

Aus dem Bereich Medizinische Biochemie und Molekularbiologie

Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Pharmakologische und genetische Hemmung der TRPC6-induzierten Gentranskription

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

der Universität des Saarlandes
2022

vorgelegt von: Julia Scheuble geb. am: 21.03.1997 in Essen

Tag der Kolloquiums: 10.02.2023

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

1. Berichtstatter: Prof. Dr. Gerald Thiel

2. Berichtstatter: Prof. Dr. Adolfo Cavalié

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Abkürzungen	1
Zusammenfassung	6
Summary - Pharmacological and genetic Inhibition of TRPC6-induced gene transcription	7
1. Einleitung	8
1.1 TRP-Kanäle	10
1.1.1 TRPC6-Kanal.....	11
1.2 Zielsetzung.....	15
2. Material und Methodik	16
2.1 Material.....	16
2.1.1 Chemikalien	16
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	17
2.1.3 Geräte.....	17
2.1.4 Zelllinien.....	18
2.1.5 Vektoren und Plasmide	18
2.1.6 Verpackungsplasmid Δ 8.91	19
2.1.7 Expressionsplasmid pCMV-G	19
2.1.8 SIN-Transfervektor	20
2.1.9 Lentivirale Reporterplasmide	20
2.1.10 Lentivirale Expressionsplasmide.....	22
2.2 Methodik.....	25
2.2.1 Kultivierung der Zelllinien	25
2.2.2 Passage.....	25
2.2.3 Herstellung von rekombinanten Lentiviren	26
2.2.4 Infektion der Zielzellen.....	27
2.2.5 Stimulation der Zielzellen	28
2.2.6 Reporteranalyse.....	28
2.2.7 Bicinchoninsäure (BCA) Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration.....	29
2.2.8 Statistik.....	30

3. Ergebnisse	31
3.1 Hyperforin induziert die AP-1-Aktivierung in T6.11-Zellen.....	31
3.2 Die Expression einer TRPC6-spezifischen „small hairpin“ (sh)RNA hemmt die Hyperforin-induzierte Aktivierung von AP-1 in T6.11-Zellen.....	32
3.3 Inhibitoren der Hyperforin-induzierten AP-1-Aktivierung bei T6.11-Zellen.....	34
3.3.1 2-APB hemmt die AP-1-Aktivierung nach der Stimulation des TRPC6-Kanals mit Hyperforin	34
3.3.2 BCTC blockiert die durch Hyperforin induzierte, TRPC6-gesteuerte, Aktivierung von AP-1	35
3.3.3 TC-1 2014 hemmt die über TRPC6-Kanäle gesteuerte Hyperforin-induzierte AP-1-Aktivierung	36
3.3.4 Die Verbindung RQ-00203078 hat keinen signifikanten Einfluß auf die Hyperforin-induzierte AP-1-Aktivität in T6.11-Zellen.....	37
3.3.5 Die Verbindung SAR 7334 hemmt die Hyperforin-induzierte AP-1-Aktivierung	38
4. Diskussion	40
4.1 Fazit	43
Publikationen	50
Danksagung	51
Lebenslauf	52

