene. (A) HEK293 cells containing a tetracycline-inducible TRPM3 expression unit were infected with lentivirus containing an IL-8 promoter-controlled reporter gene. Cells were additionally mock-infected or infected with a recombinant lentivirus encoding MKP-1. The cells were incubated in serum-reduced medium in the presence of tetracycline and stimulated with pregnenolone sulfate as described in the legend to Fig. 1. Luciferase activities and protein concentrations were measured. Three independent experiments performed in quadruplicate and data shown are mean \pm SD (***) $P < 0.001$. (B) HEK293 cells containing a tetracycline-inducible TRPM3 expression unit were infected with a recombinant lentivirus containing the IL-8 promoter-controlled luciferase reporter gene (IL-8.luc). The cells were incubated for 24 h in medium containing 0.05% serum and tetracycline (1 μ g/ml), and preincubated for 3 h with PD98059 (50 μ M). Stimulation of the cells with pregnenolone sulfate (PregS, 20 μ M) was performed for 24 h in the presence of PD98059. Luciferase activities and protein concentrations were measured from the cellular extracts. Three independent experiments performed in quadruplicate and data shown are mean \pm SD (***) $P < 0.001$. (C) Modular structure of B-Raf and the conditionally active form Δ B-Raf:ER. HEK293/ Δ B-Raf:ER cells were infected with a lentivirus encoding a reporter gene under the control of the IL-8 promoter (IL-8.luc). Cells were additionally infected with lentiviruses that encoded ERK1 and ERK2-specific shRNAs. We used the pLL3.7 vector to produce a control lentivirus (mock). Stimulation of the cells was performed for 24 h with 4OHT (100 nM). Cellular extracts were used to measure luciferase activities and protein concentrations. Three independent experiments performed in quadruplicate and data shown are mean \pm SD (***) $P < 0.001$. (D) HEK293 cells that harbored a tetracycline-inducible TRPM3 expression unit were infected with a lentivirus containing the IL-8.luc. Cells were also infected with a control lentivirus or with lentiviruses that encoded ERK1 and ERK2-specific shRNAs. The cells were serum-starved, treated with tetracycline and stimulated with pregnenolone sulfate (PregS, 20 μ M) as described in the legend to Fig. 1. Three independent experiments performed in quadruplicate and data shown are mean \pm SD (***) $P < 0.001$.

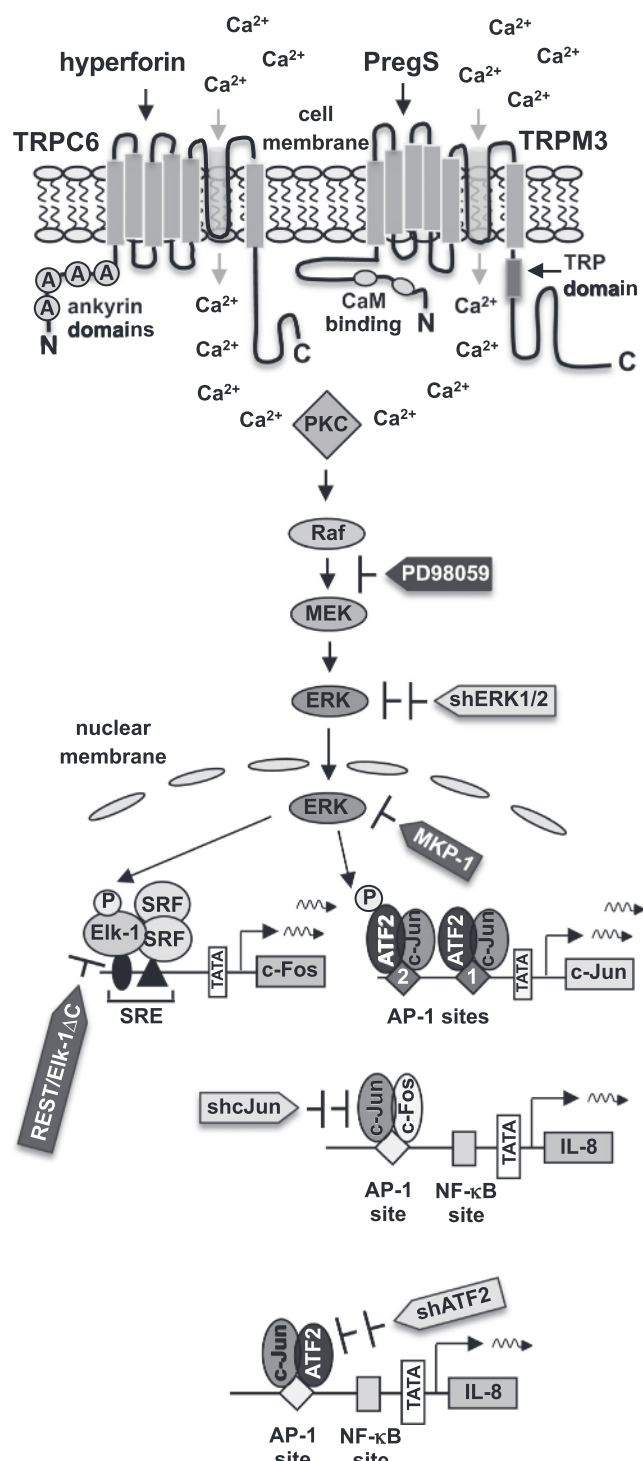


Fig. 6. Signaling cascade connecting activation of either TRPM3 or TRPC6 channels with IL-8 gene transcription. TRPM3 channels are activated with pregnenolone sulfate, while hyperforin activates TRPC6 channels. The cytosolic Ca^{2+} concentration is increased via an influx of Ca^{2+} ions from outside into the cells. This rise in intracellular Ca^{2+} triggers the activation of ERK1/2 which is subsequently translocated into the nucleus following activation. The phosphorylation and activation of ERK1/2 is impaired in the presence of the compound PD98059. Expression of short hairpin RNAs specific for ERK1 and ERK2 reduces the concentration of these kinases in the cytosol. In the nucleus, MKP-1 dephosphorylates and inactivates ERK1/2. Nuclear ERK1/2 activates the transcription of the c-Jun and c-Fos genes, leading to an upregulation of the biosynthesis of both transcription factors that constitute the AP-1 transcription factor complex. In addition c-Jun, c-Fos and ATF2 are phosphorylated, leading to an upregulation of their transcriptional activation potentials. AP-1, either as c-Jun/c-Fos dimer or as c-Jun/ATF2 dimer, binds to the AP-1 site within the IL-8 gene and activates transcription of the IL-8 gene.

activates the transcription factor AP-1 [3–5,10,13]. Thus, TRPM3 and TRPC6 channel stimulation is connected with the biological functions controlled by AP-1. AP-1 binds to the regulatory regions of delayed response genes and activates transcription of these genes. The gene products of these delayed response genes induce the changes in the biochemistry of the cells as a result of either TRPM3 or TRPC6 stimulation. Thus, to understand the intracellular functions of TRPM3 and TRPC6 stimulation, it is essential to identify the delayed response genes of AP-1 and other stimulus-responsive transcription factors that are activated as a result of TRPM3 or TRPC6 stimulation. In searching for AP-1-responsive genes, we analyzed the IL-8 gene, because many extracellular signaling molecules including cytokines, reactive oxygen species, and ligands of plasma membrane receptors regulate the transcription of the IL-8 gene. In addition, it has been shown that hyperforin activates IL-8 expression in human intestinal epithelial cells [22]. As hyperforin functions as a ligand for TRPC6 channels, we hypothesized that hyperforin-induced activation of the IL-8 gene is mediated by TRPC6. We thus included hyperforin-stimulated T6.11 cells that expressed TRPC6 channels in our analysis.

We identified the IL-8 gene as a delayed response gene of the pregnenolone sulfate/TRPM3 and the hyperforin/TRPC6-induced signaling pathways. At the level of gene regulation, many signaling molecules that induce an upregulation of IL-8 gene transcription, require either the AP-1 or NF- κ B site, or both sites of the IL-8 promoter. The results presented here show that the AP-1 site of the IL-8 gene functions as a pregnenolone sulfate-responsive element and as a hyperforin-responsive element, connecting pregnenolone sulfate and hyperforin-induced activation of AP-1 with increased IL-8 promoter activity. Mutation of the NF- κ B site of the IL-8 promoter had no effect on reporter gene transcription, regulated by the IL-8 promoter, in HEK293 cells expressing stimulated TRPM3 or TRPC6 channels. This is in contrast to signaling cascades induced by gastrin in human gastric cancer cells, TNF α in human airway epithelial cells, or bcl-xL overexpression in human glioma cells, where NF- κ B is essential for stimulation of IL-8 gene transcription [31–33]. In addition, we previously demonstrated that AP-1 but not NF- κ B activation was indispensable for constitutive IL-8 gene transcription in human hepatocellular carcinoma cell lines [34]. Since hepatocellular carcinoma cells expressed abundantly TRPC6 [35], calcium channel activation may be able to induce IL-8 gene transcription solely through induction of AP-1 activation.

