

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

Pharmakologische Inhibierung der TRPM8- und TRPV1- induzierten Genexpression

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2023

vorgelegt von
Johann Sebastian Steinhausen
geboren am 30.08.1994 in Duisburg

Tag des Kolloquiums: 15.11.2023
Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger
Erster Berichterstatter: Prof. Dr. Gerald Thiel
Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. Adolfo Cavalié

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	5
Summary	6
1 Einleitung	7
1.1 Übersicht der TRP-Kanäle	7
1.2 Aufbau der TRP-Kanäle.....	8
1.3 Funktion der Kanäle	11
1.4 Vorstellung möglicher Messverfahren.....	12
1.5 Fragestellung der Arbeit.....	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Material	14
2.2 Zelllinien	18
2.3 Plasmide	19
2.4 Zellkultur	21
2.5 Zellpassage	21
2.6 Transfer der lentiviralen Gene.....	21
2.7 Stimulation	23
2.8 Reporteranalyse	23
3 Ergebnisse	26
3.1 Messung der TRPM8- und TRPV1- induzierten intrazellulären Signalkaskade	26
3.2 BCTC inhibiert die TRPM8- und TRPV1-gesteuerte Transkription	27
3.3 Clotrimazol inhibiert die TRPM8- und TRPV1-gesteuerte Transkription	28
3.4 Progesteron reduziert die TRPM8- und TRPV1-gesteuerte Transkription.....	30
3.5 Pregnenolon inhibiert TRPM8- und TRPV1-gesteuerte Transkription	31
3.6 Die Verbindung RQ-00203078 inhibiert die TRPM8-gesteuerte Transkription	33
3.7 TC-I 2014 inhibiert die TRPM8- und TRPV1-gesteuerte Transkription.....	34
4 Diskussion	36
4.1 Diskussion der Methoden.....	36

4.2	Diskussion der Ergebnisse	36
5	Abkürzungsverzeichnis	38
6	Abbildungsverzeichnis	38
7	Tabellenverzeichnis.....	39
8	Literaturverzeichnis.....	40
9	Publikation	43
10	Danksagung.....	43
11	Lebenslauf	44

Zusammenfassung

Die transienten Rezeptorpotential (TRP)-Kanäle TRPM8 und TRPV1 werden durch diverse Stimuli aktiviert. Dazu gehören kalte sowie heiße Temperaturen und spezielle chemische Verbindungen wie Menthol oder Capsaicin. Die Kanalproteine sind an der Pathogenese verschiedener Erkrankungen beteiligt und daher von besonderer klinischer Relevanz. Die weitere Erforschung der Kanalproteine ist daher notwendig, um mithilfe geeigneter Antagonisten zukünftig auch konkrete Behandlungsansätze an TRP-Kanälen zu realisieren zu können. Um die biologische Wirksamkeit der in Frage kommenden Antagonisten zu überprüfen, wurde hier die Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 gemessen, nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass dieser nach Gabe von bekannten Agonisten der jeweiligen Kanäle, wie etwa Icilin für TRPM8 oder Capsaicin für TRPV1, hochreguliert wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass die Verbindungen BCTC, Clotrimazol, RQ-00203078, Progesteron, Pregnenolon und TC-I 2014 die TRPM8-induzierte intrazelluläre Signalkaskade hemmen. Spezifisch für den TRPM8-Kanal war dabei nur die Verbindung RQ-00203078. Für den TRPV1-Kanal wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Verbindungen BCTC, Clotrimazol, Progesteron und Pregnenolon in unterschiedlichem Ausmaß die TRPV1-induzierte intrazelluläre Signalkaskade hemmten.

Summary

The transient receptor potential (TRP) channels TRPM8 and TRPV1 are activated by various stimuli including cold or hot temperatures, chemical compounds such as menthol or capsaicin and other compounds. The channel proteins are involved in the development of various diseases and are therefore of particular clinical relevance. Further research into the channel proteins is therefore necessary in order to be able to discover specific treatment approaches on TRP channels in the future with the help of suitable antagonists. To test the biological efficacy of the antagonists in question, the activity of the transcription factor AP-1 was measured, after it had already been shown that it is upregulated after administration of icilin or capsaicin, known agonists of the TRPM8 and TRPV1 channels, respectively. The results show that the compounds BCTC, clotrimazole, RQ-00203078, progesterone and TC-I 2014 inhibit the TRPM8-induced intracellular signalling cascade. Specific for the TRPM8-channel was only the compound RQ-00203078. For the TRPV1 channel I could show that the compounds BCTC and clotrimazole inhibited the TRPV1-induced intracellular signalling cascade. Further insights were gained for the effect of progesterone and pregnenolone. Progesterone blocked the TRPV1-induced signalling cascade. Pregnenolone showed an inhibitory effect on the signalling cascades triggered by the stimulation of TRPM8 and TRPV1 channels in the cells.

1 Einleitung

1.1 Übersicht der TRP-Kanäle

Die TRP-Kanäle sind nicht-selektive Kationenkanäle, die in vielen Zellen von Säugetieren exprimiert werden. Zu der Familie der TRP-Kanäle zählen 28 Isoformen, die in 6 Untergruppen aufgeteilt werden. Diese sind die TRPV (Vanilloid), TRPC (Canonical), TRPM (Melastatin), TRPML (Mucolipin), TRPA (Ankyrin) und TRPP (Polycystin) (González-Muñiz et al., 2019).

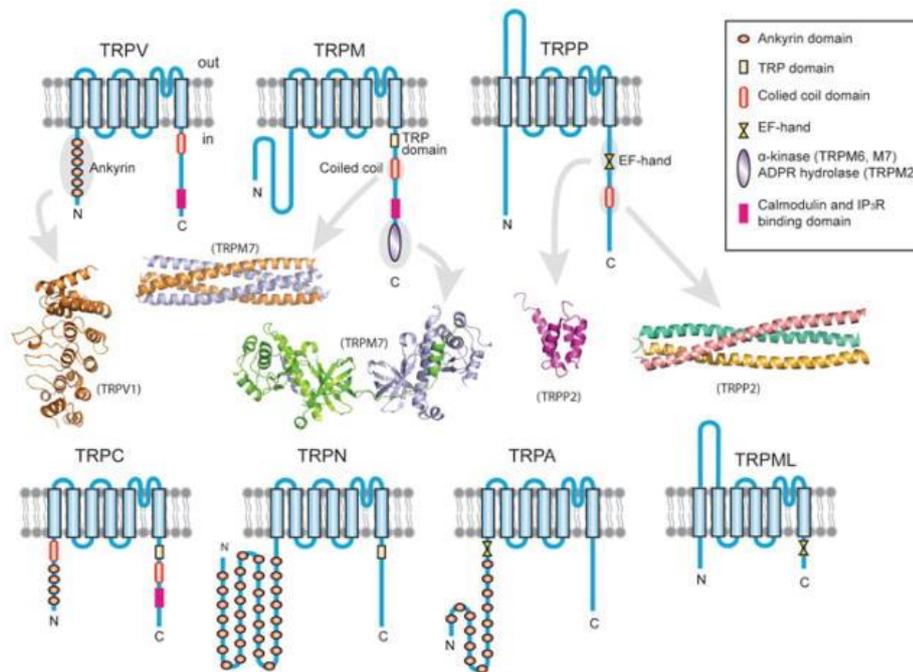


Abbildung 1: Übersicht der TRP Kanäle.

Dargestellt ist ein Überblick über die transmembranäre Topologie der jeweiligen Kanäle, dabei wurden jeweils nur die wichtigsten und häufigsten Domänen abgebildet. Die Ankyrin-Domäne erfüllt die Funktion eines intrazellulären Moleküladapters. Weiterhin ist sie erforderlich für die notwendige Elastizität sowie die Faltung der Kanäle. Die TRP-Domäne ermöglicht dem Kanal die Selektivität. Die Coiled-Coil-Domäne ist eine Mehrfachhelix, die vermutlich eine Funktion als Abstandhalter erfüllt. Das EF-Hand ist ein Protein, welches Calcium-Ionen binden kann und hierdurch eine Konformitätsänderung vollzieht. Calmodulin ist ein Calcium-bindendes Protein mit regulatorischen Funktionen und gehört ebenfalls zu der Gruppe der EF-Hand-Proteine (modifiziert nach Li M et. Al., 2011).

Hier soll sich auf den TRPV1- und TRPM8-Kanal konzentriert werden, da ihre Funktion in der Nozizeption liegt und diese dadurch im Speziellen bei verschiedenen Erkrankungen wie neuropathischen Schmerzsyndromen, Atemwegserkrankungen und Herzinsuffizienz relevant sind.

1.2 Aufbau der TRP-Kanäle

1.2.1 Aufbau des TRPM8-Kanals

Der TRPM8-Kanal folgt in seinem Aufbau dem allgemeinen Aufbau aller TRP-Kanäle. Er ist ein Tetramer, dessen Untereinheiten vierfach symmetrisch zueinander sind. Die Protomere besitzen sechs Transmembransegmente, die großen Amino- und Carboxy-Termini befinden sich intrazellulär.

Die Segmente eins bis vier bilden den Spannungssensor und beinhalten die Bindungsstellen für Menthol und Icilin. Die Segmente fünf und sechs formen die Pore. Diese beiden Bestandteile ermöglichen dem Ionenkanal die Selektivität. Werden sie neutralisiert, erlischt die Funktionsfähigkeit des Kanals (González-Muñiz et al., 2019).

Das TRPM8-Gen codiert für ein 1104 Aminosäuren großes Protein mit dem wie vorangestellten Aufbau. Die TRP-Box, ein kurzer hydrophober Abschnitt am C-terminalen Ende der S6-Helix, ist zusätzlich mit dem Spannungssensor (VSLD) am Aufbau der Bindungsstelle der Antagonisten und Agonisten beteiligt. Diese beiden Domänen bilden einen Hohlraum, in der Literatur *VSLD cavity* (Yin and Lee, 2020) genannt. Durch diesen werden die lokalen Strukturänderungen durch Ligandenbindung in eine Kanalöffnung übersetzt. Hier befinden sich außerdem die Bindungsstellen für die Aktivierung durch Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂). Die Oligomerisierung, Translokation und spätere Funktion des Kanals wird mutmaßlich von einer *coiled-coil* Domäne am C-Terminus gesteuert (Tsuruda et al., 2006). Der N-Terminus ist 700 Aminosäuren lang und enthält vier *major homology regions*, diese werden in der Literatur als wichtig für die Faltung und die intrazelluläre Verbringung des Kanals angesehen, weitere Funktionen sind allerdings nicht bekannt. Die vier Untereinheiten winden sich umeinander und bilden dadurch eine zentrale Pore. Diese besteht aus den Transmembransegmenten S5 und S6 sowie der äußeren Porenschleife und der Porenhelix (Diver et al., 2019).

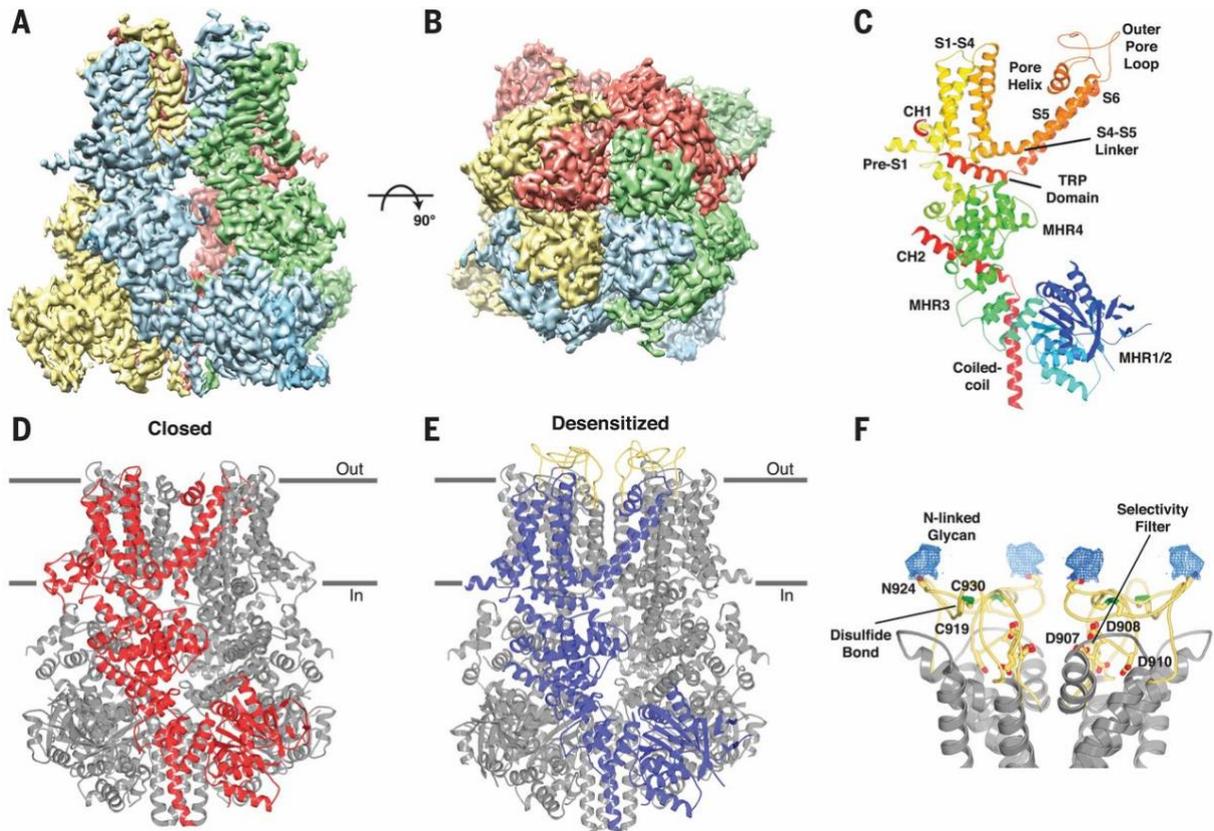


Abbildung 2: Struktur des TRPM8 im geöffneten und geschlossenen Zustand

(A): Seitenansicht (B): Sicht von oben (C): Monomer im desensibilisiertem Status (D): Geschlossener Zustand, Hervorhebung einer Untereinheit in rot (E): Desensibilisierter, offener Zustand, Hervorhebung einer Untereinheit in blau. (F): Äußerer Teil der Pore dargestellt als Alpha-Helix (modifiziert nach Diver MM, Cheng Y, Julius D, 2019).