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Signaltransduktion.....	9
Abbildung 2: Topologie der TRP-Kanäle.....	10
Abbildung 3: Phylogenetischer Baum der TRP-Kanäle bei Säugetieren.....	11
Abbildung 4: Struktur des TRPC6-Kanals.....	12
Abbildung 5: Signalkaskade des TRPC6-Kanals.....	13
Abbildung 6: Agonisten von TRPC6.....	14
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Verpackungsplasmid Δ 8.91.....	19
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Expressionsplasmiden pCMV-G.....	19
Abbildung 9: Schematische Darstellung des SIN-Transfervektor.....	20
Abbildung 10: Schematische Darstellung des Kollagenase-Promotor/Luziferase Reporter gen (Coll.luc)- Provirus.....	21
Abbildung 11: Schema des AP-1-Komplexes.....	22
Abbildung 12: Schematische Darstellung des pLentiLox 3.7-shTRPC6 Plasmids.....	22
Abbildung 13: shRNA vermitteltes Gen-Silencing mit Hilfe rekombinanter Lentiviren.....	24
Abbildung 14: Hyperforin induziert die AP-1-Aktivierung in T6.11-Zellen.....	32
Abbildung 15: Die Expression einer TRPC6-spezifischen shRNA reduziert die Hyperforin-induzierte AP-1- Aktivierung in T6.11-Zellen.....	33
Abbildung 16: 2-APB hemmt die Hyperforin-induzierte AP-1 Aktivität in T6.11-Zellen.....	35
Abbildung 17: BCTC hemmt die Hyperforin induzierte AP-1-Aktivität in T6.11-Zellen.....	36
Abbildung 18: TC-1 hemmt die Hyperforin induzierte AP-1-Aktivität in T6.11-Zellen.....	37
Abbildung 19: RQ-00203078 hemmt die Hyperforin-induzierte AP-1-Aktivität in T6.11-Zellen.....	38
Abbildung 20: SAR 7334 hemmt die Hyperforin induzierte AP-1-Aktivität in T6.11-Zellen.....	39

Abkürzungen

(MgCO ₃) ₄ Mg(OH) 2x 5 H ₂ O	Magnesiumhydroxidcarbonat Pentahydrat
&	und
%	Prozent
°C	Grad Celsius
2-APB	2-Aminoethoxydiphenylborat
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatcyclase
AP-1	„activator protein 1“
APP	„Amyloid-Precursor-Protein“
ATF	aktivierender Transkriptionsfaktor
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
bZIP	basischen Leuzinzipperproteinen
bzw.	beziehungsweise
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
Ca ²⁺	Kalzium
CaCl ₂	Kalziumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Cav1.2	„Calcium channel, voltage-dependent, longlasting-type, alpha 1C subunit“
CC-Domäne	„coiled-coil“ Domäne
CCR5	C-C-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5
CD4	„cluster of differentiation 4“
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cFos	„FBJ Murine Ostersarcoma Viral Oncogene Homologue“
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cJun	„Jun Proto-Oncogene“
CMV	Zytomegalievirus

CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Coll.luc	Kollagenase-Promotor/ Luziferase-Reportergen
cPPT	„central polypurine track“
DAG	Diacylglycerol
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle's Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	„enhanced green fluorescent protein“
Elk-1	„Erythroblast Transformation Specific like 1“
env	„envelope“
ERK	„extracellular signal-regulated protein kinase“
FCS	„fetal calf serum“
g	Gramm
gag	„group-specific antigen“
Gp120	Glykoprotein 120
H ⁺	Wasserstoff
H ₂ O	Wasser
HBSS	„Hanks' Balanced Salt Solution“
HCl	Salzsäure
HEK	„human embryonic kidney,,
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immunodefizienz Virus
HTS	Hochdurchsatz-Screening-Methode
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IE-Promoter/Enhancer	„Immediate Early-Promotor/Enhancer“
IP ₃	Inositoltriphosphat
JNK	„c-Jun N-terminal kinase“
KCl	Kaliumchlorid

KH_2PO_2	Kaliumdihydrogenphosphat
KH_2PO_4	Kaliumhydrogenphosphat
l	Liter
LFW-Motiv	Leuzin-Phenylalanin-Tryptophan-Motiv
LoxP	„locus of X-over P1“
LTR	„long terminal repeat“
LTR Δ U3	U3-Region des 3' - und 5'LTR
lu	„light units“
M	Mol
MAP	„mitogen activated protein“
MAP2K	MAP-Kinase-Kinase
MAP3K	MAP-Kinase-Kinase-Kinase
MAPK	MAP-Kinase
MgSO_4	Magnesiumsulphat
ml	Milligramm
mm	Millimeter
mM	Millimol
mRNA	„messenger ribonucleic acid“
N-Terminus	Amino-Terminus
n.s	nicht signifikant
Na^+	Natrium
Na_2HPO_2	Natriumphosphinat
Na_2HPO_4	di-Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NFAT	„nuclear factor of activated T-cells“
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomol
OAG	1-Oleoyl-2-Acetyl-sn-Glycerol
pA	Polyadenylierungssignal