AP-1 was initially described as a heterodimer of the bZIP proteins c-Jun and c-Fos [36]. Later on, c-Jun and c-Fos homologous proteins were identified in AP-1 complexes. Furthermore, ATF proteins such as ATF2 were shown to dimerize with proteins of the c-Jun family and constitute a functional AP-1 transcription factor. The data presented here show that c-Jun and ATF2 are required to stimulate the IL-8 promoter in HEK293 cells expressing activated TRPM3 channels. Moreover, we present evidence that the bZIP protein c-Fos is also part of the signaling cascade that connects TRPM3 channels with the IL-8 gene. We recently showed that expression of a dominant-negative mutant of Elk-1 prevented the activation of AP-1 in stimulated TRPM3-expressing HEK293 cells [5]. The Elk-1 mutant attenuated the TRPM3-induced upregulation of c-Fos expression by interfering with the serum responsive element within the c-Fos gene [6]. The fact that c-Fos, c-Jun, and ATF2 regulate IL-8 gene transcription is in good agreement with the observation that TRPM3 channel stimulation increased the transcriptional activation potential of these bZIP proteins [5,6,37].

Genetic and pharmacological experiments revealed that protein kinase ERK1/2 functions as signal transducer for connecting pregnenolone sulfate stimulation of TRPM3 channels with the IL-8 gene. ERK1/2 is phosphorylated and activated in pregnenolone sulfate-stimulated HEK293 cells that express TRPM3 channels [13]. The experiments involving overexpression of the nuclear phosphatase MKP-1 indicate that phosphorylated ERK1/2 is required in the nucleus for activating the IL-8 promoter. Interestingly, previous results showed that hyperforin-induced activation of IL-8 expression also requires a MAP kinase-

dependent pathway in human intestinal epithelial cells [22].

5. Conclusion

Stimulation of TRPM3 or TRPC6 channels activates the stimulus-responsive transcription factor AP-1. This study showed that the IL-8 gene functions as a delayed response gene for the signaling cascade triggered by the activation of TRPM3 or TRPC6 channels. The data show that the AP-1 site of the IL-8 gene functions as a pregnenolone sulfate and hyperforin-responsive element, connecting TRPM3 and TRPC6 channel activation with the IL-8 gene. The bZIP proteins c-Jun, c-Fos and ATF2 were identified as essential constituents of the AP-1 transcription factor complex, regulating the activation of IL-8-regulated gene transcription following stimulation of TRPM3 channels. Finally, the protein kinase ERK1/2 was identified as signal transducer that connects TRPM3 channel activation with the IL-8 gene. The signaling pathway connecting TRPM3 and TRPC6 channel stimulation with the IL-8 gene is depicted in Fig. 6.

Acknowledgements

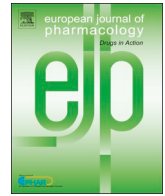
We thank David Beech and Yasser Majeed for their generous gift of HEK293 cells containing a tetracycline-regulated TRPM3 expression unit, Alexandre Bouron and Guylain Boulay for T6.11 cells, Clemens Erdelmeier for his kind gift of hyperforin, and Jong-In Park for the ERK1sh-encoding plasmid. We thank Libby Guethlein for critical reading of the manuscript and Oliver Rössler for artwork. This study was supported by the Saarland University and partly by an Extramural Collaborative Research Grant of Cancer Research Institute, Kanazawa University.

Competing interests.

The authors declare that they have no competing interests.

References

- G. Thiel, S. Rubil, A. Lesch, L.A. Guethlein, O.G. Rössler, Transient receptor potential TRPM3 channels: pharmacology, signaling, and biological functions, *Pharmacol. Res.* 124 (2017) 92–99.
- S.I. Mayer, I. Müller, S. Mannebach, T. Endo, G. Thiel, Signal transduction of pregnenolone sulfate in insulinoma cells. Activation of Egr-1 expression involving TRPM3, voltage-gated calcium channels, ERK, and ternary complex factors, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 10084–10096.
- I. Müller, O.G. Rössler, G. Thiel, Pregnenolone sulfate activates basic region leucine zipper transcription factors in insulinoma cells: role of voltage-gated Ca²⁺ channels and transient receptor potential melastatin 3 channels, *Mol. Pharmacol.* 80 (2011) 1179–1189.
- A. Lesch, S. Rubil, G. Thiel, Activation and inhibition of transient receptor potential TRPM3-induced gene transcription, *Br. J. Pharmacol.* 171 (2014) 2645–2658.
- A. Lesch, X. Hui, P. Lipp, G. Thiel, Transient receptor potential melastatin-3 (TRPM3)-induced activation of AP-1 requires Ca²⁺ ions and the transcription factors c-Jun, ATF2, and ternary complex factor, *Mol. Pharmacol.* 87 (2015) 617–628.
- S. Rubil, O.G. Rössler, G. Thiel, CREB, AP-1, ternary complex factors and MAP kinases connect transient receptor potential melastatin-3 (TRPM3) channel stimulation with increased c-Fos expression, *Br. J. Pharmacol.* 173 (2016) 305–318.
- E. Shaulian, M. Karin, AP-1 as a regulator of cell life and death, *Nat Cell Biol.* 4 (2002) E131–E136.
- J. Naylor, C.J. Milligan, F. Zeng, C. Jones, D.J. Beech, Production of a specific extracellular inhibitor of TRPM3 channels, *Br. J. Pharmacol.* 155 (2008) 567–573.
- G. Boulay, Z. Zhu, M. Peyton, M. Jiang, R. Hurst, E. Stefani, L. Birnbaumer, Cloning and expression of a novel mammalian homolog of *Drosophila transient receptor potential* (Trp) involved in calcium entry secondary to activation of receptors coupled by the G_q class of G protein, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 29672–29680.
- G. Thiel, O.G. Rössler, Hyperforin activates gene transcription involving transient receptor potential C6 channels, *Biochem. Pharmacol.* 129 (2017) 96–107.
- A. Sarraj, R.M. Day, G. Thiel, Specificity of transcriptional regulation by the zinc finger transcription factors Sp1, Sp3 and Egr-1, *J. Cell. Biochem.* 94 (2005) 153–167.
- A. Keim, O.G. Rössler, T.L. Rothhaar, G. Thiel, Arsenite-induced apoptosis of human neuroblastoma cells requires p53 but occurs independently of c-Jun, *Neuroscience* 206 (2012) 25–38.
- A. Lesch, O.G. Rössler, G. Thiel, Extracellular signal-regulated protein kinase, c-Jun N-terminal protein kinase, and calcineurin regulate transient receptor potential M3 (TRPM3) induced activation of AP-1, *J. Cell. Biochem.* 118 (2017) 2409–2419.
- S.-K. Hong, S. Yoon, C. Moelling, D. Arthan, J.-I. Park, Noncatalytic function of ERK1/2 can promote Raf/MEK/ERK-mediated growth arrest signaling, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 33006–33018.
- A. Keim, I. Müller, G. Thiel, Efficient genetic manipulation of 1321N1 astrocytoma cells using lentiviral gene transfer, *J. Neurosci. Meth.* 206 (2012) 138–142.
- O.G. Rössler, G. Thiel, Regulation of gene transcription following stimulation of G_{αq}-coupled designer receptors, in: G. Thiel (Ed.), *Designer receptors exclusively activated by designer drugs*, Humana Press, New York, Neuromethods, 2015, pp. 49–60.
- N. Mukaida, M. Morita, Y. Ishikawa, N. Rice, S.-I. Okamoto, T. Kasahara, K. Matsushima, Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression. Nuclear factor-κB is target for glucocorticoid-mediated interleukin 8 gene repression, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 13289–13295.
- S. Jeong, A. Stein, Micrococcal nuclease digestion of nuclei reveals extended nucleosome ladders having anomalous DNA lengths for chromatin assembled on non-replicating plasmids in transfected cells, *Nucl. Acids Res.* 22 (1994) 370–375.
- C.L. Smith, G.L. Hager, Transcriptional regulation of mammalian genes in vivo, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 27493–27496.
- C. Klose, I. Straub, M. Riehle, F. Ranta, D. Krautwurst, S. Ullrich, W. Mayerhof, C. Harteneck, Fenamates as TRP channel blocker: mefenamic acid selectively blocks TRPM3, *Brit. J. Pharmacol.* 162 (2011) 1757–1769.
- I. Straub, F. Mohr, M. Konrad, S.E. Philipp, J. Oberwinkler, M. Schaefer, Citrus fruit and fabacea secondary metabolites potently and selectively block TRPM3, *Brit. J. Pharmacol.* 168 (2013) 1835–1850.
- C. Zhou, M.M. Tabb, A. Sadatrafiei, F. Grün, A. Sun, B. Blumberg, Hyperforin, the active component of St. John's wort, induces IL-8 expression in human intestinal epithelial cells via a MAPK-dependent, NF-κB-independent pathway, *J. Clin. Immunol.* 24 (2004) 623–636.
- K. Leuner, V. Kazanski, M. Müller, K. Essin, B. Henke, M. Gollasch, C. Harteneck, W.E. Müller, Hyperforin – a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels, *FASEB J.* 21 (2007) 4101–4111.
- T.S. Sell, T. Belkacemi, V. Flockerci, A. Beck, Protonophore properties of hyperforin are essential for its pharmacological activity, *Sci. Rep.* 4 (2014) 7500.
- H. Soni, A. Abeyiyi, TRPC6 channel activation promotes neonatal glomerular mesangial cell apoptosis via calcineurin/NFAT and FasL/Fas signaling pathways, *Sci. Rep.* 6 (2016) 29041.
- A. Freund, V. Jolivel, S. Durand, N. Kersual, D. Chalbos, C. Chavey, F. Vignon, G. Lazennec, Mechanisms underlying differential expression of interleukin-8 in breast cancer cells, *Oncogene* 23 (2004) 6105–6114.
- P.S. Shapiro, N.G. Ahn, Feedback regulation of Raf-1 and mitogen-activated protein kinase (MAP) kinase kinase 1 and 2 by MAP kinase phosphatase-1 (MKP-1), *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 1788–1793.
- D.N. Slack, O.-M. Seternes, M. Gabrielsen, S.M. Keyse, Distinct binding determinants for ERK2/p38α and JNK MAP kinases mediate catalytic activation and substrate selectivity of MAP kinase phosphatase-1, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 16491–16500.
- G. Thiel, M. Ekici, O.G. Rössler, Regulation of cellular proliferation, differentiation and cell death by activated Raf, *Cell. Commun. Signal.* 7 (2009) 8.
- A. Kaufmann, A. Keim, G. Thiel, Regulation of immediate-early gene transcription following activation of G_{αq}-coupled designer receptors, *J. Cell. Biochem.* 114 (2013) 681–696.
- J. Li, S. Kartha, S. Iasvovskaia, A. Tan, R.K. Bhat, J.M. Manaligod, K. Page, A.R. Brasier, M.B. Hershenson, Regulation of human airway epithelial cell IL-8 expression by MAP kinases, *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 283 (2002) L690–L699.
- C. Gabellini, L. Castellini, D. Trisciuglio, M. Kracht, G. Zupi, D. Del Bufalo, Involvement of nuclear factor-kappa B in bcl-xL-induced interleukin 8 expression in glioblastoma, *J. Neurochem.* 107 (2008) 871–882.
- D. Subramaniam, S. Ramalingam, R. May, B.K. Dieckgraefe, D.E. Berg, C. Pothoulakis, C.W. Houchen, T.C. Wang, S. Anant, Gastrin-mediated interleukin-8 and cyclooxygenase-2 gene expression: differential transcriptional and post-transcriptional mechanism, *Gastroenterology* 134 (2008) 1070–1082.
- A. Iguchi, I. Kitajima, M. Yamakuchi, S. Ueno, T. Aikou, T. Kubo, K. Matsushima, N. Mukaida, I. Maruyama, PEA3 and AP-1 are required for constitutive IL-8 gene expression in hepatoma cells, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 279 (2000) 166–171.
- L. Wen, C. Liang, E. Chen, W. Chen, F. Liang, X. Zhi, T. Wie, F. Xue, G. Li, Q. Yang, W. Gong, X. Feng, X. Bai, T. Liang, Regulation of multi-drug resistance in hepatocellular carcinoma cells is TRPC6/calcium dependent, *Sci. Rep.* 6 (2016) 23269.
- R. Chiu, W.J. Boyle, J. Meek, T. Smeal, T. Hunter, M. Karin, The c-fos protein interacts with c-jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes, *Cell* 54 (1988) 541–552.
- S. Rubil, G. Thiel, Activation of gene transcription via CIM0216, a synthetic ligand of transient receptor potential melastatin-3 (TRPM3) channels, *Channels (Austin)* 11 (2017) 79–83.