1.2.2 Aufbau des TRPV1-Kanals

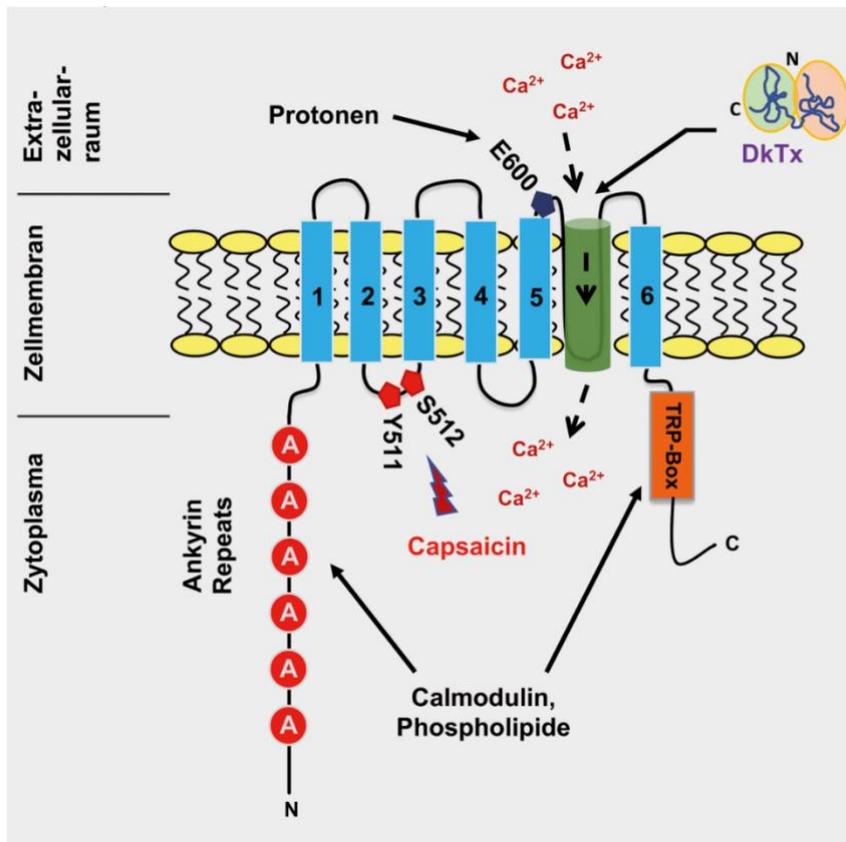


Abbildung 3: Struktur des TRPV1 Kanals

Darstellung der sechs Transmembrandomänen. Die Pore ist grün gekennzeichnet und von den Domänen 5 und 6 umfasst. Die Bindungsstelle für Capsaicin befindet sich intrazellulär, an der Bindung sind die Aminosäuren Y511 und S512 beteiligt. An der Aminosäure E600 findet die Kanalaktivierung durch Protonen statt. Calmodulin sowie Phospholipide modulieren die Funktion des Kanals über Bindung an die TRP-Box oder die Ankyrin-Repeats. Exemplarisch ist Bindung des Toxins DkTx an die Pore gekennzeichnet mit nachfolgender irreversibler Inhibition des Kanals. (Modifiziert nach Thiel G, Backes TM, Rössler OG, 2020).

Auch der TRPV1-Kanal besteht aus vier symmetrischen Untereinheiten, die eine zentrale, für Ionen durchlässige Pore umschließen. Jede Untereinheit besteht aus 6 transmembranösen α -Helixen, deren N- und C-Termini intrazellulär liegen. Die S1-4 Domänen bilden den Spannungssensor, während die Domänen S5-6 die Pore bilden. Das helikale S4-S5 Verbindungsstück stellt die entscheidende Verbindung dar, um die Konformationsänderung des Spannungssensors in eine Öffnung des Ionenkanals zu übersetzen (Liao et al., 2013).

1.3 Funktion der Kanäle

1.3.1 Funktion des TRPM8-Kanals

Der TRPM8-Kanal ist ein polymodaler Nozizeptor und ist sensibel für Spannungsänderungen, PIP₂, Menthol und Kälte. Die Anwesenheit von PIP₂ ist immer erforderlich für die Funktionsfähigkeit des Kanals (Rohács et al., 2005). Der TRPM8-Kanal ist in erster Linie ein Thermorezeptor, welcher an die peripheren A δ - und C-Nervenfasern angebunden ist. Er ist ein Kälterezeptor und sensibel für Temperaturen unter 30°C, aber auch zellschädigende Temperaturen unter 15°C führen zu einer Kanalöffnung (González-Muñiz et al., 2019). Durch die natürlich vorkommenden Substanzen wie Menthol und 1,8-Cineol kann die Reizschwelle herabgesetzt werden. Zudem existiert ein synthetischer TRPM8 Superagonist namens Icilin.

Weiterhin ist er an der Nozizeption beteiligt, bei schwacher Aktivierung dämpft er mechanische sowie hitzebedingte Schmerzen. Außerdem kann er bei neuropathischen Schmerzen analgetisch wirken (Andersen et al., 2016). Wird er jedoch stark stimuliert, kann er zu Kälte-Allodynie und Hypersensitivität gegenüber Kälte führen. Der TRPM8-Kanal wirkt dabei auf spinaler Ebene durch Interaktion seiner Afferenzen mit den Afferenzen der jeweiligen Nozizeptoren (Proudfoot et al., 2006). Je nach gewünschtem Effekt können so Agonisten zur Therapie bei mechanischer Hyperalgesie eingesetzt werden und Antagonisten bei Kälte-Allodynie oder Kälte-Hyperalgesie (Weyer and Lehto, 2017).

1.3.2 Funktion des TRPV1-Kanals

Der TRPV1-Kanal kann durch zahlreiche physikalische, wie chemische Stimuli aktiviert werden. Dazu gehören unter anderem elektrische Spannung, Temperaturen über 43°C (O'Neill et al., 2012), mechanische Kräfte, Entzündungsmediatoren, ein extrazellulärer pH-Wert unter 5,2, divalente Kationen wie Mg²⁺ oder Ba²⁺ sowie tierische Toxine (Yang and Zheng, 2017). Weiterhin ist Capsaicin ein wichtiger Aktivator des Kanals. Die Bindungsstelle für Capsaicin liegt oberhalb des S4/S5-Verbindungsstücks und wird von S3 und S4 derselben Untereinheit sowie der S6 Helix der Nachbaruntereinheit umschlossen (Yin and Lee, 2020).

Dabei führen Liganden an unterschiedlichen Bindungsstellen zu einer Aktivierung, Capsaicin etwa bindet an die transmembranöse Domäne, wohingegen Toxine wie das Toxin der Vogelspinne, DkTx, an die extrazelluläre Poren-Domäne binden. Nach Aktivierung wird der Fluss von Calciumionen und in verminderten Umfang auch von Natriumionen durch den Kanal ins Zellinnere ermöglicht. Dies führt zu einer Depolarisierung der Zelle. In nozizeptiven Neuronen werden daraufhin Aktionspotentiale gebildet und abhängig vom Stimulus verschiedene Empfindungen übermittelt, bei Capsaicin ist es ein Schärfegefühl, bei anderen kann es zu einer Schmerz Wahrnehmung führen.

Durch die Vielzahl der möglichen Aktivierungswege ergeben sich viele potenzielle medizinische Einsatzzwecke. Der naheliegendste Zweck liegt in der Schmerztherapie bei neuropathischen Schmerzen. Ein gutes Beispiel hierfür ist das Arzneimittel *Qutenza* (Grünenthal GmbH, Germany), ein kutanes Pflaster, welches den Wirkstoff Capsaicin in einer Konzentration von 8% enthält. In den Studien wurde es bei postherpetischer Neuralgie oder HIV-assoziiertes Neuropathie angewendet, die Schmerzen konnten in der Interventionsgruppe mit *Qutenza*-Pflaster signifikant besser als in der Kontrollgruppe gesenkt werden. Die Wirksamkeit beruht auf einer Überstimulation der kutanen TRPV1-Kanäle. Die darauffolgende Desensibilisierung führt zu einer bis zu 3 Monate anhaltenden Schmerzreduktion (European Medicines Agency, 2018). Weitere mögliche Anwendungsgebiete werden derzeit in der Literatur diskutiert, aufgeführt wird die Behandlung von entzündlichen Atemwegserkrankungen mit TRPV1-Antagonisten (Brito et al., 2014). Außerdem könnten Antagonisten eine positive Wirkung auf Diabetes mellitus Typ 1, Insulinresistenz und Adipositas haben (Brito et al., 2014). Auch in der Prävention der Ototoxizität des Chemotherapeutikums Cisplatin könnten TRPV1-Antagonisten Wirkung zeigen (Mukherjea et al., 2008).

1.4 Vorstellung möglicher Messverfahren

Zur Überprüfung der Kanalaktivität nach Gabe der Stimulanzen und Inhibitoren gibt es einige Methoden der Aktivitätsmessung. Messbare Größen sind die intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration, der transmembranäre Stromfluss, die Aktivität der Transkription mittels Reportergene wie dem Transkriptionsfaktor „Activator Protein“ 1 (AP-1) oder die Phosphorylierung der „Extracellular-signal regulated Kinases“ (ERK) 1 oder 2 (Thiel et al., 2019a). Zur Messung intrazellulärer Elektrolytkonzentrationen und des transmembranösen Stromflusses ist das „patch clamp“ Verfahren notwendig.

Um sicherzustellen, dass die Stimulation des Kanals zu einer Informationsübertragung führt, ist es sinnvoll, die letztmögliche Ebene der Signalkaskade zu messen. Dies ist in diesem Falle die Aktivitätsmessung der Transkription mittels des Transkriptionsfaktor AP-1.

1.5 Fragestellung der Arbeit

Das Ziel der Arbeit war es, verschiedene chemische Verbindungen auf eine hemmende Wirkung auf die Signalkaskade, die durch Stimulation des TRPM8-Kanals oder TRPV1-Kanals induziert wird, zu untersuchen. Untersucht wurden dabei die Verbindungen BCTC, TC-I 2014, RQ-00203078, Clotrimazol und die Steroide Pregnenolon und Progesteron.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Nachfolgend befindet sich eine Übersicht über die verwendeten Chemikalien.

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

Verbindung	Hersteller
BCA Protein Kit	Pierce, Rockford, USA
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Roth, Karlsruhe
Capsaicin	Sigma-Aldrich, München
Chloroquin	Sigma-Aldrich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
DMEM	PAA, Marburg
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethanol (EtOH)	Chemikalienlager UdS
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
Glukose	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	PAA, Marburg
Polybrene (steriles H ₂ O)	Sigma-Aldrich, München
Hexadimethrin-Bromid (Polybren)	Sigma-Aldrich, München
Reporterlyspuffer (5x)	Promega, Mannheim
Trypsin/EDTA (10x)	PAA, Marburg

Lösungsmittel in Klammern angegeben.

Tabelle 2: Verwendete Stimulatoren und Inhibitoren

Verbindung	Hersteller	PubChem CID	Konzentration	Lösungsmittel
(4-(3-Chloro-2-pyridinyl)- <i>N</i> -[4-(1,1-dimethylethyl)phenyl]-1-piperazine carboxamide (BCTC)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany	9929425	10 µM	DMSO
8-Methyl- <i>N</i> -vanillyl- <i>trans</i> -6-nonenamide (Capsaicin)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Germany	1548943	10 µM	Ethanol
(1-[(2-Chlorophenyl)diphenylmethyl]-1 <i>H</i> -imidazole (Clotrimazol)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany	2812	2 µM	DMSO
AG 3-5; 3,6-Dihydro-1-(2-hydroxyphenyl)-4-(3-nitrophenyl)-2(1 <i>H</i>)-pyrimidinone (Icilin)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany	161930	1 µM	DMSO
5-Pregnen-3β-ol-20-one sulfate (3β)-3-(sulfoxy)pregn-5-en-20-one (Pregnenolon)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Germany	105074	16,5 µM	DMSO
Pregn-4-en-3,20-dion (Progesteron)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Germany	5994	16,5 µM	DMSO
4-[[[3-Chloro-5-(trifluoromethyl)-2-pyridinyl]][4-(trifluoromethoxy)phenyl]methyl]amino]sulfonyl]benzoic acid (RQ-00203078)	Alomone labs, Jerusalem, Israel	49783953	1 µM	DMSO
3-[7-(Trifluoromethyl)-5-[2-(trifluoromethyl)phenyl]-1 <i>H</i> -benzimidazol-2-yl]-1-oxa-2-azaspiro[4.5]dec-2-ene (TC-I 2014)	Alomone labs, Jerusalem, Israel	10040286	1 µM	DMSO

2.1.2 Geräte

In folgender Tabelle sind alle verwendeten Geräte aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Analysewaage	Sartorius, Göttingen
Auflichtmikroskop	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Autoklav	Schütt, Göttingen
Brutschrank	Thermo Fisher Scientific Inc., Berlin
Eismaschine	verschiedene Hersteller
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Luminometer	Berthold Detection Systems, Alabama USA
Magnetrührer	KA Labortechnik, Staufen
Microplate Reader 550	Bio-Rad, München
Milliporewasser-Anlage	Milli Q Millipore, Milford USA
Neubauer Zählkammer (improved)	Roth, Karlsruhe
pH-Meter (inoLab pH 720)	WTW, Wellheim
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetus®Akku	Hirschmann Laborgeräte, Heilbronn
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge (Biofuge®pico)	Heraeus, Hanau
Vortex-Mixer	IKA Labortechnik, Staufen
Wasserbäder, temperierbar	verschiedene Hersteller

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in nachfolgender Tabelle aufgelistet.