PBS	„phosphate buffered saline“
pH	potentia hydrogenii
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C β
pLL 3.7	pLentiLox 3.7
Pol	„polymerase“
Ras	„Proto-Onkogen rat sarcoma“
RISC	„RNAi-induced silencing complex“
rlu	relative Luziferaseaktivität
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
rpm	„revolutions per minute“
RQ	RQ 00203078
s.	siehe
S2	Sicherheitsstufe 2
SAR	SAR 7334
shRNA	„small hairpin“ Ribonukleinsäure
SIN	„self inactivating“
siRNA	„small interfering RNA“
SNCG	γ -Synaptophysin
SV40	Simian-Virus 40
T-Typ	„transient“-Typ
T6.11	TRPC6 exprimierende Zellen
TC-1	TC-1 2014
TPA	12-O-Tetradecadoylphorbol-13-Acetat
TRE	12-O-Tetradecadoylphorbol-13-Acetat- „responsive element“
TRP	„transient receptor potential“
TRPA	„transient receptor potential ankyrin“
TRPC	„transient receptor potential canonical“

TRPM	„transient receptor potential melastatin“
TRPML	„transient receptor potential mucolipins“
TRPP	„transient receptor potential polycystin,“
TRPV	„transient receptor potential vallinoid“
U	„Unit“
u.a.	unter anderem
VSV	„Vesicular Stomatitis Virus“
VSV-G	„Vesicular Stomatitis Virus-Glykoprotein“
w/v	Verhältnis von Gewicht zu Volumen
WPRE	„woodchuck Hepatitis virus posttranscriptional regulatory element“
WRE	„woodchuck hepatitis B virus RNA regulatory element“
Δ U3	U3-Region-Deletion
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar

Zusammenfassung

Der „transient receptor potential canonical“-6-Kanal (TRPC6) ist ein nichtselektiver Kalzium-Ionen Kanal, der in menschlichen Zellen zu finden ist. Wird der Kanal aktiviert, induziert er eine Signalkaskade, die über die „mitogen-activated-protein“-Kinase-Aktivierung die Bildung des „activator-protein“-1 (AP-1) Komplexes induziert. AP-1 besteht aus zwei Leucinezipper-Proteinen. Ein bekannter Agonist des TRPC-6-Kanals ist Hyperforin. In vergangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Hyperforin die AP-1-Aktivität in TRPC6-exprimierenden Zellen steigern konnte. In dieser Arbeit konnte ich mit Hilfe von lentiviraler Genmanipulation die Expression des TRPC-6-Kanals durch „small hairpin“-Ribonukleinsäure reduzieren, wodurch eine Steigerung der AP-1-Aktivität mit Hyperforin signifikant geringer ausfiel. Der TRPC-6-Kanal ist daher essentiell für die Hyperforin-induzierte Aktivierung von AP-1.

Eine gesteigerte Expression des TRPC-6-Kanals wurde mit einigen Pathologien des Menschen in Zusammenhang gebracht. Ein pharmakologischer Therapieansatz besteht darin Antagonisten des TRPC-6-Kanals zur Behandlung dieser Erkrankungen zu nutzen. Die Substanzen 2-Aminoethoxydiphenylborat, BCTC, SAR 7334 und TC-1 2014 konnten die Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade nach Stimulation des TRPC6-Kanals mit Hyperforin hemmen. Die Verbindung RQ 00203078, die als TRPM8-Inhibitor beschrieben wurde, hatte hingegen keinen Einfluss auf die TRPC6-induzierte Signaltransduktion.

Summary - Pharmacological and genetic Inhibition of TRPC6-induced gene transcription

Transient receptor potential canonical 6 (TRPC6) is a non-selective calcium-ion channel. The activated channel induces an intracellular signaling cascade that stimulates the transcription factor AP-1 using extracellular signal-regulated protein kinase as a signal transducer. AP-1 is a dimer composed of leucine zipper proteins. Hyperforin is an agonist of TRPC6 channels, which induces the activation of AP-1. Here, the expression of TRPC6 channels was reduced by expressing small hairpin RNAs specific for TRPC6 using lentiviral gene transfer. As a result, activation of AP-1 in hyperforin-stimulated cells was significantly reduced, indicating that hyperforin activates AP-1 via TRPC6 channels.