Molecular and cellular pharmacology

Stimulation of TRPM3 channels increases the transcriptional activation potential of Elk-1 involving cytosolic Ca²⁺, extracellular signal-regulated protein kinase, and calcineurin

Sandra Rubil, Gerald Thiel*

Department of Medical Biochemistry and Molecular Biology Saarland University Medical Faculty, Building 44, D-66421 Homburg, Germany



ARTICLE INFO

Keywords:

Calcineurin
Elk-1
ERK
Pregnenolone sulfate
TRPM3

ABSTRACT

Stimulation of transient receptor potential M3 (TRPM3) channels with the steroid pregnenolone sulfate increases the transcriptional activation potential of Elk-1, a transcription factor that regulates serum response element-mediated transcription. Here, we show that an influx of Ca²⁺ ions into the cells is essential for the activation of Elk-1 following stimulation of TRPM3. Using genetically encoded Ca²⁺ buffers, we show that a rise in cytoplasmic Ca²⁺ is required for the upregulation of the transcriptional activation potential of Elk-1, while buffering of Ca²⁺ in the nucleus had no inhibitory effect on the transcriptional activity of Elk-1. Pharmacological and genetic experiments showed that extracellular signal-regulated protein kinase (ERK1/2) functions as signal transducer connecting TRPM3 channels with the Elk-1 transcription factor. Accordingly, dephosphorylation of ERK1/2 in the nucleus by MAP kinase phosphatase attenuated TRPM3-mediated Elk-1 activation. Moreover, we show that the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin is part of a shut-off-device for the signaling cascade connecting TRPM3 channels with the activation of Elk-1. The fact that TRPM3 channel stimulation activates Elk-1 connects TRPM3 with the biological functions of Elk-1, including the regulation of proliferation, differentiation, survival, transcription, and cell migration.

1. Introduction

Transient receptor potential M3 (TRPM3) channels are non-selective cation channels that regulate many biological functions, for example vascular smooth muscle cell contraction, glutamatergic neurotransmission, insulin secretion, heat sensation in sensory neurons and growth of renal carcinoma cells (Thiel et al., 2017). Stimulation of TRPM3 channels leads to the activation of stimulus-inducible transcription factors (Mayer et al., 2011; Müller et al., 2011; Lesch et al., 2014, 2015; Rubil et al., 2016). Recently, we showed that stimulation of TRPM3 channels upregulates the transcriptional activation potential of Elk-1 (Lesch et al., 2014). Elk-1 is a ternary complex factor (TCF) that interacts with DNA and forms with a dimer of the serum response factor (SRF) a ternary complex that mediates serum response element (SRE)-mediated gene transcription (Sharrocks, 2001; Shaw and Saxton, 2003). Elk-1 also regulates the transcription factor AP-1 (Müller et al., 2011, 2012; Thiel et al., 2012; Kaufmann et al., 2013; Thiel and Rössler, 2014). Elk-1 is a major nuclear substrate for the MAP kinases extracellular signal-regulated protein kinase (ERK1/2), p38, and c-Jun N-

terminal protein kinase (JNK) (Whitmarsh et al., 1997; Yang et al., 1998). Phosphorylation of Elk-1 connects intracellular MAP kinase activation with gene transcription. Numerous biological functions have been connected with Elk-1, including proliferation of astrocytes, growth of prostate cancer cells, development of thymocytes, and cell migration (Mayer et al., 2009; Costello et al., 2010; Odrowaz and Sharrocks, 2012; Patki et al., 2013). In the nervous system, Elk-1 has been proposed to support neuronal survival, but also influences depressive behavior (Anglada-Huguet et al., 2012; Apazoglou et al., 2018). An analysis of the Elk-1 target gene network revealed that Elk-1 regulates core components of the gene regulatory machinery (Boros et al., 2009).