Tabelle 4: Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
96-Loch-Platte, transparent (Greiner)	bio-one, Frickenhausen
96-Loch-Platte, weiß (Nunc)	Roskilde, Dänemark
Küvetten (1,5 ml Halbmikro)	Brand, Wertheim
Pipetten (10 µl, 20 µl, 200 µl bzw. 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg; Gilson, Middleton USA
Sterilfilter (0,22µm bzw. 0,45 µm)	Sarstedt, Nürnberg
Zellkulturflaschen (175 cm ²) Greiner	Bio-one, Frickenhausen
Zellkulturschale (Ø35 mm bzw. Ø60 mm)	Bio-one, Frickenhausen

2.1.4 Lösungen

Die folgenden Tabellen beschreiben die verwendeten Lösungen mit der jeweiligen Zusammensetzung.

Tabelle 5: Zusätze zu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

Zusatz	Dosierung
FCS	10 %
Glukose	25 mM
L-Glutamin	2 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml

Tabelle 6: Zusätze für DMEM serumreduziert

Zusatz	Dosierung
FCS	0,05 %
Glukose	25 mM
L-Glutamin	2 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml

Tabelle 7: 2x HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)

Zusatz	Dosierung
NaCl	274 mM
KCl	25 mM
Na ₂ HPO ₄	3,75 mM
Glukose	27,75 mM
HEPES	105 mM
pH	7,05-7,12

Tabelle 8: Luziferase Assay Reagent

Zusatz	Dosierung
Tricin	22 mM
(MgCO ₃) ₄ Mg(OH) ₂ x 5 H ₂ O	1,177 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2,94 mM
EDTA	0,11 mM
DTT	36,3 mM
Coenzym A	297 µM
ATP	583 µM
pH	7,8
Luziferin	4,7 mM

Tabelle 9: 1x PBS (Phosphate-Buffered Saline)

Zusatz	Dosierung
NaCl	170 mM
KCl	3,35 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	4 mM
KH ₂ PO ₄	1,84 mM
pH	7,24

Tabelle 10: Transfektionslösung 1

Zusatz	Dosierung
2x HBSS	275 µl

Tabelle 11: Transfektionslösung 2

Zusatz	Dosierung
H ₂ O Millipore	250 µl
CaCl ₂ 2,5M	27,5 µl
Verpackungsplasmid Δ8.91	5 µg
Reporterplasmid Coll.luc	6,6 µg
Expressionsplasmid pCMVG	2,3µg

Tabelle 12: Trypsin/EDTA

Zusatz	Dosierung
Trypsin	0,25% (w/v)
EDTA	0,1% (w/v)

2.2 Zelllinien

2.2.1 Zellkultur

Die Zellkultur aller verwendeten Zelllinien fand in 10%-igem DMEM Nährmedium statt. Diesem wurden noch 100 u/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin und fötales Kälberserum hinzugefügt.

2.2.2 HEK293/T17 Zellen

Die HEK293/T17 Zellen entstammen einer embryonalen Nierenzelllinie. Sie eignen sich zur lentiviralen Transfektion, weil sich mit ihnen hohen Titern an rekombinanten Lentiviren erzeugen lassen (Pear et

al., 1993). Sie wurden von D. Baltimore, Rockefeller Universität, New York, USA freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.2.3 HEK293-M8

Bei diesen Zellen handelt es sich um HEK293-Zellen, die den TRPM8-Kanal exprimieren (Bödding et al., 2007). Sie wurden von Ulrich Wissenbach vom Pharmakologischen Institut der Universität des Saarlandes freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

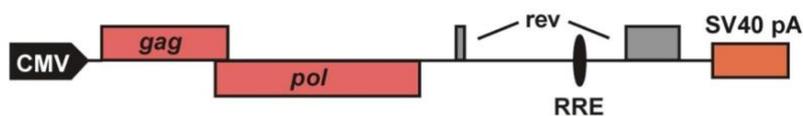
2.2.4 H2C1

H2C1 Zellen sind ebenfalls HEK293-Zellen, welche den humanen TRPV1-Kanal exprimieren (Mergler et al., 2012). Die TRPV1-Expression in genannten Zellen wurde bereits nachgewiesen (Backes et al., 2018).

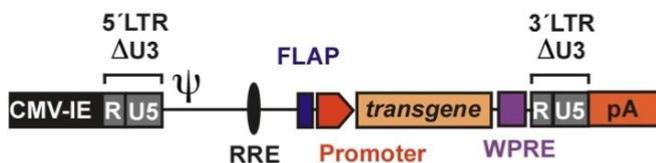
2.3 Plasmide

2.3.1 Übersicht der verwendeten Plasmide

A Verpackungsplasmid: Δ R8.91



B Transfer Vektor (FUW oder FW-basiert)



C VSV-G Expressions-Vektor (CMV-G)



Abbildung 4: Schematische Darstellung der verwendeten Plasmide.

Zur Steigerung der Expressionsrate ist allen Plasmiden jeweils der CMV-IE-Promotor/Enhancer-Komplex vorgeschaltet. Zur Terminierung der Transkription und Anheftung eines Poly(A)-Schwanzes enden alle Plasmide mit einer „Similian Virus 40 PolyA“-Sequenz (SV40 pA). In (A) ist das Verpackungsplasmid $\Delta 8.91$ dargestellt. Dem Promotor sind die viralen Gene *gag*, *pol* und *rev* nachgeschaltet. Das „Rev Response Element“ (RRE) dient als Bindungsstelle für das *rev*-Protein. Dieses ist für den Export der viralen mRNA aus dem Zellkern verantwortlich. (B) zeigt den Transfervektor, der für das Genom des rekombinanten Virus kodiert. Nach dem RRE folgt die FLAP, ein Abschnitt der wichtig ist für den DNA-Import in den Zellkern, sowie der Kollagenasepromotor (Nicht abgebildet). Dem Transgen, in diesem Fall das Luciferase-Gen, ist das posttranskriptionelle regulatorische Element des „woodchuck hepatitis virus“ (WPRE) nachgeschaltet. Dieses dient der verbesserten Expression der viralen Gene. (C) Der VSV-G Expressions-Vektor codiert für das VSV-Glykoprotein, ein Andockprotein des VSV-Virus mit weitem Tropismus. Modifiziert nach Rössler O, Thiel G (2015) Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs. Humana Press.

2.3.2 $\Delta 8.91$

Das Verpackungsplasmid $\Delta 8.91$ (Abbildung 4A) dient zur Expression der viralen Gene *gag*, *pol* und *rev*. *gag* als retrovirales Gen kodiert für Proteine der Virusmatrix, des Nucleocapsids und des Capsids. *pol* ist verantwortlich für die Kodierung der viralen Enzyme Integrase, reverse Transkriptase und Protease. *Rev* kodiert das *rev*-Protein, welches während der Virusreplikation den Export der viralen RNA aus dem Kern in das Zytoplasma unterstützt.

2.3.3 Coll.luc

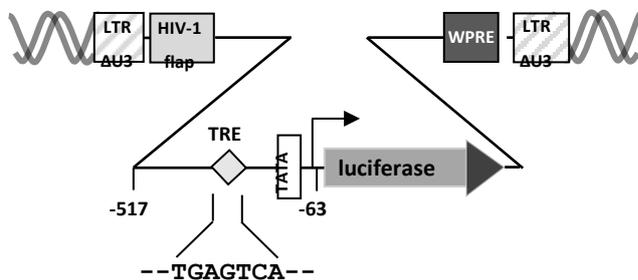


Abbildung 5: Vergrößerung des Transfervektors Coll.luc auf Ebene des Provirus.

Vor der TATA-Box befindet sich die Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor AP-1, diese wird TPA-response-element (TRE) genannt. Diesem nachgeschaltetet befindet sich das Gen, welches für *coll.luc* kodiert. Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Oliver Rößler, Universität des Saarlandes.

Als Reporter gen wurde ein Luciferasegen unter der Kontrolle des Kollagenasepromotors (*Coll.luc*) verwendet. Zur Produktion *Coll.luc*-kodierender Viren wurde das lentivirale Transferplasmid pFW-*Coll.luc* verwendet. Im Bereich des Kollagenase-Promotors befindet sich eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor AP-1, TRE genannt, sodass das *Coll.luc* Reporter gen als Sensor für die AP-1-Aktivität verwendet werden kann (Thiel and Rössler, 2011).

2.3.4 pCMV-G

Das Expressionsplasmid pCMV-G wird zur Pseudotypisierung genutzt, um den Tropismus gegenüber den Wirtszellen zu erhöhen. Es codiert für das Hüllprotein des Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV), welches einen höheren Tropismus gegenüber den HEK293-Zellen besitzt als die lentiviralen Hüllproteine.

2.4 Zellkultur

Die Arbeit an den Zellkulturen fand ausschließlich unter der Sterilbank statt. Die Kultivierung erfolgte unter standardisierten Bedingungen bei feuchter Atmosphäre, einer Temperatur von 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% im Inkubator. Es wurden die vorbeschriebenen Medien DMEM und DMEM serumreduziert verwendet.

2.5 Zellpassage

Die kultivierten Zellen wurden jeden dritten Tag nach Erreichung der Konfluenz passagiert. Nach Entfernung des erschöpften Mediums wurden sie mit 1x PBS abgewaschen und anschließend mit 1x Trypsin/ETDA versetzt. Nach etwa 90 bis 120 Sekunden kam es zum Ablösen der adhärennten Zellen. Es erfolgte die Verdünnung der in Suspension befindlichen Zellen um den Faktor 10 und die Hinzugabe von 40 ml Zellmedium. Um einen gleichmäßigen Zellrasen zu erhalten, wurde die Suspension zur Trennung etwaiger Zellkonglomerate mit der Pipette einige Male aspiriert und wieder unter geringem Druck unter den verbleibenden Rest gemischt.

2.6 Transfer der lentiviralen Gene

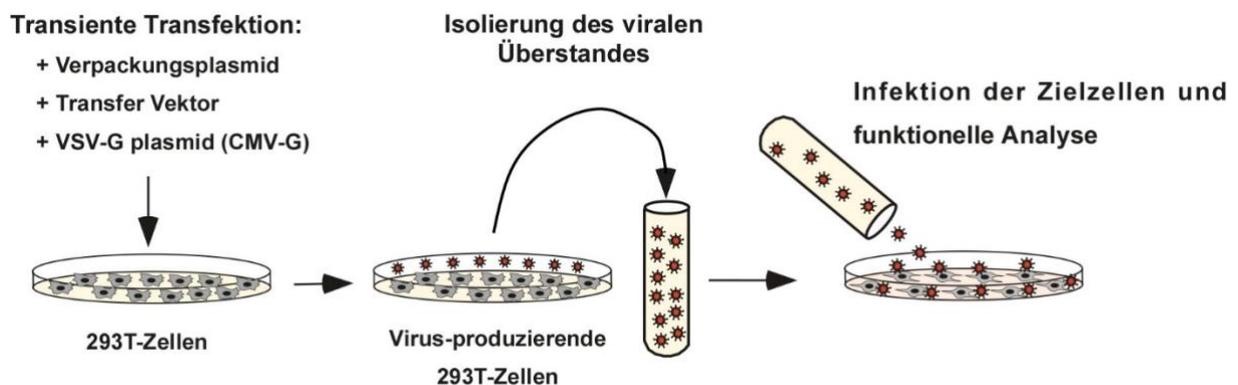


Abbildung 6: Übersicht über die Schritte der Transfektion sowie Infektion.

Die Plasmide und Transfervektor werden im kopräzipitierten Zustand zusammen mit den Calciumphosphatpräzipitaten zu den HEK293-Zellen gegeben. Diese nehmen die virale DNA auf und produzieren nach Aufnahme in den Zellkern Viren. Nach Abschnürung der Viren in das Medium wird dieses isoliert und dann zur Infektion der Zellen mit einer Expression des relevanten Kanalproteins verwendet. Diese Zellen werden im Anschluss geerntet, aufgeschlossen und analysiert (modifiziert nach Rößler).

2.6.1 Erzeugung der rekombinanten Lentiviren mit Calciumphosphat-Transfektion

24 Stunden vor der Transfektion erfolgte die Aussaat von 2×10^6 HEK293/T17 Zellen in 60mm Zellkulturschalen mit 4 ml DMEM. Die Zellen wurden hierfür bei der Passage entnommen und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

Bei vitalem Zellzustand wurde am Folgetag die Calciumphosphat-Transfektion begonnen. Es erfolgte zunächst ein Mediumwechsel der 60 mm Zellkulturschalen mit DMEM unter Hinzugabe von 25 μ M Chloroquin. Im Anschluss wurden zwei Lösungen hergestellt. Die angegebenen Mengenangaben beziehen sich auf den für eine Zellkulturschale benötigten Ansatz.