An increased expression of TRPC6 channels has been connected to some human pathologies. A pharmacological approach for treatment for those diseases is the usage of TRPC6-antagonists. In this study, the compounds 2-aminoethoxydiphenylborate, BCTC, SAR 7334, RQ 00203078 and TC-1 2014 were tested upon their ability to block the TRPC6-induced signaling cascade. The results show that 2-aminoethoxydiphenylborate, BCTC, SAR 7334, and TC-1 2014 were able to inhibit the TRPC6-induced signaling cascade. The compound RQ 00203078, described as an inhibitor of TRPM8 channels, was not able to inhibit TRPC6 induced signaling.

1. Einleitung

Der Mensch gehört zu einem der komplexesten Vielzellern auf unserem Planeten. Was Vielzeller von Einzellern unterscheidet, ist die zum Teil extreme Spezialisierung unterschiedlicher Zelltypen auf bestimmte Aufgaben. Für das reibungslose Zusammenarbeiten der unterschiedlichen Zell- und Gewebetypen spielt die Kommunikation untereinander eine essenzielle Rolle. Ein wichtiger Prozess ist hierbei die Signaltransduktion, also die Übertragung von Signalen vom Extrazellularraum ins Zellinnere hinein und damit die Kommunikation zwischen verschiedenen Zellen. Extrazelluläre Signalmoleküle wie Hormone, Neurotransmitter oder andere Proteine und Peptide werden von Zellen synthetisiert und sezerniert und binden danach an spezifische Rezeptoren. Durch die Rezeptoraktivierung werden „second messengers“ im Zellinneren gebildet, die anschließend eine Signal-Kaskade in Gang setzen, die dazu in der Lage sein kann, in die Genregulation einzugreifen. Die Rezeptoren können anhand ihrer Struktur und Signalkaskade in unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden (Abb.1): Die G-gekoppelten-Rezeptoren besitzen sieben Transmembrandomänen und beeinflussen über die aktivierte $G\alpha$ -Untereinheit, je nach Rezeptortyp, die Adenylatcyclase oder die Phospholipase $C\beta$. Die Adenylatcyclase bildet wiederum cAMP, die Phospholipase $C\beta$ dagegen IP_3 . Die Rezeptortyrosinkinase wird nach Ligandenbindung über Autophosphorylierung aktiviert. Anschließend wird der MAP-Kinase-Weg, eine mehrstufige Signaltransduktion, in Gang gesetzt. Ca^{2+} -Ionen-Kanäle werden Liganden- oder spannungsgesteuert aktiviert und bilden eine Ca^{2+} -permeable Pore, sodass Ca^{2+} in die Zelle transportiert wird. Zu den „second messengers“ der beschriebenen Signaltransduktionen gehören cAMP, cGMP, IP_3 , Diacylglycerol (DAG), Stickstoffmonoxid und Ca^{2+} -Ionen. Ca^{2+} -Ionen haben für viele zelluläre Prozesse Relevanz, so beispielsweise für die Muskelkontraktion, Ionen transport, Nervenleitung und Genexpression [18]. Zu den nicht selektiven, Ca^{2+} -permeablen Kanälen, gehören die „transient receptor potential“ (TRP)-Kanäle. Auch hier kann der intrazelluläre Ca^{2+} -Einstrom die Genexpression der Zelle beeinflussen.