Here, we have analyzed the signaling cascade connecting TRPM3 channels with Elk-1. The results of this study show that TRPM3-mediated activation of Elk-1 requires the influx of Ca²⁺ ions into the cells and a rise in cytosolic Ca²⁺. The activation of ERK1/2 is necessary to connect the TRPM3-triggered cytosolic signaling cascade with the activation of Elk-1. This signaling cascade is interrupted by the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin.

* Corresponding author.

E-mail address: gerald.thiel@uks.eu (G. Thiel).<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.12.020>

Received 23 October 2018; Received in revised form 10 December 2018; Accepted 11 December 2018

Available online 12 December 2018

0014-2999/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

HEK293 cells containing the human TRPM3 coding region under the control of a tetracycline-regulated promoter were kindly provided by D. Beech and Y. Majeed, University of Leeds, UK. Cells were cultured and stimulated as described (Naylor et al., 2008; Lesch et al., 2014; Rubil et al., 2016). The compound PD98059 was used as described previously (Mayer et al., 2011).

2.2. Lentiviral gene transfer

The lentiviral transfer vectors pFUW-mCherry, pFUW-NES-PVCherry, pFUW-NLS-PVCherry, pFUW-MKP-1, pFUW-PP2C, pFUW Δ CnA, and pFUW-GAL4-Elk-1 have been described previously (Mayer et al., 2008; Rössler et al., 2008; Thiel and Rössler, 2011; Müller et al., 2012). The viral particles were produced as described (Keim et al., 2012; Rössler and Thiel, 2015).

2.3. Reporter assays

The lentiviral transfer vectors pFUWAS⁵Sp1².luc has been described elsewhere (Thiel and Rössler, 2011). Cells were lysed with reporter lysis buffer (Promega, Mannheim, Germany). Luciferase activity was determined and normalized to the protein concentration. The mean \pm S.D. from at least three independent experiments performed in quadruplicate is shown.

2.4. Lentiviral expression of short hairpin RNAs (shRNAs)

The lentiviral transfer vector pLL3.7ERK1 and pLL3.7ERK2 have been described (Hong et al., 2009; Lesch et al., 2017).

2.5. Microscopy

Phase contrast and mCherry fluorescence microscopy was done with a Zeiss Axiovert 200 M microscope equipped with the appropriate filter.

2.6. Statistics

Statistical analyses were performed as described (Rubil et al., 2016).

3. Results

3.1. TRPM3-induced upregulation of the transcriptional activation potential of Elk-1 requires an influx of Ca²⁺ ions into the cells

Recently, we showed that stimulation of TRPM3 channels leads to an upregulation of the transcriptional activation potential of Elk-1 (Lesch et al., 2014). TRPM3 channels are Ca²⁺ permeable cation channels (Wagner et al., 2008; Majeed et al., 2011) and an influx of Ca²⁺ into the cells has been shown to be necessary for TRPM3-mediated transcriptional regulation by the transcription factors Egr-1 and AP-1 (Mayer et al., 2011; Lesch et al., 2015). Therefore, we assessed the role of extracellular Ca²⁺ ions in TRPM3-induced activation of Elk-1 in HEK293 cells expressing TRPM3 channels. We used these cells instead of TRPM3-expressing insulinoma cells to avoid an interference of TRPM3 channels and L-type voltage-gated Ca²⁺ channels (Lesch et al., 2015, 2017). As a sensor for Elk-1 activity, we expressed a fusion protein consisting of the DNA binding of the yeast transcription factor GAL4, fused to the transcriptional activation domain of Elk-1 (Fig. 1A). The use of the GAL4-Elk-1 system allowed us to directly measure the transcriptional activity of Elk-1 without the involvement of SRF or the SRE. The biological activity of GAL4-Elk-1 was measured with a chromatin-embedded reporter gene that contained binding sites for GAL4 in

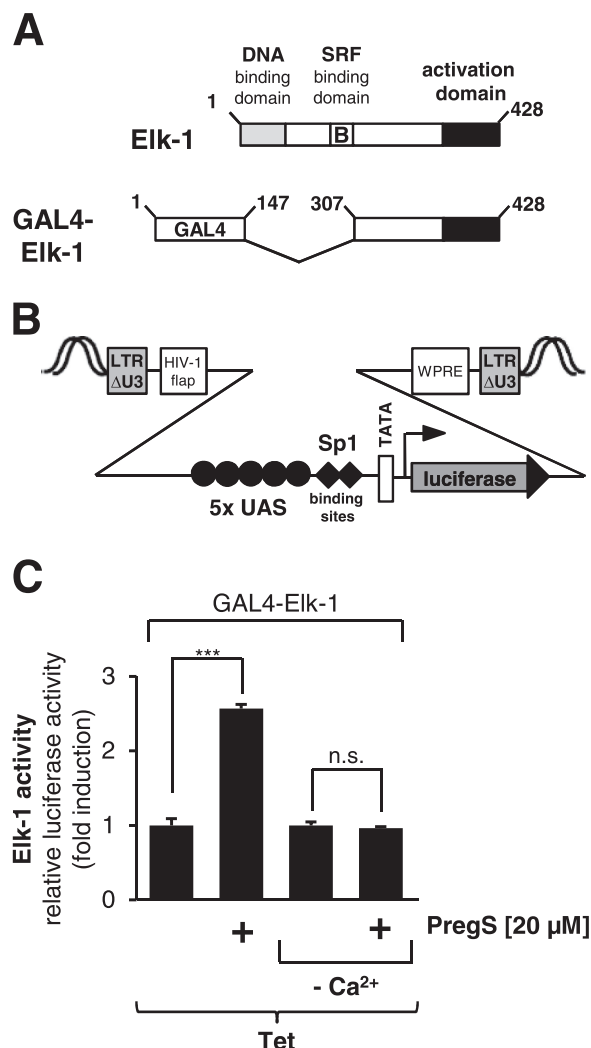


Fig. 1. Activation of Elk-1 in pregnenolone sulfate-stimulated HEK293 cells expressing TRPM3 requires an influx of Ca²⁺ ions. (A) Schematic representation of the modular structure of Elk-1 and GAL4-Elk-1. Elk-1 is phosphorylated on serine residues 383 and 389. The B-domain is responsible for the protein-protein interaction with the serum response factor (SRF). The GAL4-Elk-1 fusion protein lacks the DNA and SRF binding domains of Elk-1, but retains the phosphorylation-regulated C-terminal activation domain. (B) Schematic representation of a provirus containing the GAL4-responsive reporter gene UAS⁵Sp1².luc. (C) HEK293 cells containing a tetracycline regulated transcription unit for expression of TRPM3 were infected with a lentivirus containing a GAL4-responsive luciferase reporter gene. In addition, cells were infected with a lentivirus encoding GAL4-Elk-1. The cells were serum-starved for 24 h in either DMEM or Ca²⁺-free medium in the presence of tetracycline to induce TRPM3 expression. Cells were stimulated with pregnenolone sulfate (PregS, 20 μM) for 24 h. Cell extracts were prepared and analyzed for luciferase activities. Luciferase activity was normalized to the protein concentration. Data shown are mean \pm S.D. of three independent experiments performed in quadruplicate (***, $P < 0.001$, n.s., not significant).

its regulatory region. The incorporation of the reporter gene into the chromatin of the cells ensured that the reporter gene was packed into an ordered nucleosomal structure (Fig. 1B) and did not resemble a prokaryotic gene organisation with a nonrestricted transcriptional ground state. Fig. 1C shows that the transcriptional activation potential of Elk-1 was significantly increased in HEK293 cells expressing activated TRPM3 channels. The upregulation of the transcriptional activation potential of Elk-1 was completely blocked when we cultured the cells in Ca²⁺-free medium (Fig. 1C). These results indicate that an

influx of Ca^{2+} ions into the cells is essential to connect TRPM3 stimulation with increased Elk-1 activity.