Unter Verwendung zweier Pipetens wurde nun Lösung 1 (*Tabelle 10*) mit Luft durchmischt und Lösung 2 (*Tabelle 11*) tropfenweise hinzugegeben. Eine suffiziente Durchmischung und ein gelungener Ansatz zeigte sich durch das Ausfällen der weißen Calciumpräzipitate. 500 μ l dieser Lösung wurden nun zu den HEK293/T17 Zellen gegeben und diese für 24 Stunden inkubiert. Diese Zeitspanne stellt eine ausreichende Aufnahme der Plasmide in die Zellen sicher. Im Anschluss erfolgte unter Bedingungen der Sicherheitsstufe 2 ein Mediumwechsel mit DMEM mit gleichzeitiger Wäsche der transfizierten Zellen mit PBS. Unter S2 Bedingungen anfallende Abfälle wurden jederzeit separat entsorgt. Während der anschließenden 72-stündigen Inkubationszeit erfolgte die Abschnürung des Virus in das Medium.

2.6.2 Lentivirale Infektion

Das mit Virus angereicherte Medium wurde anschließend unter S2-Bedingungen aus den Zellkulturschalen entnommen und durch einen 0,45 μ M Filter steril filtriert. Um fehlendes Volumen auszugleichen, wurde die Viruslösung mit Medium aufgefüllt. Zur Verbesserung der Infektionsbedingungen erfolgte die Hinzugabe von 1 μ l Polybrene in einer Konzentration von 8 μ g/ml auf einen Milliliter Viruslösung.

Die zu infizierenden Zellen wurden im Anschluss auf 35 mm Zellkulturschalen ausgesät. Es erfolgte die Aussaat von 200.000 Zellen pro Schale, diese wurden jeweils mit 2 ml Viruslösung versetzt.

2.7 Stimulation

2.7.1 Serumreduktion

24 Stunden nach Infektion wurde unter S2-Bedingungen zunächst ein Mediumwechsel mit Nährmedium durchgeführt. Nach einer Zeitspanne von 6 Stunden wurde ein erneuter Mediumwechsel mit serumreduziertem DMEM durchgeführt.

2.7.2 Stimulation

Die Stimulation der Zellen erfolgte am Folgetag. Als erster Schritt erfolgte die Vorinkubation der Zellen für drei Stunden mit den jeweiligen Inhibitoren in serumreduziertem Medium, um eine ausreichende Aufnahme der Substanzen vor der Stimulation zu erreichen. Es wurden die Inhibitoren BCTC, Clotrimazol, Pregnenolon, Progesteron, RQ-00203078 und TC-I 2014 verwendet. Nachfolgend erfolgte die Stimulation der Zellen unter Zugabe des jeweiligen Inhibitors über 24 Stunden im Inkubator, die Zellen mit Expression des TRPV1-Kanals wurden dabei mit Capsaicin stimuliert, die Zellen mit Expression des TRPM8-Kanals mit Icilin. Die eingesetzten Mengen sind der *Tabelle 2* zu entnehmen.

2.8 Reportergenanalyse

2.8.1 Zellernte

Die Ernte der Zellen erfolgte 24 Stunden nach Stimulation. Der gesamte Ernteprozess erfolgte unter ständiger Kühlung. Alle verwendeten Materialien sowie alle in direktem Kontakt zu den Zellen stehenden Geräte waren auf etwa 4°C gekühlt. Als erster Schritt erfolgte die Entfernung des Mediums mit einer anschließenden zweifachen Wäsche mit 1x PBS. Nach dem letzten Waschgang wurden zu jeder Zellkulturschale 500 ml 1x PBS hinzugegeben und der Zellrasen mit einem Zellschaber gelöst. Es erfolgte die Überführung der Zellen in Reaktionsgefäße und eine Zentrifugation mit 13.000 rpm für 10 Minuten. Der dabei entstehende Überstand wurde im Anschluss entfernt und die Zellpellets verblieben zur weiteren Analyse in den Reaktionsgefäßen. Abschließend wurden die Zellen mit 1x Reporterlysepuffer versetzt und mechanisch aufgeschlossen.

2.8.2 Luziferase-Assay

Die Aktivität des Reportergens wurde mit einem Luziferase-Assay gemessen. Die Lysepuffer-Protein-Lösung wurde hierfür auf eine weiße 96-Lochplatte pipettiert, es wurden jeweils 5 µl einer Probe aufgetragen. Folgend wurden pro Loch 50 µl der Luziferase-Assay Reagenz zugegeben und ohne Zeitverzug die Messung in einem Luminometer durchgeführt.

2.8.3 Bicinchinoninsäure-Assay

Der Bicinchinoninsäure-Assay (BCA-Assay) dient zur Bestimmung des Proteingehalts der jeweiligen Proben. Es wurden 12,5 µl der Lysepuffer-Protein-Lösung auf eine durchsichtige 96-Lochplatte aufgetragen. Weiterhin wurde eine Standardreihe (*Tabelle 13*) zur Erstellung einer Eichgraden aufgetragen, hier wurden ebenfalls jeweils 12,5 µl verwendet. Die BCA-Lösung wurde anschließend unter Verwendung der Lösung A und Lösung B im Verhältnis 1:50 angefertigt und 100 µl davon in jedes Loch gegeben. In dieser Lösung enthalten sind zweiwertige Kupferionen, die bei Kontakt mit Proteinen zu einwertigen Kupferionen reduziert werden. Diese reagierten zusammen mit jeweils zwei Molekülen Bicinchoninsäure zu einem Komplex. Diese Reaktion fand während der 30-minütigen Inkubationszeit im Inkubator statt und zeigte sich in einem violetten Farbumschlag. Im Anschluss wurde die Absorption photometrisch bei 562 nm bestimmt, die Absorption ist dabei proportional zur Proteinmenge der Probe.

Tabelle 13: Standardreihe der Proteinkonzentrationen, in µg/ml

0	125	250	500	750	1000	1500	2000
---	-----	-----	-----	-----	------	------	------

2.8.4 Relative Luziferase-Aktivität

Die relative Luziferase-Aktivität wurde bestimmt, um die Messungenauigkeiten des Luziferaseessays aufgrund unterschiedlicher Proteingehalte der jeweiligen Proben zu bereinigen. Dabei wurde der Quotient aus den gemessenen Lichteinheiten und der Proteinkonzentration gebildet.

$$\text{relative Luziferaseaktivität} = \frac{\text{Lichteinheiten (lu)}}{\text{Proteinkonzentration (µg)}}$$

2.8.5 Statistik

Um eine ausreichende statistische Signifikanz zu gewährleisten, wurde jeder Versuch in mindestens dreifacher Ausführung vorgenommen und mit jeweils vier Zellplatten desselben Ansatzes durchgeführt. Die Auswertung und Berechnung der Statistik wurde mit Microsoft Excel unter Verwendung des Add-Ins WinSTAT (R. Fitch Software) durchgeführt. Mit einem Zweistichproben-T-Test für unabhängige Stichproben wurde die Signifikanz (*Tabelle 14*) der erhobenen Daten beurteilt und in den Abbildungen dokumentiert. Ein Wert von $p < 0,05$ (Signifikanzlevel $> 95\%$) wurde als signifikant definiert.

Tabelle 14: Signifikanzniveau

Signifikanzniveau	p-Wert
n.s.	nicht signifikant
*	$p < 0,05$
**	$p < 0,01$
***	$p < 0,001$

3 Ergebnisse

3.1 Messung der TRPM8- und TRPV1- induzierten intrazellulären Signalkaskade

In dieser Arbeit wurde der Effekt von TRP-Inhibitoren auf die durch die Kanalproteine TRPM8 und TRPV1 initiierte Stimulation der Gentranskription untersucht.

Zur Stimulation wurden Capsaicin und Icilin verwendet. Capsaicin kommt in Arten der Gattung *Capsicum* aus der Familie der Nachtschattengewächse natürlich vor und wird zum Würzen und Schärfen von Speisen verwendet. Es aktiviert den TRPV1-Kanal sehr potent mit einem EC_{50} von $0,9 \mu\text{M}$ und ist dabei hoch selektiv für diesen (Weyer et al., 2016).

Icilin ist ein Superagonist und besitzt eine zweieinhalbfache Wirkung und eine fast 200-fache Potenz von Menthol (McKemy et al., 2002), ist aber strukturell anders aufgebaut. Icilin benötigt im Gegensatz zu Menthol intrazelluläres Calcium zur Aktivierung des Kanals (McKemy et al., 2002). Menthol und Icilin sind Agonisten für den TRPV3-, TRPA1- und TRPM8-Kanal (Sherkheli et al., 2010).

Bereits bekannt ist, dass eine Aktivierung genannter Kanäle zu einem Einstrom von Calciumionen in die Zelle führt, mit einem darauffolgenden Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration. Weitere Untersuchungen zeigten, dass zahlreiche TRP-Kanäle eine Signalkaskade aktivieren, die schlussendlich zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 führt (Backes et al., 2018; Thiel et al., 2019b). Zudem konnte dokumentiert werden, dass ein Zusammenhang zwischen der Stimulation von spannungsgesteuerten Calciumionenkanälen und der nachfolgenden Aktivierung von AP-1 besteht (Thiel et al., 2012).

Zusammenfassend präsentiert sich daher folgender Mechanismus. Durch Aktivierung von TRP-Kanälen oder spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen kommt es zu einem Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle. Dieser aktiviert eine Signalkaskade bis in den Zellkern hinein, wo schlussendlich eine Veränderung der Gentranskription bewirkt wird. Zur Quantifizierung der AP-1 Aktivierung wurde ein Reporter gen, das für das Luciferasegen unter Kontrolle des Collagenasepromotors kodiert, verwendet. Dieser Promotor besitzt eine Bindungsstelle für AP-1, das TRE (*Abbildung 5*). Durch einen lentiviralen Gentransfer wurde das Reporter gen in das Genom der Zelle integriert.

3.2 BCTC inhibiert die TRPM8- und TRPV1-gesteuerte Transkription

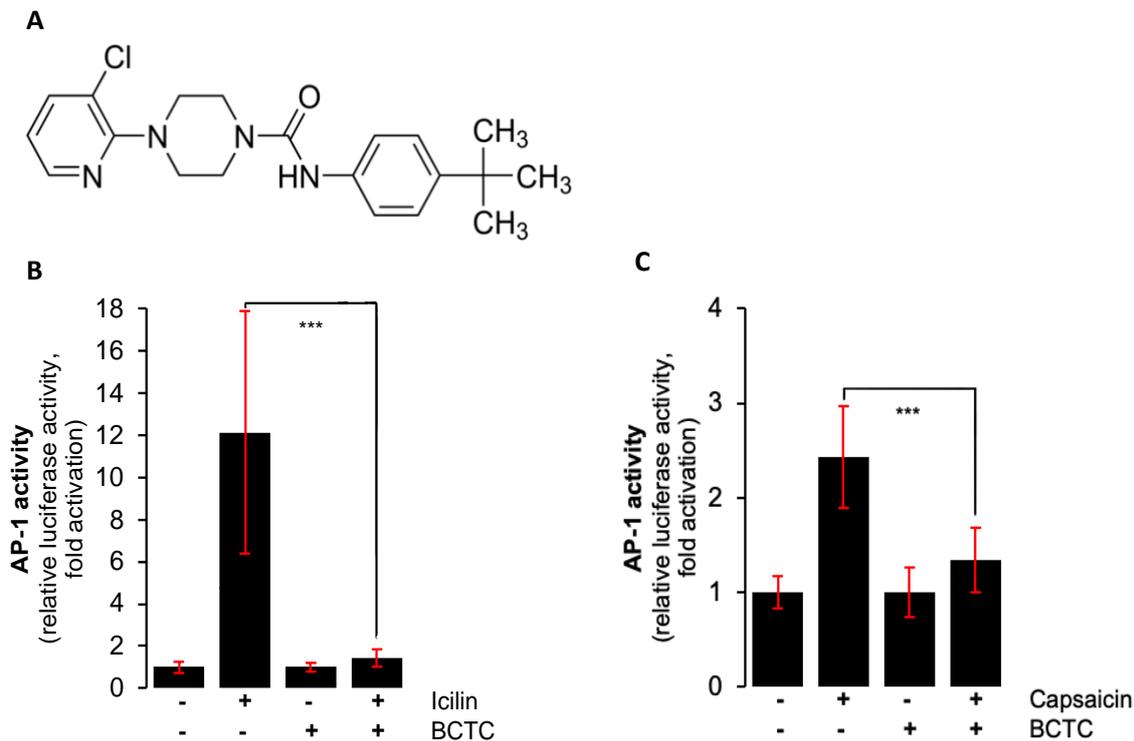


Abbildung 7: BCTC blockiert die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1, der durch Stimulierung von TRPM8 und TRPV1 induziert wird.