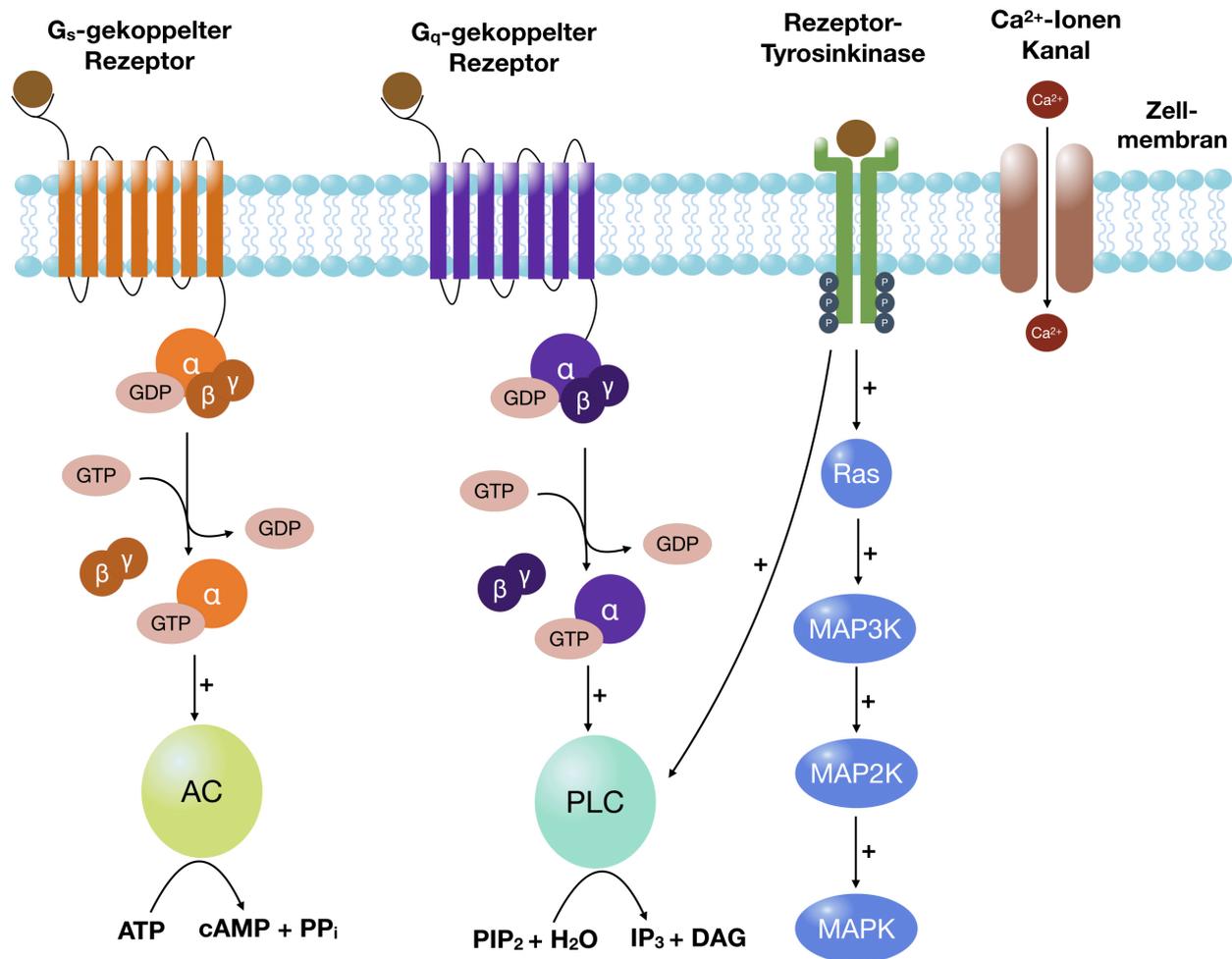


Abbildung 1: Signaltransduktion

G-gekoppelte Rezeptoren besitzen sieben Transmembrandomänen. Der N-Terminus mit der Ligandenbindungsstelle liegt extrazellulär, der C-Terminus mit G-Protein intrazellulär. Bei Aktivierung des Rezeptors durch einen Liganden, wird das, an die G α -Untereinheit gebundene GDP durch GTP ausgetauscht. Die G α -Untereinheit und die β/γ -Untereinheit lösen sich anschließend vom Rezeptor. Im Falle des G_s-gekoppelten Rezeptors aktiviert die G α -Untereinheit die Adenylatcyclase (AC), welche cAMP aus ATP bildet. Die G α -Untereinheit des G_q-Rezeptors hingegen aktiviert die Phospholipase C β (PLC), die die Hydrolyse von Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) aus Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP₂) katalysiert. Die β/γ -Untereinheiten sind auch in der Lage die PLC zu aktivieren [18]. Rezeptor-Tyrosinkinasen verfügen über eine extrazelluläre Ligandenbindungsstelle und eine intrazelluläre Kinasedomäne. Nach der Bindung eines Liganden an die Rezeptor-Tyrosinkinase werden die intrazellulären Tyrosinreste autophosphoryliert. Der aktivierte Rezeptor aktiviert das G-Protein Ras, welches wiederum die MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAP3K) aktiviert. Die MAP3K phosphoryliert die MAP-Kinase-Kinase (MAP2K), welche wiederum die MAP-Kinase (MAPK) phosphoryliert. Die so aktivierte MAPK kann anschließend im Zellkern u.a. Prozesse der Zellproliferation beeinflussen. Der aktivierte Rezeptor kann darüber hinaus auch PLC aktivieren [18].