3.2. A rise in cytoplasmic $[\text{Ca}^{2+}]$ is required to activate Elk-1 following stimulation of TRPM3 channels

The roles of cytoplasmic and/or nuclear Ca^{2+} for transcription

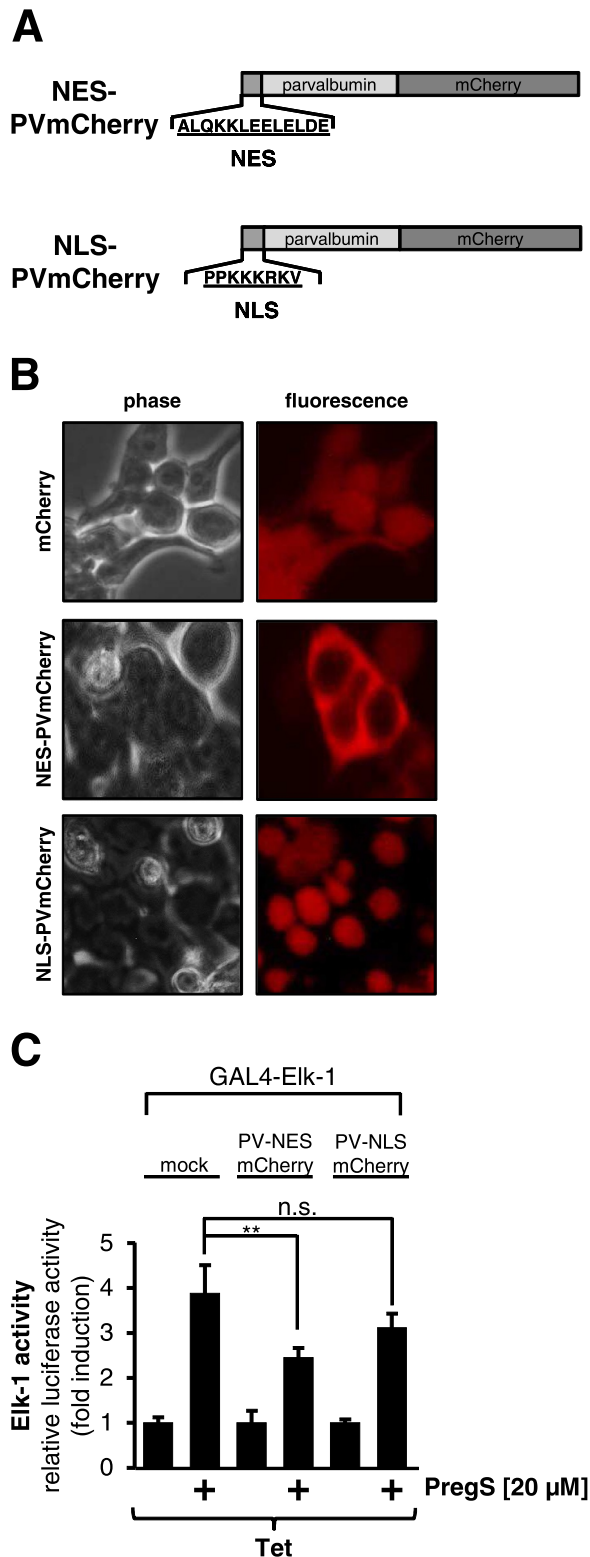


Fig. 2. TRPM3-mediated upregulation of the transcriptional activation potential of Elk-1 requires a rise in cytoplasmic Ca^{2+} . (A) Modular structure of the Ca^{2+} -buffering proteins NES-PVmCherry and NLS-PVmCherry containing either a nuclear export signal (NES) to direct expression to the cytosol, or a nuclear localization signal (NLS) to direct expression to the nucleus. (B) Phase contrast and fluorescence images of HEK293 cells containing a tetracycline-inducible TRPM3 expression unit. The cells were infected with lentiviruses encoding either mCherry (top), NES-PVmCherry (middle), or NLS-PVmCherry (bottom). (C) HEK293 cells containing a tetracycline-inducible TRPM3 transcription unit were infected with a lentivirus encoding a GAL4-Elk-1 fusion protein and a lentivirus containing the GAL4-responsive reporter gene $\text{UAS}^{\text{Sp1}}2.\text{luc}$. In addition, cells were infected with a lentivirus encoding either mCherry, NES-PVmCherry, or NLS-PVmCherry. The cells were serum-starved for 24 h in the presence of tetracycline (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and then stimulated with pregnenolone sulfate (PregS, 20 μM) for 24 h. Cell extracts were prepared and analyzed for luciferase activities. Data shown are mean \pm S.D. of three independent experiments performed in quadruplicate (**, $P < 0.01$, n.s., not significant).

factor activation have been investigated in several studies. A rise in nuclear $[\text{Ca}^{2+}]$ has been shown to be essential for the stimulation of the transcription factor NFAT4 (Kar and Parekh, 2015), while a rise in cytoplasmic $[\text{Ca}^{2+}]$ is essential for induction of the transcription factor AP-1 in glucose-stimulated insulinoma cells (Müller et al., 2012). To assess the importance of cytoplasmic and nuclear $[\text{Ca}^{2+}]$ in the TRPM3-induced activation of Elk-1, we expressed the Ca^{2+} binding protein parvalbumin (PV) either in the cytosol or in the nucleus as a fusion protein together with mCherry. Parvalbumin is a small protein that binds Ca^{2+} via two EF-hand motifs. The modular structure of the PVmCherry fusion proteins is depicted in Fig. 2A. As a control, cells were infected with an mCherry-encoding lentivirus. Fig. 2B shows that the nuclear export sequence (NES)-containing PV-mCherry fusion protein was expressed in the cytosol, while the nuclear localization sequence (NLS)-tagged PV-mCherry fusion protein was expressed in the nucleus. mCherry was found in the cytosol and in the nucleus. When the rise in cytoplasmic $[\text{Ca}^{2+}]$ was buffered in TRPM3-expressing HEK293 cells by expressing the cytosolic Ca^{2+} buffer, NES-PVmCherry, the TRPM3-induced increase in Elk-1 activity was significantly reduced. In contrast, the expression of the nuclear Ca^{2+} buffer, NLS-PVmCherry, did not significantly reduce the transcriptional activation potential of Elk-1. Hence, a rise in cytoplasmic $[\text{Ca}^{2+}]$ is essential for the stimulation of Elk-1 in pregnenolone sulfate-stimulated TRPM3-expressing HEK293 cells.

3.3. Inhibition of the ERK1/2 signaling pathway attenuates TRPM3-induced activation of Elk-1

Activation of ERK1/2 is a key event in controlling expression of the transcription factor Egr-1 following TRPM3 stimulation (Mayer et al., 2011). Recently, we showed that stimulation of TRPM3 channels with pregnenolone sulfate induced a transient phosphorylation, i.e. activation of ERK1/2 (Lesch et al., 2017). This observation confirms previous data that showed that ERK1/2 is activated in many cell types as a result of increased intracellular Ca^{2+} concentrations. We therefore assessed whether ERK1/2 is required for the upregulation of the transcriptional activation potential of Elk-1 following stimulation of TRPM3 channels with pregnenolone sulfate. We used genetic and pharmacological tools to disrupt the ERK1/2 signaling pathway.

First, we treated HEK293 cells containing a tetracycline-inducible expression unit of TRPM3 with PD98059, a compound that blocks phosphorylation of the MAP kinase kinase by Raf. It has been shown that treatment of brain slices with PD98059 blocks phosphorylation of ERK1/2 and Elk-1 following stimulation with glutamate (Vanhoutte et al., 1999). The cells were infected with a lentivirus encoding GAL4-Elk-1. In addition, cells were infected with a lentivirus containing the GAL4-responsive reporter gene. We preincubated the cells with