(A) Chemische Struktur von BCTC. (B) HEK293-M8 Zellen, HEK293-Zellen, die den TRPM8-Kanal exprimieren, wurden infiziert mit einem rekombinanten Lentivirus, der das Reportergen Coll.luc enthält. Im Anschluss wurden die Zellen für 24 Stunden in serum-reduzierten Medium inkubiert. Die Zellen wurden für 3 Stunden mit der Substanz BCTC (10 μ M) vorinkubiert und dann für 24 Stunden mit Icilin (1 μ M) in Anwesenheit von BCTC stimuliert. Die Zellextrakte wurden folgend auf ihre Luziferaseaktivität hin analysiert. Die Luziferaseaktivität wurde in Relation zur Proteinkonzentration gesetzt. (C) H2C1-Zellen, HEK293-Zellen, die den TRPV1-Kanal exprimierten, wurden ebenfalls mit einem rekombinanten Lentivirus infiziert, der den Reportergen Coll.luc enthält. Die Zellen wurden für 24 Stunden in serumreduziertem Medium inkubiert, dann für 3 Stunden mit BCTC (10 μ M) vorinkubiert und im Anschluss über einen Zeitraum von 24 Stunden mit Capsaicin (10 μ M) in Anwesenheit von BCTC stimuliert.

Die Daten zeigen die mittlere Standardabweichung von jeweils 3 unabhängigen Experimenten in vierfacher Ausführung (***) $P < 0,001$.

Die Verbindung BCTC wurde ursprünglich in der Literatur als ein potenter und für TRPV1-selektiver Antagonist beschrieben. *Abbildung 7 C* zeigt die chemische Struktur von BCTC. Es wurde gezeigt, dass auch der Calcium-Einstrom durch mit Menthol oder Icilin stimulierte TRPM8-Kanäle gehemmt wird (Behrendt et al., 2004, p. 1; Weil et al., 2005, p. 8). BCTC ist also auch ein potenter TRPM8-Antagonist. Um zu untersuchen, ob die Verbindung BCTC die Signaltransduktion der TRPM8 und TRPV1-Kanäle hemmt, wurden H2C1-Zellen und HEK293-M8-Zellen mit einem Lentivirus infiziert, der das Reportergen Coll.luc enthält. Die infizierten Zellen wurden für 24 Stunden in serum-reduziertem Medium inkubiert und für 3 Stunden mit der Verbindung BCTC vorinkubiert. Danach erfolgte die Stimulation der Zellen mit Capsaicin (H2C1-Zellen) oder Icilin (HEK293-M8-Zellen) in serum-reduzierten Medium in Anwesenheit von BCTC. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und die Luziferaseaktivität und die Proteinkonzentration bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, dass BCTC sowohl

die Icilin-induzierte Aktivierung des TRPM8-Kanals hemmt (Abbildung 7 A) als auch die Aktivierung des TRPV1-Kanals hemmt. (Abbildung 7 B). Die Signaltransduktion über den TRPM8-Kanal wird dabei um 88,25% reduziert. Die Signaltransduktion über den der TRPV1-Kanal wird um 44,71% reduziert.

3.3 Clotrimazol inhibiert die TRPM8- und TRPV1-gesteuerte Transkription

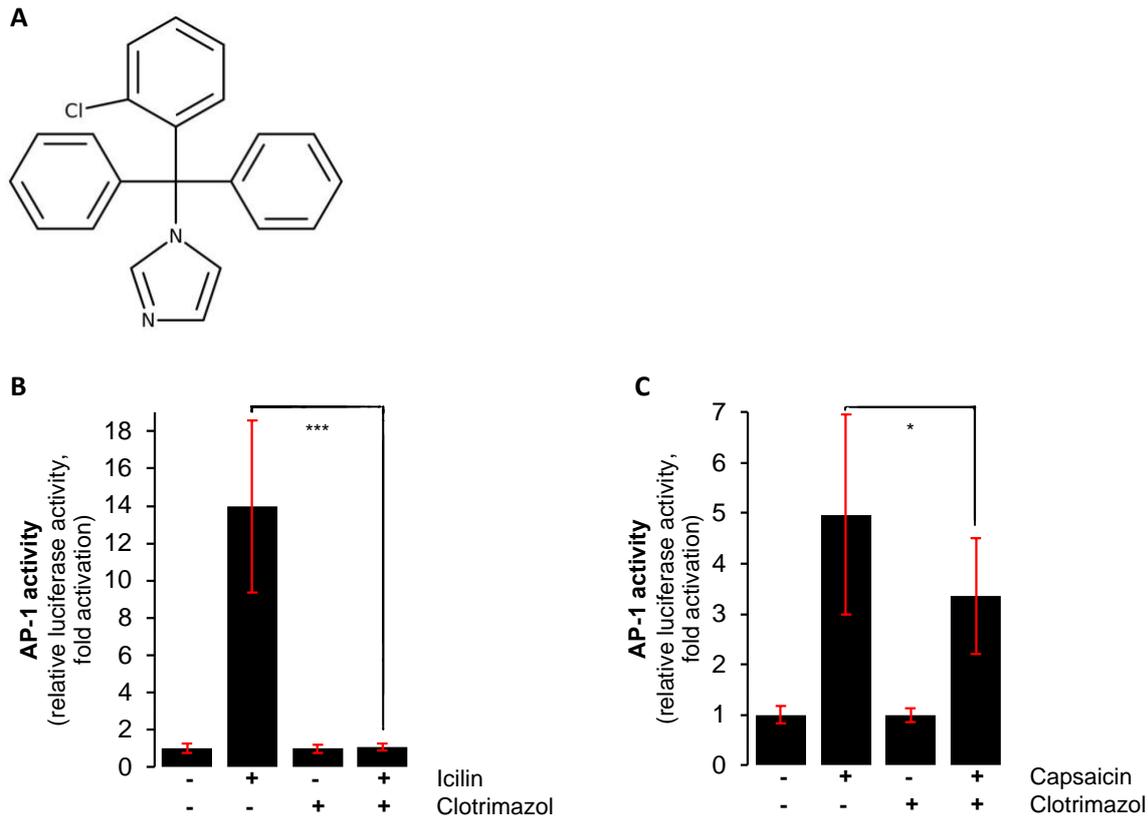


Abbildung 8: Cotrimazol hemmt die durch TRPM8 und TRV1 aktivierte Transkription.

(A) Chemische Struktur von Clotrimazol. (B) HEK293-M8 und (C) H2C1-Zellen, die das Coll.luc Reportergen enthielten, wurden in serum-reduziertem Medium für 24 Stunden inkubiert, für 3 Stunden mit Clotrimazol (2 μ M) vorinkubiert und dann mit Icilin (1 μ M) (B) oder Capsaicin (10 μ M) (C) für 24 Stunden in Anwesenheit von Clotrimazol inkubiert. Die Zellextrakte wurden aufgebrochen und dann auf ihre Luziferaseaktivität hin analysiert. Diese wurde anschließend mit der Proteinkonzentration ins Verhältnis gesetzt. Die Daten zeigen die mittlere Standardabweichung von jeweils 3 unabhängigen Experimenten in vierfacher Ausführung (***P < 0,001, *P < 0,05).

Das Antimykotikum Clotrimazol, welches als Breitspektrum-Antimykotikum zur topischen Therapie von Pilzinfektionen von Haut, Mund und Vagina verwendet wird, wurde bereits als Inhibitor der durch Kälte- oder Menthol-induzierten TRPM8-Kanäle beschrieben (Meseguer et al., 2008).

Um zu untersuchen, ob die Verbindung Clotrimazol die Signaltransduktion der TRPM8 und TRPV1-Kanäle beeinflusst, wurden H2C1-Zellen und HEK293-M8-Zellen, die das Reportergen Coll.luc enthielten, analysiert. Die Zellen wurden für 24 Stunden in serum-reduzierten Medium inkubiert und für 3 Stunden mit der Verbindung Clotrimazol vorinkubiert. Danach wurden die Zellen mit Capsaicin

(H2C1-Zellen) beziehungsweise Icilin (HEK293-M8-Zellen) in serum-reduziertem Medium in Anwesenheit von Clotrimazol stimuliert. Capsaicin wurde in einer Konzentration von 2 μ M verwendet, höhere Konzentrationen waren mit erhöhter Zelltoxizität assoziiert. Die Zellernte fand nach 24 Stunden statt, im Anschluss wurde die Luziferaseaktivität sowie die Proteinkonzentration bestimmt. *Abbildung 8 B* zeigt, dass Clotrimazol in den HEK293-M8-Zellen die AP-1 Aktivität fast vollständig blockierte. Die Signaltransduktion, die durch die Stimulation des TRPM8-Kanals induziert wurde, war um 92,34% reduziert. *Abbildung 8 C* zeigt, dass die Verbindung Clotrimazol die intrazelluläre Signalkaskade, die durch die Stimulation des TRPV1-Kanals induziert wurde, um 32,6% reduziert. Diese Ergebnisse zeigen, dass Clotrimazol in einem deutlich höheren Maße die Icilin-induzierte Aktivierung des TRPM8-Kanals hemmt als die Capsaicin-induzierte die Aktivierung des TRPV1-Kanals.

3.4 Progesteron reduziert die TRPM8- und TRPV1-gesteuerte Transkription

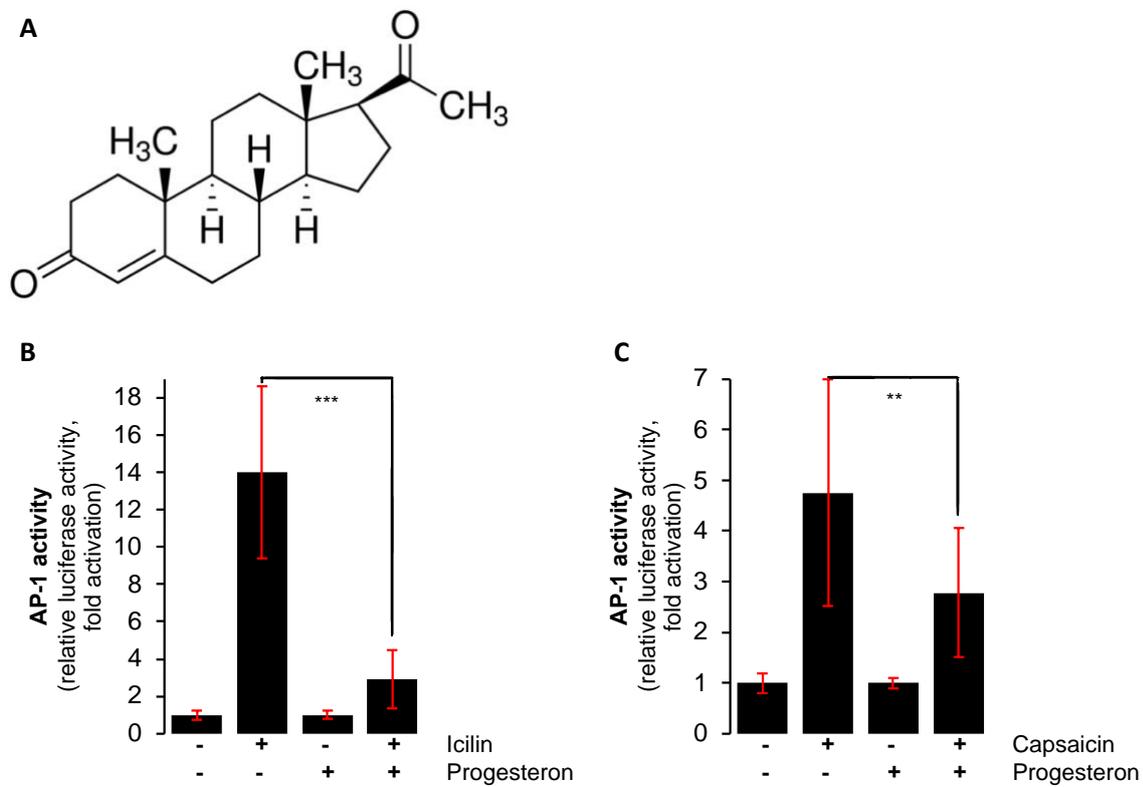


Abbildung 9: Progesteron reduziert die Aktivierung der Transkription durch den TRPM8-Kanal und den TRPV1-Kanal.

(A) Chemische Struktur von Progesteron. (B) HEK293-M8 und (C) H2C1-Zellen, die das Reportergen Coll.luc enthielten, wurden in serumreduziertem Medium für 24 Stunden inkubiert. Danach wurden sie für 3 Stunden mit Progesteron (20 μ M) vorinkubiert und dann mit Icilin (1 μ M) (B) oder Capsaicin (10 μ M) (C) für 24 Stunden in Anwesenheit von Progesteron inkubiert. Die Luziferaseaktivität wurde nun bestimmt und mit der Proteinkonzentration ins Verhältnis gesetzt. Die Daten zeigen die mittlere Standardabweichung von jeweils 3 unabhängigen Experimenten in vierfacher Ausführung (***P < 0,001; **P < 0,01).

Progesteron ist ein Sexualhormon aus der Gruppe der Gestagene. Vorbeschrieben ist eine Inhibition der TRPM3- und TRPC6-gesteuerten Transkription durch Progesteron (Lesch et al., 2014; Thiel and Rössler, 2017). Daten über den Effekt auf die Gentranskription nach Aktivierung des TRPM8- und TRPV1-Kanals lagen nicht vor. Daher wurde überprüft, ob Progesteron die Signaltransduktion des TRPM8- und TRPV1-Kanals beeinträchtigt. Die Strukturformel von Progesteron ist *Abbildung 9 C* zu entnehmen. Die Zellen wurden für 24 Stunden in serum-reduziertem Medium inkubiert und für 3 Stunden mit dem Hormon Progesteron vorinkubiert. Danach wurden die Zellen mit Capsaicin (H2C1-Zellen) oder Icilin (HEK293-M8-Zellen) in serum-reduziertem Medium in Anwesenheit von Progesteron stimuliert. 24 Stunden später wurden die Zellen geerntet, die Luziferaseaktivität und die Proteinkonzentration bestimmt und anschließend verrechnet. Hier konnte in beiden Zelllinien eine verringerte Luziferaseaktivität gemessen werden. Die Signaltransduktion über den TRPM8-Kanal

wurde um 79,22% reduziert. Die Signaltransduktion, die durch Stimulation des TRPV1-Kanals induziert worden war, war um 41,65% reduziert.