Ca²⁺-Ionen-Kanäle bilden eine Pore, die für Ca²⁺-Kanäle durchlässig ist und transportieren so Ca²⁺-Ionen in die Zelle. Die Kanäle können u.a. Liganden- oder spannungsgesteuert geöffnet werden und eine Selektivität für bestimmte Ionen besitzen. cAMP, IP₃, DAG und Ca²⁺-Ionen gehören zu den „second messengers“ [18].

1.1 TRP-Kanäle

Eine Familie zellulärer Kationenkanäle stellen die „transient receptor potential“ (TRP)-Kanäle dar. Die Kanäle bestehen aus sechs Transmembran Domänen, die zusammen Kation-permeable Poren bilden und sich zu Tetrameren zusammenfinden [13] (Abb. 2).

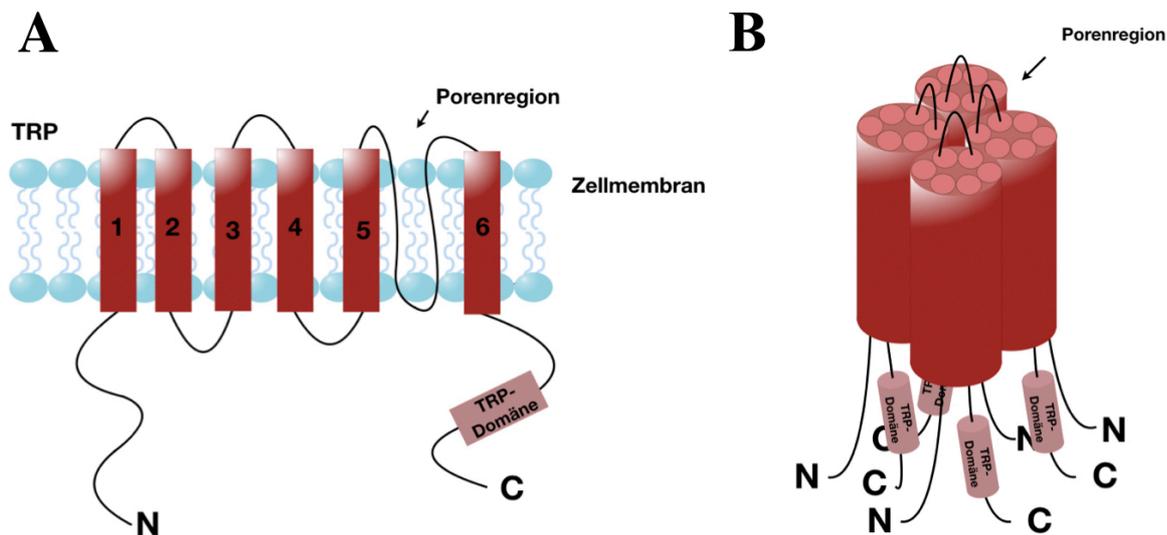


Abbildung 2: Topologie der TRP-Kanäle

A Transmembran-Topologie der TRP-Kanäle. TRP-Kanäle bestehen aus sechs Transmembran-Domänen. Die fünfte und sechste Domäne bildet die kation-permeable Pore. Der N- und C-Terminus befinden sich beide intrazellulär.