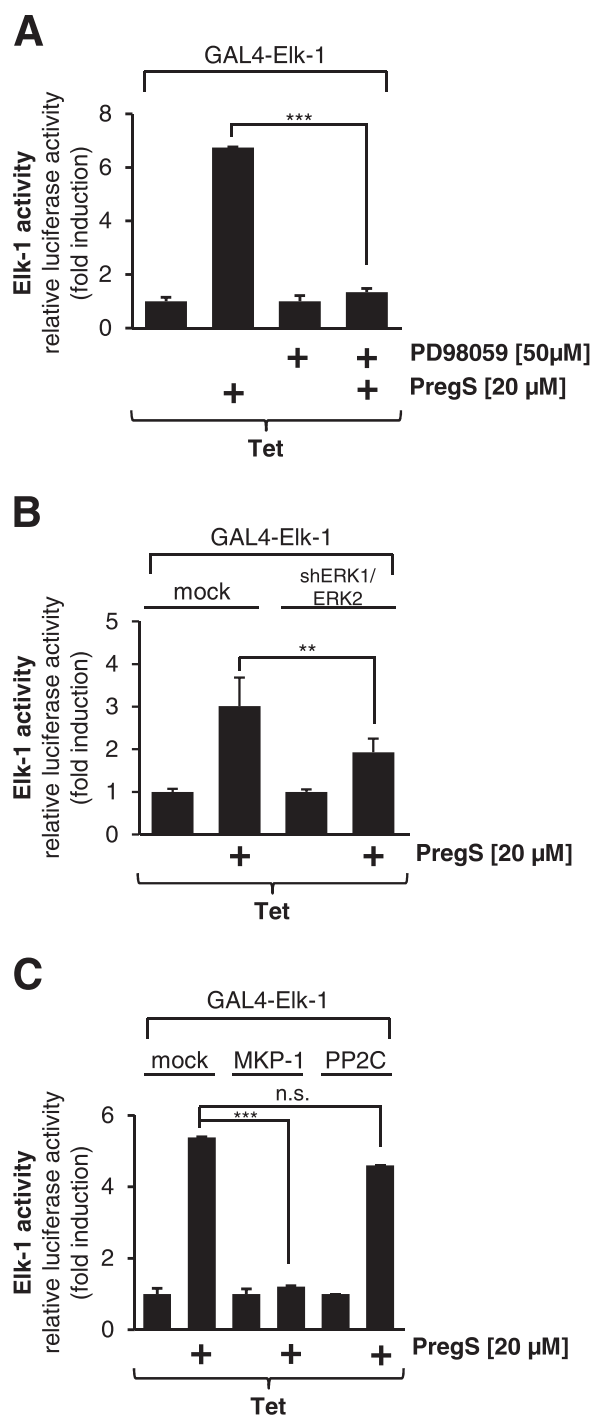


Fig. 3. Attenuation of the ERK1/2 signaling pathway interferes with the TRPM3-induced activation of Elk-1. (A) HEK293 cells containing a tetracycline-inducible TRPM3 transcription unit were infected with a recombinant lentivirus containing a GAL4-responsive reporter gene (UAS⁵Sp1².luc). In addition, cells were infected with a lentivirus encoding GAL4-Elk-1. In all experiments, the cells were serum-starved for 24 h in the presence of tetracycline (1 μg/ml). The cells were preincubated for 3 h with PD98059 (50 μM), and then stimulated with pregnenolone sulfate (PregS, 20 μM) for 24 h in the presence of PD98059. Cell extracts were prepared and analyzed for luciferase activities. Data shown are mean \pm S.D. of three independent experiments performed in quadruplicate (***, $P < 0.001$). (B) Knockdown of ERK1/2 expression attenuates Elk-1 activation following stimulation of TRPM3 channels. HEK293 cells containing a tetracycline-inducible TRPM3 transcription unit were infected with a lentivirus containing the UAS⁵Sp1².luc reporter gene. In addition, cells were infected with a lentivirus encoding GAL4-Elk-1 and with lentiviruses encoding ERK1 and ERK2-specific shRNAs. As a control, cells were infected with a lentivirus generated with the lentiviral transfer vector pLL3.7 (mock). The cells

were stimulated with pregnenolone sulfate (PregS, 20 μM) for 24 h. Cell extracts were prepared and analyzed for luciferase activities. Data shown are mean \pm S.D. of three independent experiments performed in quadruplicate (**, $P < 0.01$). (C) HEK293 cells containing a tetracycline-inducible TRPM3 transcription unit were infected with a recombinant lentivirus containing the UAS⁵Sp1².luc reporter gene. Cells were also infected with a lentivirus encoding GAL4-Elk-1. In addition, cells were infected with a lentivirus encoding either MKP-1 or protein phosphatase 2C (PP2C). As a control, cells were infected with a lentivirus generated with the lentiviral transfer plasmid pFUW (mock). The cells were stimulated with pregnenolone sulfate (PregS, 20 μM) for 24 h. Cell extracts were prepared and analyzed for luciferase activities. Luciferase activity was normalized to the protein concentration. Data shown are mean \pm S.D. of three independent experiments performed in quadruplicate (***, $P < 0.001$, n.s. not significant).

PD98059 to block the ERK1/2 signaling pathway. Fig. 3A shows that incubation of the cells with PD98059 efficiently attenuated the upregulation of the transcriptional activation potential of Elk-1 following stimulation of the TRPM3-expressing cells with pregnenolone sulfate.

Second, we reduced the concentration of ERK1/2 by expressing ERK1/2-specific small hairpin (sh) RNAs. The biological effects of these ERK1/2-specific RNAs on the ERK1/2 expression levels have been shown (Hong et al., 2009; Lesch et al., 2017; Rubil et al., 2018). Fig. 3B shows that the increase in Elk-1 activity was significantly impaired in pregnenolone sulfate-stimulated TRPM3-HEK293 cells expressing ERK1/2-specific shRNAs.

Third, we expressed MAP kinase phosphatase-1 (MKP-1) in the cells, the enzyme that dephosphorylates and inactivates MAP kinases in the nucleus (Shapiro and Ahn, 1998). Fig. 3C shows that the upregulation of the transcriptional activation potential of Elk-1 was attenuated in pregnenolone sulfate-stimulated TRPM3-expressing HEK293 cells that had been infected with a MKP-1 encoding lentivirus. In contrast, expression of protein phosphatase 2C (PP2C) had no effect on the transcriptional activity of Elk-1. These data show that active nuclear ERK1/2 is required within the signaling cascade connecting TRPM3 channels with Elk-1 activity. Together, the data, obtained from pharmacological and genetic experiments, indicate that ERK1/2 functions as a signal transducer connecting TRPM3 channels with the activation of Elk-1.

3.4. Calcineurin attenuates TRPM3-induced activation of Elk-1

A rise in the cytosolic Ca²⁺ concentration activates calcineurin, a serine/threonine phosphatase that is regulated by Ca²⁺ and calmodulin (Rusnak and Mertz, 2000). A major substrate of calcineurin is Elk-1 (Sugimoto et al., 1997; Tian and Karin, 1999; Sieber et al., 2007). We therefore assessed the role of calcineurin in the signaling cascade connecting TRPM3 channels with Elk-1. We expressed a constitutively active calcineurin A mutant (Δ CnA) that lacks the calmodulin binding site and the C-terminal autoinhibitory domain and which does not require Ca²⁺ ions for activation (Fig. 4A). Cells were treated with tetracycline to induce TRPM3 expression and stimulated with pregnenolone sulfate. Fig. 4B shows that expression of Δ CnA significantly reduced the activity of Elk-1 in HEK293 cells expressing stimulated TRPM3 channels.

4. Discussion

Recently, we showed that stimulation of TRPM3 channels increased the transcriptional activation potential of Elk-1. The objective of this study was to identify intracellular signal transducers of the signaling cascade connecting activated TRPM3 channels with the stimulation of Elk-1. Elk-1 is of particular interest, as it represents a convergence point for intracellular signaling cascades that are initiated by cytokines, growth factors, hormones, and neurotransmitters. Elk-1 controls a variety of biological functions, including the regulation of proliferation,

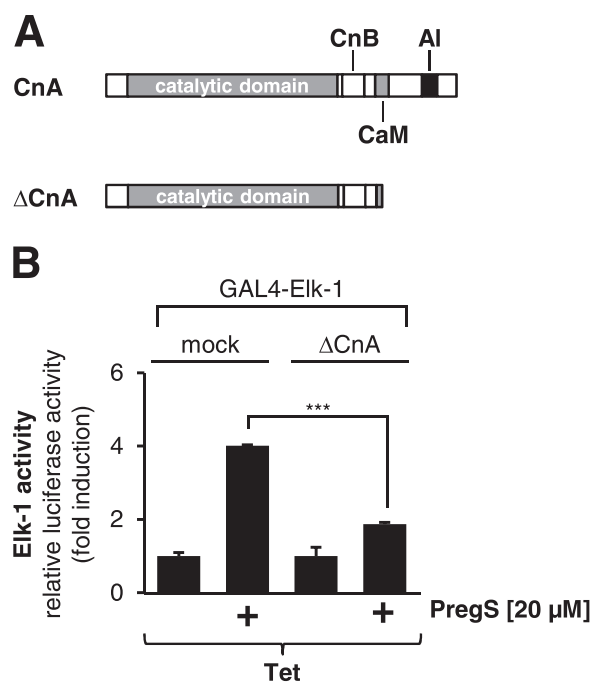


Fig. 4. Calcineurin regulates the transcriptional activation potential of Elk-1 following stimulation of TRPM3 channels with pregnenolone sulfate. (A) Modular structure of calcineurin A and Δ CnA, a constitutively active mutant of calcineurin A. The calcineurin B (CnB) and calmodulin (CaM) binding sites are depicted as well as the autoinhibitory domain (AI) located at the C-terminus. (B) HEK293 cells containing a tetracycline-inducible TRPM3 transcription unit were infected with a lentivirus containing the GAL4-responsive reporter gene UAS⁵Sp1².luc. Cells were also infected with a lentivirus encoding GAL4-Elk-1. In addition, cells were either mock-infected or infected with a recombinant lentivirus encoding Δ CnA. The cells were serum-starved for 24 h in the presence of tetracycline (1 μ g/ml) and then stimulated with pregnenolone sulfate (PregS, 20 μ M) for 24 h. Cell extracts were prepared and analyzed for luciferase activities. Luciferase activity was normalized to the protein concentration. Data shown are mean \pm S.D. of three independent experiments performed in quadruplicate (***, $P < 0.001$).

differentiation, survival, transcription, and cell migration (Besnard et al., 2011; Kasza, 2013).