Das bedeutet, dass die Signalkaskade sowohl des TRPM8- als auch des TRPV1-Kanals durch Hinzugabe von Progesteron gehemmt wird.

3.5 Pregnenolon inhibiert TRPM8- und TRPV1-gesteuerte Transkription

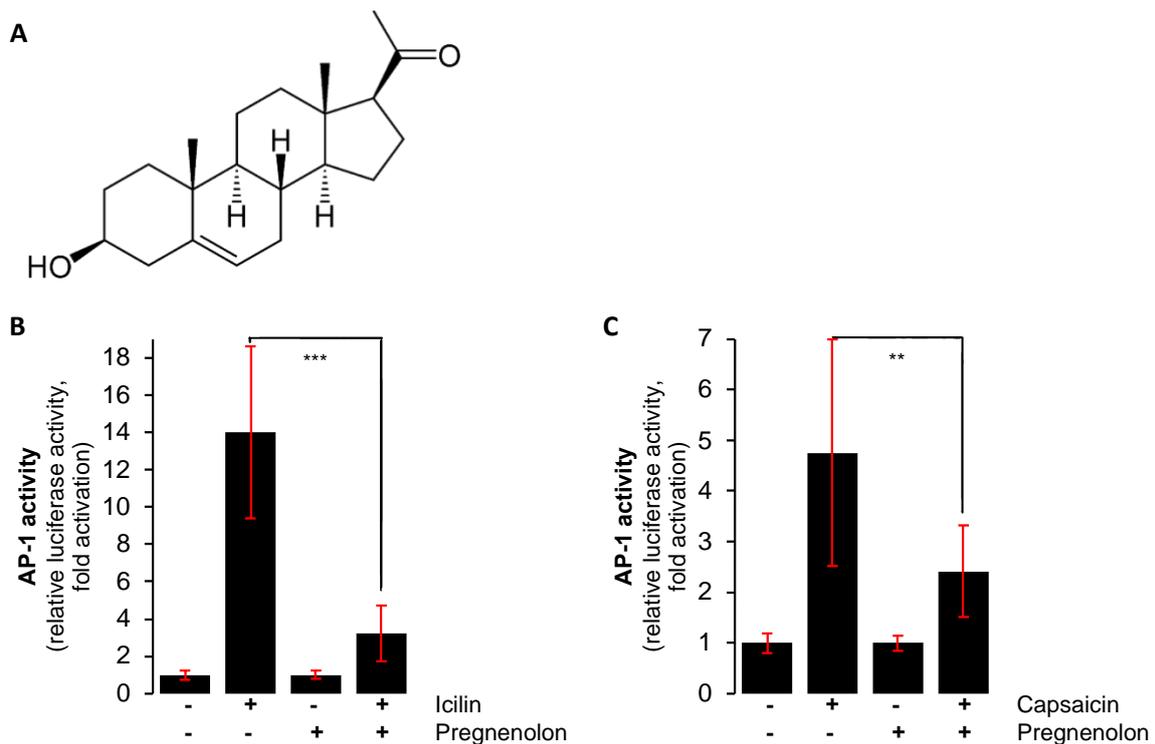


Abbildung 10: Pregnenolon reduziert die durch TRPM8 und TRPV1 induzierte Transkriptionsaktivität.

(A): Chemische Struktur von Pregnenolon. (B) HEK293-M8 und (C) H2C1-Zellen wurden mit einem rekombinanten Lentivirus infiziert, der das Reportergen Coll.luc enthält. Sie wurden in serum-reduziertem Medium für 24 Stunden inkubiert und anschließend für 3 Stunden mit Pregnenolon (20 μ M) vorinkubiert. Dann erfolgte die Stimulation mit Icilin (1 μ M) (B) oder Capsaicin (10 μ M) (C) für 24 Stunden in Anwesenheit von Pregnenolon. Die Zellextrakte wurden vorbereitet, die Luziferaseaktivität bestimmt und mit der Proteinkonzentration ins Verhältnis gesetzt. Die Daten zeigen die mittlere Standardabweichung von jeweils 3 unabhängigen Experimenten in vierfacher Ausführung (**P < 0,001), ***P < 0,01).

Bei Pregnenolon handelt es sich um ein Prohormon der Steroidhormone. Die Strukturformel von Pregnenolon ist *Abbildung 10 A* zu entnehmen. In dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob Pregnenolon einen Einfluss auf die TRPM8 und TRPV1-induzierte Signalkaskade hat. Hierfür wurde ebenfalls die AP-1-Aktivität zur Quantifizierung des inhibitorischen Effekts herangezogen. Dazu wurden die H2C1-Zellen und HEK293-M8-Zellen mit dem Reporter gen Coll.luc mittels lentiviraler Transfektion modifiziert und dann für 24 Stunden in serum-reduziertem Medium in Anwesenheit von Pregnenolon inkubiert. Dann erfolgte die Stimulation der Zellen mit Capsaicin (H2C1-Zellen) und Icilin (HEK293-M8-Zellen) in serum-reduziertem Medium in Anwesenheit von Pregnenolon. Die Zellernte fand nach 24 Stunden statt, im Anschluss wurde die Luziferaseaktivität und die Proteinkonzentration bestimmt. *Abbildung 10 B* zeigt, dass Pregnenolon in den HEK293-Zellen mit TRPM8 Expression die durch Icilin induzierte Signaltransduktion um 76,92% reduziert. *Abbildung 10 C* zeigt, dass die Signaltransduktion, die durch Stimulation des TRPV-Kanals induziert wurde, um 49,22% reduziert wurde. Diese Daten zeigen, dass Pregnenolon die Signaltransduktion nicht nur den bereits beschriebenen TRPM3-Kanal, sondern auch die Signalkaskade des TRPM8- und den TRPV1-Kanals reduziert.

3.6 Die Verbindung RQ-00203078 inhibiert die TRPM8-gesteuerte Transkription

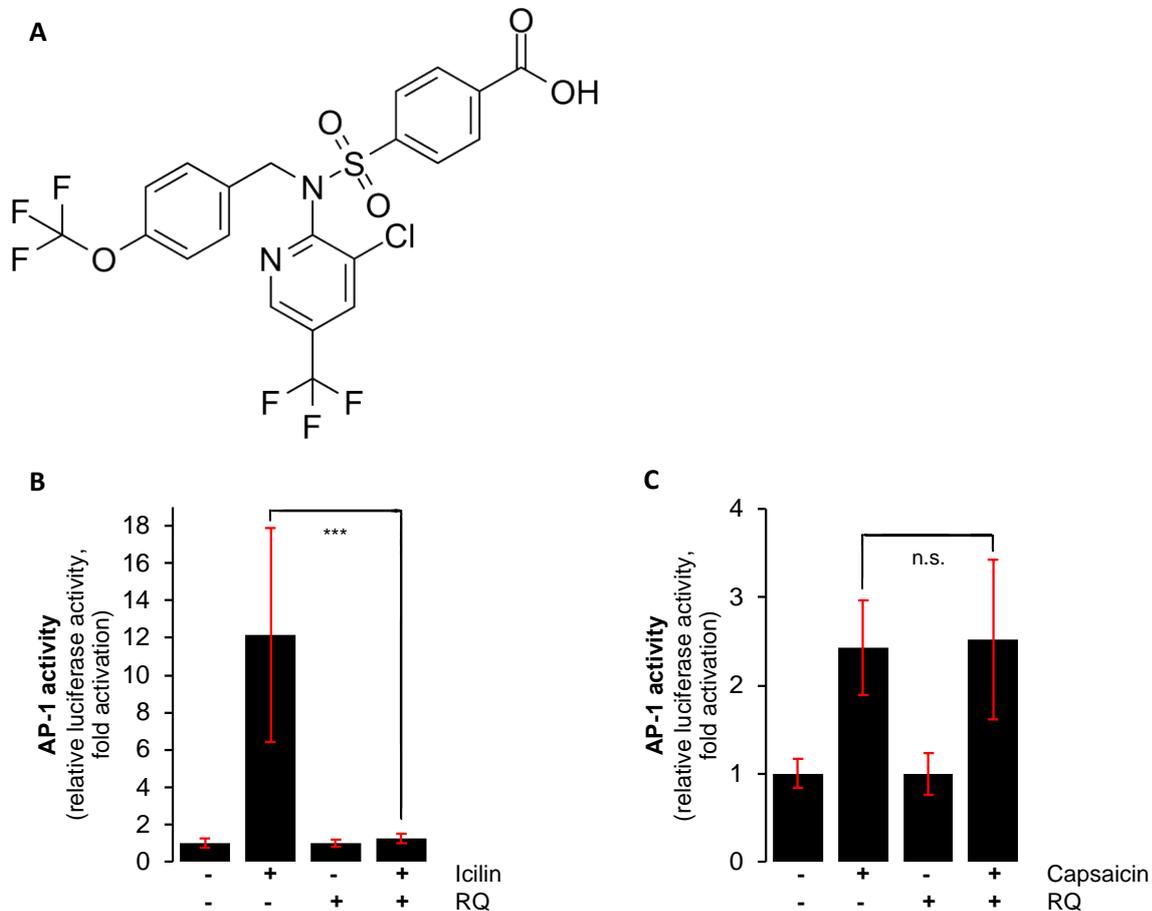


Abbildung 11: RQ-00203078 blockiert die durch TRPM8 vermittelte Transkriptionsaktivität.

(A): Chemische Struktur von RQ-00203078. (B) HEK293-M8 Zellen und (C) H2C1-Zellen wurden wie in *Abbildung 7* beschrieben vorbereitet. Im Anschluss wurden sie für 3 Stunden mit RQ-00203078 vorinkubiert und in Anwesenheit von RQ-00203078 über 24 Stunden stimuliert. Die Zellextrakte wurden dann vorbereitet, die Luziferaseaktivität bestimmt und abschließend mit der Proteinkonzentration ins Verhältnis gesetzt. Die Daten zeigen die mittlere Standardabweichung von jeweils 3 unabhängig durchgeführten Experimenten in jeweils vierfacher Ausführung (**P < 0,001, n.s., nicht signifikant).

Die Verbindung RQ-00203078 wurde bereits als Inhibitor des Menthol-gesteuerten Calciumeinstroms über den TRPM8-Kanal beschrieben (Ohmi et al., 2014). In *Abbildung 11 A* ist die Strukturformel von RQ-00203078 dargestellt.

Um zu untersuchen, ob RQ-00203078 auch die TRPM8- und TRPV1-induzierte Signaltransduktion beeinträchtigt, wurden H2C1-Zellen und HEK293-M8-Zellen mit einem Lentivirus infiziert, welcher das Reportergen Coll.luc enthielt. Die Zellen wurden für 24 Stunden in serum-reduziertem Medium kultiviert und für 3 Stunden mit der Verbindung RQ-00203078 vorinkubiert. Danach wurden die Zellen mit Capsaicin (H2C1-Zellen) oder Icilin (HEK293-M8-Zellen) in serum-reduzierten Medium in Anwesenheit von RQ-00203078 stimuliert. Weitere 24 Stunden später wurden die Zellen geerntet und die Luziferaseaktivität sowie die Proteinkonzentration bestimmt. Die Messergebnisse zeigen, dass in

Anwesenheit von RQ-00203078 in den HEK293-M8 Zellen die AP-1 Aktivität um 89,58% reduziert war (*Abbildung 11 B*). Dabei reichte eine Konzentration von 1 μ M, um die Signalkaskade signifikant zu inhibieren. Für die H2C1 Zellen konnte keinen Unterschied dokumentiert werden. Die Signalkaskade des TRPV1-Kanals wurde also nicht durch die Anwesenheit von RQ-00203078 unterbrochen.