B Quartäre Struktur der TRP-Kanäle. Die TRP Proteine lagern sich zusammen und formen Tetramere. Abbildung entnommen und modifiziert von Takahashi et al. [47].

Es gehören 28 Kationenkanäle zu den TRP-Kanälen der Säugetiere, die einer der sechs Subfamilien angehören. Zu diesen gehören TRPC („canonical“), TRPM („melastatin“), TRPV („vanilloid“), TRPA („ankyrin“), TRPML („mucolipins“), und TRPP („polycystin“) [47] (Abb. 3). Die Subfamilien können in weitere Subgruppen eingeteilt werden, wie beispielsweise innerhalb der TRPC-Subfamilie die drei Subgruppen TRPC1/4/5, TRPC2, and TRPC3/6/7 unterschieden werden [13].

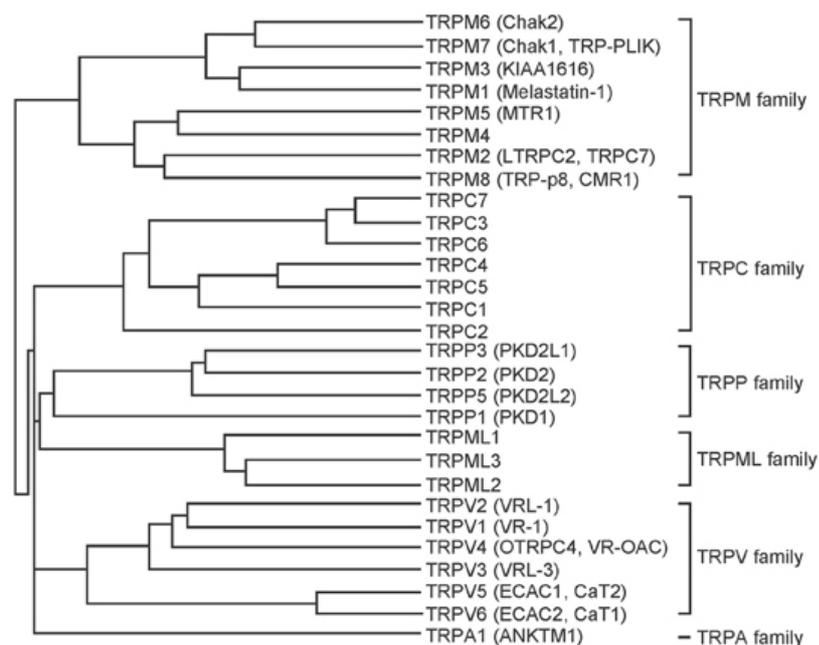


Abbildung 3: Phylogenetischer Baum der TRP-Kanäle bei Säugetieren

Basierend auf den Homologien der individuellen TRP-Kanäle. Abbildung entnommen und modifiziert aus Takahashi et al.[47].

Die unterschiedlichen TRP-Kanäle sind in zahlreichen unterschiedlichen Gewebetypen zu finden und sind in einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen involviert [13].

1.1.1 TRPC6-Kanal

Der TRPC6-Kanal gehört zur TRPC-Subfamilie. Der TRPC6-Kanal wird vor allem in der Lunge, dem Herz, dem Gehirn, der Plazenta, den Nebennieren, dem endothelialen Gewebe, der Retina, dem Hoden und in der Niere exprimiert. Dabei wurden Korrelationen zwischen der TRPC6-Expression und vielen Erkrankungen festgestellt. So spielen beispielsweise Mutationen des TRPC6-Gens für die Entwicklung und den Verlauf der fokalen segmentalen Glomerulosklerose eine Rolle und wurden mit der Proliferation und Migration von klarzelligen Nierenzellkarzinomen in Zusammenhang gebracht [6,13]. Außerdem spielt TRPC6 in der Regulation der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion eine wichtige Rolle [59]. Eine übermäßige TRPC6-Expression könnte sich jedoch auch positiv auf den Therapieverlauf von Erkrankungen auswirken, so wurde die Hemmung der β -Amyloid-Produktion durch TRPC6 als potenzieller Therapieansatz bei der Behandlung von Alzheimer beschrieben [57].