TRPM3 channels function as Ca^{2+} permeable cation channels (Wagner et al., 2008; Majeed et al., 2011). Accordingly, stimulation of transcription via the transcription factors Egr-1 and AP-1 requires elevated intracellular Ca^{2+} concentrations following stimulation of TRPM3 channels (Mayer et al., 2011; Lesch et al., 2015). In this study, we showed that an influx of Ca^{2+} ions into the cells is essential to elevate the transcriptional activation potential of Elk-1 in TRPM3-expressing HEK293 cells that had been stimulated with pregnenolone sulfate. These data indicate that Elk-1 functions as Ca^{2+} -responsive transcription factor. In neurons, an increase in cytoplasmic $[\text{Ca}^{2+}]$ has been correlated with transcription of SRE-regulated genes, while a rise in nuclear Ca^{2+} may be required for CREB-mediated transcription of cAMP response element-regulated genes (Hardingham et al., 1997). This conclusion was based on single cell nuclear microinjection of a nondiffusible Ca^{2+} buffer. We used a biochemical approach and expressed the Ca^{2+} -binding protein parvalbumin in either the nucleus or the cytosol to reduce the Ca^{2+} concentration in these compartments. The results of this study show that the pregnenolone sulfate/TRPM3-induced upregulation of the transcriptional activation potential of Elk-1 required a rise in cytosolic Ca^{2+} and was independent of changes in the concentration of nuclear Ca^{2+} .

The observation that a rise in cytoplasmic Ca^{2+} and not in nuclear Ca^{2+} is essential for the activation of Elk-1 via TRPM3 was further corroborated by experiments involving inhibition of the

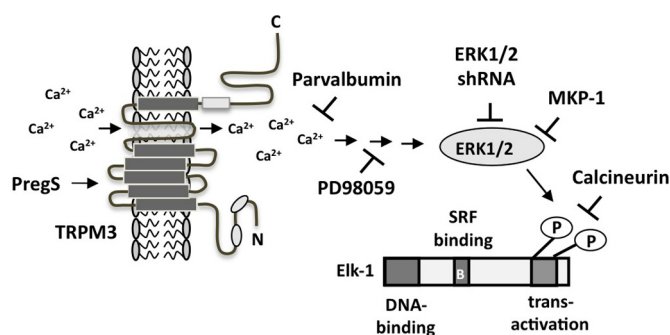


Fig. 5. Signaling pathway connecting TRPM3 channels with the activation of the transcription factor Elk-1. Stimulation of TRPM3 channels with pregnenolone sulfate induces an influx of Ca^{2+} ions into the cells. As a result, the cytosolic Ca^{2+} concentration is increased. Expression of the Ca^{2+} -binding protein parvalbumin reduces the cytosolic Ca^{2+} -concentration. A rise in cytoplasmic $[\text{Ca}^{2+}]$ leads to the activation of the protein kinase ERK1/2. The expression levels of ERK1/2 is reduced in cells expressing ERK1/2-specific shRNAs. The compound PD98059 inhibits the phosphorylation of MAP kinase kinase by the protein kinase Raf and therefore blocks the phosphorylation and activation of ERK1/2 following stimulation of TRPM3 channels. The ternary complex factor Elk-1 which is an important component of the serum response element ternary complex, is a major nuclear substrate for ERK1/2. The phosphatases MKP-1 and calcineurin function as negative regulators of the TRPM3-Elk-1 signaling cascade by dephosphorylating ERK1/2 and Elk-1, respectively.

cytoplasmic enzyme MAP kinase kinase with the compound PD98059. Phosphorylation and activation of MAP kinase kinase leads to the phosphorylation and activation of ERK1/2, the key enzyme of the ERK signaling pathway. The results presented in this study show that inhibition of MAP kinase kinase attenuated the signaling cascade connecting TRPM3 channels with the Elk-1 activity. These data were confirmed by genetic experiments involving the expression of shRNAs directed against both forms of ERK, ERK1 and ERK2. The transcriptional activation potential of Elk-1 was significantly reduced under these conditions following stimulation of TRPM3 channels with pregnenolone sulfate. Moreover, we showed that nuclear phosphorylated ERK1/2 is required to activate Elk-1 following stimulation of TRPM3 channels. Overexpression of the nuclear phosphatase MKP-1 led to a complete interruption of the signaling cascade. Together, these data show that ERK1/2 functions as a signal transducer between activated TRPM3 channels and the Elk-1 transcription factor.

An influx of Ca^{2+} ions into the cytosol may lead to the activation of the Ca^{2+} /calmodulin-regulated protein phosphatase calcineurin, which is known to dephosphorylate and inactivate Elk-1 (Sugimoto et al., 1997; Tian and Karin, 1999; Sieber et al., 2007). In this study, we showed that expression of a constitutively active calcineurin A mutant attenuated pregnenolone sulfate/TRPM3-induced activation of Elk-1. We propose that calcineurin is part of a negative feedback loop to inhibit the signaling cascade connecting TRPM3 stimulation with enhanced transcriptional activity of Elk-1.

5. Conclusion

In summary, we showed that stimulation of TRPM3 channels with pregnenolone sulfate triggers an upregulation of the transcriptional activation potential of Elk-1 involving an influx of Ca^{2+} ions into the cells and a rise in cytosolic Ca^{2+} . The activation of the MAP kinase is required to bring the signaling information into the nucleus. A negative feedback loop is established by calcineurin via dephosphorylation of Elk-1. Fig. 5 summarizes the signaling cascade described in this study.

Acknowledgements

We thank D. Beech and Y. Majeed for their generous gift of HEK293

cells containing a tetracycline-regulated TRPM3 expression unit and Jong-In Park for the plasmid encoding an ERK1-specific shRNA. We thank Libby Guethlein for critical reading of the manuscript and Oliver G. Rössler for art work. This work was supported by the Saarland University, Germany (LOM-T201000492).

Conflict of interest statement

The authors declare that there is no conflict of interest.