3.7 TC-I 2014 inhibiert die TRPM8- und TRPV1-gesteuerte Transkription

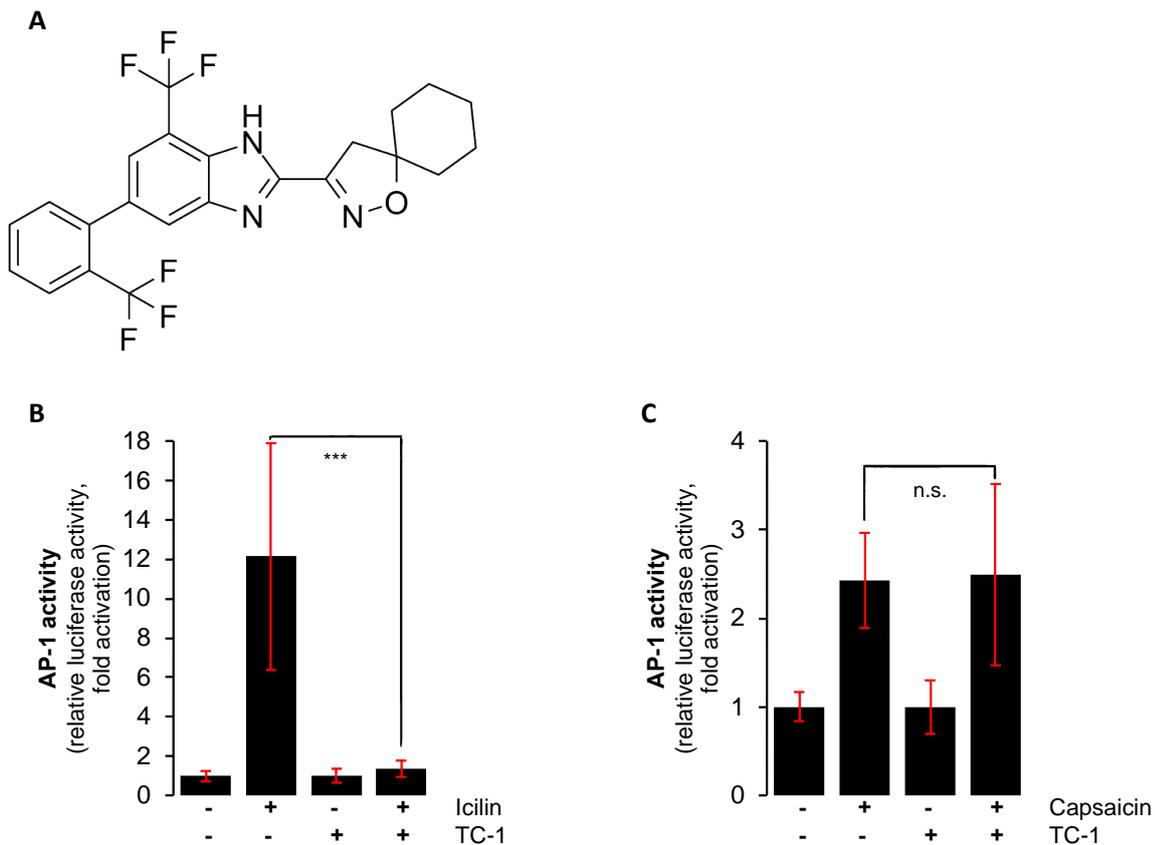


Abbildung 12: TC-I 2014 inhibiert die TRPM8-abhängige Transkription.

(A) Chemische Struktur von TC-I 2014. (B) HEK293-M8 Zellen und (C) H2C1 Zellen, die das Coll.luc Reporter gen enthielten, wurden mit TC-I 2014 (1 μ M) über 3 Stunden vorinkubiert und danach in Präsenz von TC-I 2014 stimuliert. Die Daten zeigen die mittlere Standardabweichung von jeweils 3 unabhängigen Experimenten in vierfacher Ausführung (***P < 0,001, n.s., nicht signifikant).

Für die synthetische Verbindung TC-I 2014 (*Abbildung 12 A*) konnte bereits gezeigt werden, dass es in einer Konzentration von 1 μ M die TRPM8-gesteuerte Transkription in durch Icilin stimulierten HEK293-M8 Zellen fast vollständig inhibieren kann (“Alomone Labs TC-I 2014,” n.d.). Um zu überprüfen, ob die Verbindung TC-I 2014 einen Einfluss auf die Signaltransduktion des TRPM8- und des TRPV1-Kanals hat, wurden folgende Experimente durchgeführt.

H2C1-Zellen und HEK293-M8-Zellen wurden mit einem Lentivirus infiziert, der das Reporter gen Coll.luc enthält. Die Zellen wurden dann für 24 Stunden in serum-reduziertem Medium inkubiert.

Danach wurden die Zellen für 3 Stunden mit der Verbindung TC-I 2014 vorinkubiert. Die Zellen wurden mit Capsaicin (H2C1-Zellen) und Icilin (HEK293-M8-Zellen) in serum-reduziertem Medium in Anwesenheit von TC-I 2014 stimuliert. Die Zellernte wurde dann nach 24 Stunden durchgeführt und im Anschluss die Luziferaseaktivität wie die Proteinkonzentration bestimmt.

Die Experimente zeigen einen deutlichen Unterschied in der Wirkungsweise von TC-I 2014. Die Verbindung hemmte fast vollständig die Signaltransduktion des TRPM8-Kanals, eine Reduktion der AP-1 Aktivität um 88,64% konnte gemessen werden. Die Verbindung hatte hingegen keine Wirkung auf die Signalkaskade, die durch die Stimulation des TRPV1-Kanals ausgelöst wurde.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methoden

Zur Messung der Aktivität der Kanäle wurde der Transkriptionsfaktor AP-1 hinzugezogen. Ein Anstieg der Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 nach entsprechender Stimulation der Kanäle konnte bereits zuvor nachgewiesen werden. So wiesen HEK293er Zellen mit Expression des TRPM8-Kanals nach Gabe von Icilin eine erhöhte AP-1 Aktivität auf (Thiel et al., 2019a). Auch für H2C1-Zellen mit Expression des TRPV1 Kanals konnte nach Stimulation mit Capsaicin eine erhöhte Aktivität von AP-1 nachgewiesen werden (Backes et al., 2018).

Es existieren jedoch weitere Methoden zur Aktivitätsmessung der TRP-Kanäle. Diese sind unter anderem die Calcium-Bildgebung mit einem Fluoreszenzmikroskop oder die *Patch-Clamp* Methode. Hierbei sind jedoch deutlich höhere Stoffkonzentrationen notwendig und die Messungen stellen aufgrund der hohen Fehleranfälligkeit größere Anforderungen an den Untersucher (Williams and Wozny, 2011). Ein weiter Nachteil der Messung der Calciumkonzentration ist, dass die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration nicht zwangsläufig die Aktivierung einer Signalkaskade auslösen muss (Lesch, 2018).

Der Vorteil der Messung der Signalfunktion der TRP-Kanäle mithilfe des Transkriptionsfaktors AP-1 ist, dass hiermit die intrazelluläre Signalkaskade von der Plasmamembran bis zum Nukleus verfolgt werden kann und diese Messungen unter weitgehend physiologischen Umständen durchgeführt werden können. Alternativ wäre die Messung der Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 möglich.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Überprüfung der in der Literatur beschriebenen pharmakologischen Inhibitoren und Stimulatoren von TRP-Kanälen auf ihre Spezifität und Aktivität am TRPM8- und TRPV1-Kanal. Untersucht wurden dabei die Inhibitoren BCTC, TC-I 2014, RQ-00203078, Clotrimazol, Pregnenolon und Progesteron. Für Pregnenolon lagen bislang keine Daten zu den TRPM8- und TRPV1-Kanälen vor, für Progesteron sowie TC-I 2014 standen Untersuchungen am TRPV1-Kanal noch aus.

BCTC wurde lange als spezifischer TRPV1-Antagonist beschrieben (Valenzano et al., 2003). Im Verlauf wurde jedoch auch ein Effekt auf den L-Typ-Calcium-Kanal in TRPM8-Kanälen entdeckt, auch hier erfolgte eine Inhibition. Weitere Erkenntnisse zeigten, dass jedoch auch Calcium-Kanäle vom T-Typ inhibiert werden (McArthur et al., 2019). Somit ist BCTC nicht als spezifischer TRPV1-Antagonist einsetzbar, es ist vielmehr als ein unspezifischer Antagonist verschiedener Calcium-Kanäle anzusehen. In Versuchen an Mäusen konnte ein positiver Effekt von BCTC bei Herzinsuffizienz und Myokardhypertrophie nachgewiesen werden (Horton et al., 2013).

TC-I 2014 zeigte auf dem TRPM8- und den TRPM3-Kanal (Thiel et al., 2019a) eine hemmende Wirkung, die Signalkaskade von Rezeptorstimulation bis hin zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 wurde blockiert. Die Signalkaskade von TRPV1 zeigte sich jedoch nicht in ihrer Funktion gestört. RQ-00203078 ist von den untersuchten Verbindungen die einzige Verbindung, die nur die AP-1-Aktivierung durch TRPM8 inhibierte. Hier bestätigte sich die fehlende inhibitorische Wirkung auf TRPV1, in der Literatur sind keine Effekte auf TRPM3, TRPA1, TRPV4 und TRPV1 beschrieben worden (Ohmi et al., 2014). Durch die hohe Selektivität ist RQ-00203078 seit längerer Zeit bereits Gegenstand der Forschung am TRPM8-Kanal. So konnte gezeigt werden, dass durch die Blockade der TRPM8-Kanäle durch RQ-00203078 das Potential zum invasiven Wachstum von oralen Plattenepithelkarzinomen reduziert wurde (Okamoto et al., 2012). Weiterhin sind bereits *in vivo* Experimente durchgeführt worden. Hier konnte ein Effekt von TRPM8 auf die Blasenkapazität und Restharmenge in Ratten dargestellt werden. Aktivierung von TRPM8 führte zu einer abnehmenden Blasenkapazität und Restharmenge, die Gabe von RQ-00203078 führte zu einer Verbesserung dieser Werte (Ito et al., 2016).

Clotrimazol ist ein bekannter Inhibitor von TRPM2, TRPM3, TRPC6, TRPV4 und TRPM8. Dies konnte in zuvor erfolgten *Patch-Clamp* Untersuchungen und der Calciumbildgebung dargestellt werden (Harteneck et al., 2011; Hill et al., 2004; Meseguer et al., 2008). Für den TRPM8-Kanal konnte ebenfalls eine inhibitorische Wirkung nachgewiesen werden, die Ergebnisse hier zeigen eine starke Suppression der AP-1-Aktivität nach Stimulation des TRPM8-Kanals mit Icilin. Für den TRPV1-Kanal ist eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration nach Gabe von Clotrimazol gezeigt worden (Meseguer et al., 2008). Die hier erhobenen Daten zeigen jedoch keine stimulierende Wirkung auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1. Dies ist ein Hinweis, dass die Erhöhung des intrazellulären Calciums nicht zwangsläufig eine bis zur Transkription nachverfolgbare Signalkaskade auslöst.

Für Pregnenolon wurde in der Literatur eine stimulierende Wirkung auf den TRPM1- und TRPM3-Kanal beschrieben (Harteneck, 2013). In dem TRPV1- und TRPM8-Kanal zeigte sich hier jedoch erstmalig eine inhibitorische Wirkung.

Progesteron wurde ebenfalls als Inhibitor verschiedener TRP-Kanäle beschrieben. So wurde eine Hemmung des TRPC6-Kanals sowie des TRPM3-Kanals anhand eines gestörten Calciumeinstroms in die Zelle dokumentiert (Majeed et al., 2012; Miede et al., 2012). Hier konnte gezeigt werden, dass auch für den TRPM8 und den TRPV1 eine inhibitorische Wirkung auf die Signalkaskade vorliegt. Eine so breite Wirkung auf die TRP-Kanäle widerspricht jedoch einer Existenz spezifischer Domänen, an denen die Interaktion des Hormones mit dem Kanal stattfindet. Wahrscheinlicher ist eine Interaktion des Hormones mit der Zellmembran mit einhergehender Beeinflussung des TRP-Kanals (Atkovska et al., 2018). Die Experimente bestätigen zum großen Teil die in der Literatur vorbeschriebene Wirksamkeit der ausgewählten Stimulatoren und Inhibitoren des TRPM8- und TRPV1-Kanals. Die Zellen mit hinzugefügten Stimulantien wiesen eine erhöhte Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 auf, die Zellen, welche zur Kontrolle nur das Lösungsmittel des jeweiligen Stimulators erhielten, präsentierten

eine geringere AP-1 Aktivität. Bei den Inhibitoren zeigten sich BCTC, Clotrimazol, Progesteron, Pregnenolon, RQ-00203078 und TC-I 2014 selektiv für den TRPM8-Kanal mit einer guten Supprimierung der AP-1-Aktivität. Spezifisch für den TRPM8-Kanal war dabei nur RQ-00203078, die anderen Substanzen präsentierten sich als Calciumkanalblocker mit einem breiten Wirkspektrum. Für den TRPV1-Kanal zeigten sich die Inhibitoren BCTC, Clotrimazol, Progesteron und Pregnenolon selektiv.

Die neuen Erkenntnisse über die Wirkung von Progesteron und TC-I am TRPV1-Kanal können zukünftig weitere Untersuchungen ermöglichen und bieten im Falle des Inhibitors Progesteron auch möglichen medizinischen Nutzen. Mit Pregnenolon als neuen Antagonisten beider untersuchten Kanäle bieten sich ebenfalls neue Möglichkeiten in der Erforschung der TRP-Kanäle.

5 Abkürzungsverzeichnis

AP-1	Activator Protein 1
BCA	Bicinchinoninsäure-Assay
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinases
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
RRE	Rev Response Element
SV40 pA	Similian Virus 40 PolyA
TRE	TPA-response-element
TRP-Kanäle	Transienten Rezeptor Potential Kanäle
VSDL	Voltage Sensor like domain; Spannungssensor
WPRE	Woodchuck Hepatitis Virus Postranscriptional Regulatory Element

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht der TRP Kanäle	7
Abbildung 2: Struktur des TRPM8 im geöffneten und geschlossenen Zustand	9
Abbildung 3: Struktur des TRPV1 Kanals	10
Abbildung 4: Schematische Darstellung der verwendeten Plasmide	20
Abbildung 5: Vergrößerung des Transfervektors Coll.luc auf Ebene des Provirus	20
Abbildung 6: Übersicht über die Schritte der Transfektion sowie Infektion	21
Abbildung 7: BCTC blockiert die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1, der durch Stimulierung von TRPM8 und TRPV1 induziert wird.	27

Abbildung 8: Cotrimazol hemmt die durch TRPM8 und TRV1 aktivierte Transkription.	28
Abbildung 9: Progesteron reduziert die Aktivierung der Transkription durch den TRPM8-Kanal und den TRPV1-Kanal.	30
Abbildung 10: Pregnenolon reduziert die durch TRPM8 und TRPV1 induzierte Transkriptionsaktivität.	31
Abbildung 11: RQ-00203078 blockiert die durch TRPM8 vermittelte Transkriptionsaktivität. ..	33
Abbildung 12: TC-I 2014 inhibiert die TRPM8-abhängige Transkription.	34

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien	14
Tabelle 2: Verwendete Stimulatoren und Inhibitoren	15
Tabelle 3: Verwendete Geräte	16
Tabelle 4: Verbrauchsmaterial	16
Tabelle 5: Zusätze zu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	17
Tabelle 6: Zusätze für DMEM serumreduziert	17
Tabelle 7: 2x HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)	17
Tabelle 8: Luziferase Assay Reagent	17
Tabelle 9: 1x PBS (Phosphate-Buffered Saline)	18
Tabelle 10: Transfektionslösung 1	18
Tabelle 11: Transfektionslösung 2	18
Tabelle 12: Trypsin/EDTA	18
Tabelle 13: Standardreihe der Proteinkonzentrationen, in µg/ml	24
Tabelle 14: Signifikanzniveau	25

8 Literaturverzeichnis

- Alomone Labs TC-I 2014 [WWW Document], n.d. . Alomone Labs. URL <https://www.alomone.com/p/tc-i-2014/T-200> (accessed 8.9.22).
- Andersen, H.H., Gazerani, P., Arendt-Nielsen, L., 2016. High-Concentration L-Menthol Exhibits Counter-Irritancy to Neurogenic Inflammation, Thermal and Mechanical Hyperalgesia Caused by Trans-cinnamaldehyde. *J Pain* 17, 919–929. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2016.05.004>
- Atkovska, K., Klingler, J., Oberwinkler, J., Keller, S., Hub, J.S., 2018. Rationalizing Steroid Interactions with Lipid Membranes: Conformations, Partitioning, and Kinetics. *ACS Cent. Sci.* 4, 1155–1165. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.8b00332>
- Backes, T.M., Rössler, O.G., Hui, X., Grötzinger, C., Lipp, P., Thiel, G., 2018. Stimulation of TRPV1 channels activates the AP-1 transcription factor. *Biochemical Pharmacology* 150, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.02.008>
- Behrendt, H.-J., Germann, T., Gillen, C., Hatt, H., Jostock, R., 2004. Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor type-1 VR1 using a fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay. *Br J Pharmacol* 141, 737–745. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705652>
- Bödding, M., Wissenbach, U., Flockerzi, V., 2007. Characterisation of TRPM8 as a pharmacophore receptor. *Cell Calcium* 42, 618–628. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2007.03.005>
- Brito, R., Sheth, S., Mukherjea, D., Rybak, L.P., Ramkumar, V., 2014. TRPV1: A Potential Drug Target for Treating Various Diseases. *Cells* 3, 517–545. <https://doi.org/10.3390/cells3020517>
- Diver, M.M., Cheng, Y., Julius, D., 2019. Structural insights into TRPM8 inhibition and desensitization. *Science* 365, 1434–1440. <https://doi.org/10.1126/science.aax6672>
- European Medicines Agency, 2018. Qutenza [WWW Document]. European Medicines Agency. URL <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/qutenza> (accessed 2.23.21).
- González-Muñiz, R., Bonache, M.A., Martín-Escura, C., Gómez-Monterrey, I., 2019. Recent Progress in TRPM8 Modulation: An Update. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20112618>
- Harteneck, C., 2013. Pregnenolone Sulfate: From Steroid Metabolite to TRP Channel Ligand. *Molecules* 18, 12012–12028. <https://doi.org/10.3390/molecules181012012>
- Harteneck, C., Klose, C., Krautwurst, D., 2011. Synthetic modulators of TRP channel activity. *Adv Exp Med Biol* 704, 87–106. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0265-3_4
- Hill, K., McNulty, S., Randall, A.D., 2004. Inhibition of TRPM2 channels by the antifungal agents clotrimazole and econazole. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 370, 227–237. <https://doi.org/10.1007/s00210-004-0981-y>
- Horton, J.S., Buckley, C.L., Stokes, A.J., 2013. Successful TRPV1 antagonist treatment for cardiac hypertrophy and heart failure in mice. *Channels (Austin)* 7, 17–22. <https://doi.org/10.4161/chan.23006>
- Ito, H., Aizawa, N., Sugiyama, R., Watanabe, S., Takahashi, N., Tajimi, M., Fukuhara, H., Homma, Y., Kubota, Y., Andersson, K.-E., Igawa, Y., 2016. Functional role of the transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) ion channel in the urinary bladder assessed by conscious cystometry and ex vivo measurements of single-unit mechanosensitive bladder afferent activities in the rat. *BJU Int* 117, 484–494. <https://doi.org/10.1111/bju.13225>

- Lab Equipment and Lab Supplies | Fisher Scientific [WWW Document], n.d. URL <https://www.fishersci.de/de/de/home.html> (accessed 1.14.22).
- Lesch, A., Rubil, S., Thiel, G., 2014. Activation and inhibition of transient receptor potential TRPM3-induced gene transcription. *British Journal of Pharmacology* 171, 2645–2658. <https://doi.org/10.1111/bph.12524>
- Lesch, A.C., 2018. Signalverarbeitung auf der zellulären und molekularen Ebene: Pankreatische β -Zellen und TRPM3-Kanalproteine.
- Liao, M., Cao, E., Julius, D., Cheng, Y., 2013. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature* 504, 107–112. <https://doi.org/10.1038/nature12822>
- Majeed, Y., Tumova, S., Green, B.L., Seymour, V.A.L., Woods, D.M., Agarwal, A.K., Naylor, J., Jiang, S., Picton, H.M., Porter, K.E., O'Regan, D.J., Muraki, K., Fishwick, C.W.G., Beech, D.J., 2012. Pregnenolone sulphate-independent inhibition of TRPM3 channels by progesterone. *Cell Calcium* 51, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.09.005>
- McArthur, J.R., Finol-Urdaneta, R.K., Adams, D.J., 2019. Analgesic transient receptor potential vanilloid-1-active compounds inhibit native and recombinant T-type calcium channels. *Br J Pharmacol* 176, 2264–2278. <https://doi.org/10.1111/bph.14676>
- MedChemExpress (MCE): Inhibitors, Agonists & Screening Libraries | Master of Small Molecules [WWW Document], n.d. . MedchemExpress.com. URL <https://www.medchemexpress.com/> (accessed 1.14.22).
- Merck | Germany [WWW Document], n.d. URL <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de> (accessed 1.14.22).
- Mergler, S., Skrzypski, M., Sassek, M., Pietrzak, P., Pucci, C., Wiedenmann, B., Strowski, M.Z., 2012. Thermo-sensitive transient receptor potential vanilloid channel-1 regulates intracellular calcium and triggers chromogranin A secretion in pancreatic neuroendocrine BON-1 tumor cells. *Cellular Signalling* 24, 233–246. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.09.005>
- Meseguer, V., Karashima, Y., Talavera, K., D'Hoedt, D., Donovan-Rodríguez, T., Viana, F., Nilius, B., Voets, T., 2008. Transient receptor potential channels in sensory neurons are targets of the antimycotic agent clotrimazole. *J Neurosci* 28, 576–586. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4772-07.2008>
- Miehe, S., Crause, P., Schmidt, T., Löhn, M., Kleemann, H.-W., Licher, T., Dittrich, W., Rütten, H., Strübing, C., 2012. Inhibition of diacylglycerol-sensitive TRPC channels by synthetic and natural steroids. *PLoS One* 7, e35393. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035393>
- Mukherjea, D., Jajoo, S., Whitworth, C., Bunch, J.R., Turner, J.G., Rybak, L.P., Ramkumar, V., 2008. Short Interfering RNA against Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Attenuates Cisplatin-Induced Hearing Loss in the Rat. *J Neurosci* 28, 13056–13065. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1307-08.2008>
- Ohmi, M., Shishido, Y., Inoue, T., Ando, K., Fujiuchi, A., Yamada, A., Watanabe, S., Kawamura, K., 2014. Identification of a novel 2-pyridyl-benzensulfonamide derivative, RQ-00203078, as a selective and orally active TRPM8 antagonist. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 24, 5364–5368. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.10.074>
- Okamoto, Y., Ohkubo, T., Ikebe, T., Yamazaki, J., 2012. Blockade of TRPM8 activity reduces the invasion potential of oral squamous carcinoma cell lines. *Int J Oncol* 40, 1431–1440. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1340>

- O'Neill, J., Brock, C., Olesen, A.E., Andresen, T., Nilsson, M., Dickenson, A.H., 2012. Unravelling the Mystery of Capsaicin: A Tool to Understand and Treat Pain. *Pharmacol Rev* 64, 939–971. <https://doi.org/10.1124/pr.112.006163>
- Pear, W.S., Nolan, G.P., Scott, M.L., Baltimore, D., 1993. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8392–8396.
- Proudfoot, C.J., Garry, E.M., Cottrell, D.F., Rosie, R., Anderson, H., Robertson, D.C., Fleetwood-Walker, S.M., Mitchell, R., 2006. Analgesia Mediated by the TRPM8 Cold Receptor in Chronic Neuropathic Pain. *Current Biology* 16, 1591–1605. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.07.061>
- Rohács, T., Lopes, C.M.B., Michailidis, I., Logothetis, D.E., 2005. PI(4,5)P₂ regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat Neurosci* 8, 626–634. <https://doi.org/10.1038/nn1451>
- Thiel, G., Backes, T.M., Welck, J., Steinhausen, S., Fischer, A.-L., Langfermann, D.S., Ulrich, M., Wissenbach, U., Rössler, O.G., 2019a. Pharmacological inhibition of TRPM8-induced gene transcription. *Biochem Pharmacol* 170, 113678. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113678>
- Thiel, G., Lesch, A., Keim, A., 2012. Transcriptional Response to Calcium-Sensing Receptor Stimulation. *Endocrinology* 153, 4716–4728. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1343>
- Thiel, G., Rössler, O.G., 2017. Hyperforin activates gene transcription involving transient receptor potential C₆ channels. *Biochemical Pharmacology* 129, 96–107. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.01.007>
- Thiel, G., Rössler, O.G., 2011. Immediate-Early Transcriptional Response to Angiotensin II in Human Adrenocortical Cells. *Endocrinology* 152, 4211–4223. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1243>
- Thiel, G., Welck, J., Wissenbach, U., Rössler, O.G., 2019b. Dihydrotestosterone activates AP-1 in LNCaP prostate cancer cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 110, 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2019.02.005>
- Tsuruda, P.R., Julius, D., Minor, D.L., 2006. Coiled Coils Direct Assembly of a Cold-Activated TRP Channel. *Neuron* 51, 201–212. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.06.023>
- Valenzano, K.J., Grant, E.R., Wu, G., Hachicha, M., Schmid, L., Tafesse, L., Sun, Q., Rotshteyn, Y., Francis, J., Limberis, J., Malik, S., Whittemore, E.R., Hodges, D., 2003. N-(4-tertiarybutylphenyl)-4-(3-chloropyridin-2-yl)tetrahydropyrazine -1(2H)-carbox-amide (BCTC), a novel, orally effective vanilloid receptor 1 antagonist with analgesic properties: I. in vitro characterization and pharmacokinetic properties. *J Pharmacol Exp Ther* 306, 377–386. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.045674>
- Weil, A., Moore, S.E., Waite, N.J., Randall, A., Gunthorpe, M.J., 2005. Conservation of Functional and Pharmacological Properties in the Distantly Related Temperature Sensors TRPV1 and TRPM8. *Mol Pharmacol* 68, 518–527. <https://doi.org/10.1124/mol.105.012146>
- Weyer, A.D., Lehto, S.G., 2017. Development of TRPM8 Antagonists to Treat Chronic Pain and Migraine. *Pharmaceuticals (Basel)* 10. <https://doi.org/10.3390/ph10020037>
- Williams, S.R., Wozny, C., 2011. Errors in the measurement of voltage-activated ion channels in cell-attached patch-clamp recordings. *Nat Commun* 2, 242. <https://doi.org/10.1038/ncomms1225>
- Yang, F., Zheng, J., 2017. Understand spiciness: mechanism of TRPV1 channel activation by capsaicin. *Protein Cell* 8, 169–177. <https://doi.org/10.1007/s13238-016-0353-7>

Yin, Y., Lee, S.-Y., 2020. Current View of Ligand and Lipid Recognition by the Menthol Receptor TRPM8. Trends in Biochemical Sciences 45, 806–819. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.05.008>

9 Publikation

Thiel, G., Backes, T.M., Welck, J., **Steinhausen, S.**, Fischer, A.-L., Langfermann, D.S., Ulrich, M., Wissenbach, U., Rössler, O.G., 2019a. Pharmacological inhibition of TRPM8-induced gene transcription. Biochem Pharmacol 170, 113678. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113678>.

(Impact Factor: 4,960)

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, ohne deren Unterstützung die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Allen voran möchte ich Herrn Professor Dr. Gerald Thiel für das Überlassen des spannenden Themas meiner Promotionsarbeit sowie für die herzliche wie unmittelbare Unterstützung über die gesamte Dauer der Dissertation hinweg danken.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Dr. Oliver Rösler, der mir ebenfalls jederzeit mit Rat und technischer Expertise zur Seite stand. Zudem möchte ich dem gesamten Laborteam, insbesondere Tobias M. Backes, danken, dessen Unterstützung gerade in der experimentellen Phase meiner Dissertation sehr wertvoll war.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Freundin Michelle Bous, meinem Bruder Paul Steinhausen und meinen Eltern Doris und Tobias Steinhausen bedanken, die immer an mich geglaubt haben und mir jedwede Unterstützung zukommen ließen.

11 Lebenslauf

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