References

- Anglada-Huguet, M., Giralt, A., Perez-Navarro, E., Alberch, J., Xifró, X., 2012. Activation of Elk-1 participates as a neuroprotective compensatory mechanism in models of Huntington's disease. *J. Neurochem* 121, 639–648.
- Apazoglou, K., Farley, S., Gorgievski, V., Belzeaux, R., Lopez, J.P., Grenier, J., Ibrahim, E.C., El Khoury, M.-A., Tse, Y.C., Mongredien, R., Barbé, A., de Macedo, C.E.A., Jaworski, W., Bocheureau, A., Orrico, A., Isingrini, E., Guinaudie, C., Mikasova, L., Louis, F., Gautron, S., Groc, L., Massaad, C., Yildirim, F., Vialou, V., Dumas, S., Marti, F., Mechawar, N., Morice, E., Wong, T.P., Caboche, J., Turecki, G., Giros, B., Tzavara, E.T., 2018. Antidepressive effects of targeting ELK-1 signal transduction. *Nat. Med.* 24, 591–597.
- Besnard, A., Galan-Rodriguez, B., Vanhoutte, P., Caboche, J., 2011. Elk-1 a transcription factor with multiple facets in the brain. *Front. Neurosci.* 5, 35.
- Boros, J., Donaldson, I.J., O'Donnell, A., Odrowaz, Z.A., Zeef, L., Lupien, M., Meyer, C.A., Liu, X.S., Brown, M., Sharrocks, A.D., 2009. Elucidation of the ELK1 target gene network reveals a role in the coordinate regulation of core components of the gene regulation machinery. *Genome Res.* 19, 1963–1973.
- Costello, P., Nicolas, R., Willoughby, J., Wasyluk, B., Nordheim, A., Treisman, R., 2010. Ternary complex factors SAP-1 and Elk-1, but not Net, are functionally equivalent in thymocyte development. *J. Immunol.* 185, 1082–1092.
- Hardingham, G.E., Chawla, S., Johnson, C.M., Bading, H., 1997. Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature* 385, 260–265.
- Hong, S.-K., Yoon, S., Moelling, C., Arthan, D., Park, J.-I., 2009. Noncatalytic function of ERK1/2 can promote Raf/MEK/ERK-mediated growth arrest signaling. *J. Biol. Chem.* 284, 33006–33018.
- Kar, P., Parekh, A.B., 2015. Distinct spatial Ca²⁺ signatures selectively activate different NFAT transcription factor isoforms. *Mol. Cell* 58, 232–243.
- Kasza, A., 2013. Signal-dependent Elk-1 target genes involved in transcript processing and cell migration. *Biochim. Biophys. Acta* 1829, 1026–1033.
- Kaufmann, A., Keim, A., Thiel, G., 2013. Regulation of immediate-early gene transcription following activation of Gαq-coupled designer receptors. *J. Cell. Biochem.* 114, 681–696.
- Keim, A., Müller, I., Thiel, G., 2012. Efficient genetic manipulation of 1321N1 astrocytoma cells using lentiviral gene transfer. *J. Neurosci. Methods* 206, 138–142.
- Lesch, A., Hui, X., Lipp, P., Thiel, G., 2015. Transient receptor potential melastatin-3 (TRPM3)-induced activation of AP-1 requires Ca²⁺ ions and the transcription factors c-Jun, ATF2, and ternary complex factor. *Mol. Pharmacol.* 87, 617–628.
- Lesch, A., Rössler, O.G., Thiel, G., 2017. Extracellular signal-regulated protein kinase, c-Jun N-terminal protein kinase, and calcineurin regulate transient receptor potential M3 (TRPM3) induced activation of AP-1. *J. Cell. Biochem.* 118, 2409–2419.
- Lesch, A., Rubil, S., Thiel, G., 2014. Activation and inhibition of transient receptor potential TRPM3-induced gene transcription. *Br. J. Pharmacol.* 171, 2645–2658.
- Majeed, Y., Bahnasi, Y., Seymour, V.A.L., Wilson, L.A., Milligan, C.J., Agarwal, A.K., Sukumar, P., Naylor, J., Beech, D.J., 2011. Rapid and contrasting effects of rosiglitazone on transient receptor potential TRPM3 and TRPM5 channels. *Mol. Pharmacol.* 79, 1023–1030.
- Mayer, S.I., Dexheimer, V., Nishida, E., Kitajima, S., Thiel, G., 2008. Expression of the transcriptional repressor ATF3 in gonadotrophs is regulated by Egr-1, CREB, and ATF2 after gonadotropin-releasing hormone receptor stimulation. *Endocrinology* 149, 6311–6325.
- Mayer, S.I., Müller, I., Mannebach, S., Endo, T., Thiel, G., 2011. Signal transduction of pregnenolone sulfate in insulinoma cells. Activation of Egr-1 expression involving TRPM3, voltage-gated calcium channels, ERK, and ternary complex factors. *J. Biol. Chem.* 286, 10084–10096.
- Mayer, S.I., Rössler, O.G., Endo, T., Charnay, P., Thiel, G., 2009. Epidermal growth factor-induced proliferation of astrocytes requires Egr transcription factors. *J. Cell. Sci.* 122, 3340–3350.
- Müller, I., Lipp, P., Thiel, G., 2012. Ca²⁺ signaling and gene transcription in glucose-stimulated insulinoma cells. *Cell Calcium* 52, 137–151.
- Müller, I., Rössler, O.G., Thiel, G., 2011. Pregnenolone sulfate activates basic region leucine zipper transcription factors in insulinoma cells: role of voltage-gated Ca²⁺ channels and transient receptor potential melastatin 3 channels. *Mol. Pharmacol.* 80, 1179–1189.
- Naylor, J., Milligan, C.J., Zeng, F., Jones, C., Beech, D.J., 2008. Production of a specific extracellular inhibitor of TRPM3 channels. *Br. J. Pharmacol.* 155, 567–573.
- Odrowaz, Z., Sharrocks, A.D., 2012. ELK1 uses different DNA binding modes to regulate functionally distinct classes of target genes. *PLoS Genet.* 8, e1002694.
- Patki, M., Chari, V., Sivakumaran, S., Gonit, M., Trumbly, R., Ratnam, M., 2013. The ETS domain transcription factor ELK1 directs a critical component of growth signaling by the androgen receptor in prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.* 288, 11047–11065.
- Rössler, O.G., Henß, I., Thiel, G., 2008. Transcriptional response to muscarinic acetylcholine receptor stimulation: regulation of Egr-1 biosynthesis by Elk-1, ERK, MKP-1 and calcineurin in carbachol stimulated human neuroblastoma cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 470, 93–102.
- Rössler, O.G., Thiel, G., 2015. Regulation of gene transcription following stimulation of Gαq-coupled designer receptors. In: Thiel, G. (Ed.), *Designer Receptors Exclusively Activated By Designer Drugs*. Neurexpress, 108, pp. 49–60.
- Rubil, S., Lesch, A., Mukaida, N., Thiel, G., 2018. Stimulation of transient receptor potential M3 (TRPM3) channels increases interleukin-8 gene promoter activity involving AP-1 and extracellular signal-regulated protein kinase. *Cytokine* 103, 133–141.
- Rubil, S., Rössler, O.G., Thiel, G., 2016. CREB, AP-1, ternary complex factors and MAP kinases connect transient receptor potential melastatin-3 (TRPM3) channel stimulation with increased c-Fos expression. *Br. J. Pharmacol.* 173, 305–318.
- Rusnak, F., Mertz, P., 2000. Calcineurin: form and function. *Physiol. Rev.* 80, 1483–1521.
- Shapiro, P.S., Ahn, N.G., 1998. Feedback regulation of Raf-1 and mitogen-activated protein kinase (MAP) kinase kinase 1 and 2 by MAP kinase phosphatase-1 (MKP-1). *J. Biol. Chem.* 273, 1788–1793.
- Sharrocks, A.D., 2001. The ETS-domain transcription factor family. *Nat. Mol. Cell Biol.* 2, 827–837.
- Shaw, P.E., Saxton, J., 2003. Ternary complex factors: prime nuclear targets for mitogen-activated protein kinases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 1210–1226.
- Sieber, M., Karanik, M., Brandt, C., Blex, C., Podtschaske, M., Erdmann, F., Rost, R., Serfling, E., Liebscher, J., Pätzl, M., Radbruch, A., Fischer, G., Baumgrass, R., 2007. Inhibition of calcineurin-NFAT signaling by the pyrazolopyrimidine compound NCI3. *Eur. J. Immunol.* 37, 2617–2626.
- Sugimoto, T., Stewart, S., Guan, K.-L., 1997. The calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin is the major Elk-1 phosphatase. *J. Biol. Chem.* 272, 29415–29418.
- Thiel, G., Rössler, O.G., 2011. Immediate-early transcriptional response to angiotensin II in human adrenocortical cells. *Endocrinology* 152, 4211–4223.
- Thiel, G., Rössler, O.G., 2014. Resveratrol stimulates AP-1-regulated gene transcription. *Mol. Nutr. Food Res.* 58, 1402–1413.
- Thiel, G., Lesch, A., Keim, A., 2012. Transcriptional response to calcium-sensing receptor stimulation. *Endocrinology* 153, 4716–4728.
- Thiel, G., Rubil, S., Lesch, A., Guethlein, L.A., Rössler, O.G., 2017. Transient receptor potential TRPM3 channels: pharmacology, signaling, and biological functions. *Pharmacol. Res.* 124, 92–99.
- Tian, J., Karin, M., 1999. Stimulation of Elk1 transcriptional activity by mitogen-activated protein kinases is negatively regulated by protein phosphatase 2B (calcineurin). *J. Biol. Chem.* 274, 15173–15180.
- Vanhoutte, P., Barnier, J.-V., Guibert, B., Pagès, C., Besson, M.-J., Hipskind, R.A., Caboche, J., 1999. Glutamate induces phosphorylation of Elk-1 and CREB, along with c-fos activation, via an extracellular signal-regulated kinase-dependent pathway in brain slices. *Mol. Cell. Biol.* 19, 136–146.
- Wagner, T.F.J., Loch, S., Lambert, S., Straub, I., Mannebach, S., Mathar, I., Düfer, M., Lis, A., Flocke, V., Philipp, S.E., Oberwinkler, J., 2008. Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic beta cells. *Nat. Cell Biol.* 10, 1421–1430.
- Whitmarsh, A.J., Yang, S.H., Su, M.S.S., Sharrocks, A.D., Davis, R.J., 1997. Role of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in the activation of ternary complex factors. *Mol. Cell. Biol.* 17, 2360–2371.
- Yang, S.H., Whitmarsh, A.J., Davis, R.J., Sharrocks, A.D., 1998. Differential targeting of MAP kinases to the ETS-domain transcription factor Elk-1. *EMBO J.* 17, 1740–1749.