1.1.1.1 Aufbau des TRPC6-Kanals

Der Aufbau des TRPC6-Kanals ähnelt der Grundstruktur der TRP-Kanäle: TRPC6 ist ein nicht-selektiver Ca^{2+} - und Na^{+} -Ionen Kanal und besitzt eine Tetramerstruktur, die jeweils aus sechs α -Helices besteht [6,

11,13]. Zwischen der fünften und sechsten α -Helix des TRPC6-Kanals befindet sich die porenbildende Domäne (Abb. 4). Für die korrekte Positionierung der Porenschleife ist eine Aminosäuresequenz, bestehend aus Leuzin, Phenylalanin und Tryptophan (LFW-Motiv) verantwortlich. Wird die Sequenz verändert, beispielsweise durch Substitution mit einer Alanin-Alanin-Alanin-Sequenz, wird die Aktivität der funktionellen Untereinheiten des Kanals reduziert [6]. TRPC6 besitzt an der ersten und zweiten extrazellulären Schleife jeweils eine Glykosylierungsstelle [11]. Die dritte Transmembran-Domäne von TRPC6 ist im Verhältnis zu den anderen TRPC-Kanälen relativ lang und kann als Sensor für externe Reize dienen. Die intrazellulären Anteile des Kanals bilden die Form einer umgekehrten Glocke, bei der die Spitze unterhalb der Pore der Transmembrandomänen positioniert ist [13].

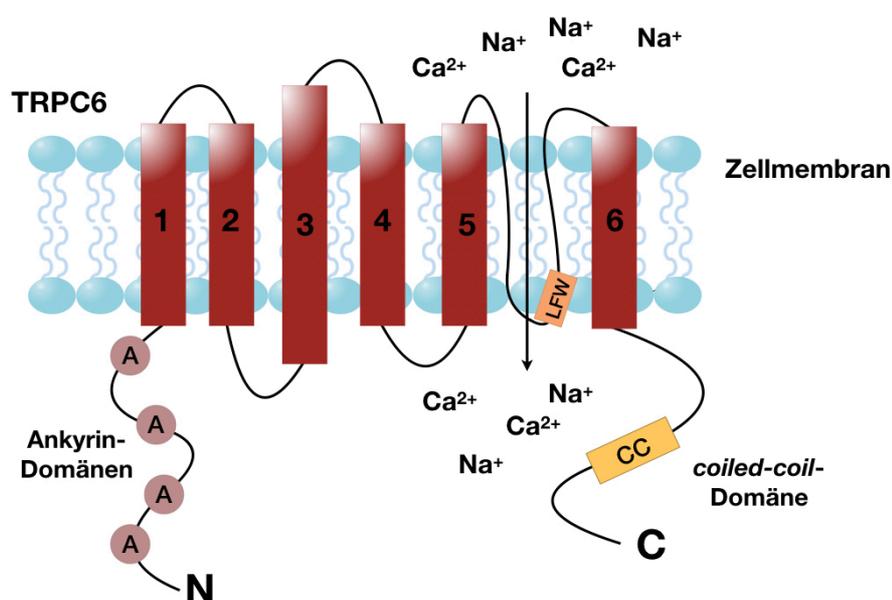


Abbildung 4: Struktur des TRPC6-Kanals

Der Kanal besteht aus sechs Transmembrandomänen. Der N- und C-Terminus ist im Intrazellularraum lokalisiert. Nahe des N-Terminus befinden sich vier Ankyrin-Domänen (A). Der C-Terminus besitzt eine „coiled-coil (CC)“ Domäne [11,13]. Die korrekte Positionierung der Porenschleife wird vom LFW-Motiv gesteuert [6]. Der Ca^{2+} -Einstrom ist zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne möglich. Entnommen und modifiziert aus Scheuble et al. [39].

1.1.1.2 Die TRPC6-induzierte Signalkaskade

Der aktivierte TRPC6-Kanal bewirkt einen Ca^{2+} -Einstrom über den Kanal selbst und über andere Ca^{2+} -Kanäle in der Zellmembran, die durch den TRPC6-induzierten Na^{+} -Einstrom aktiviert werden [11]. Die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle führt zur Aktivierung der „mitogen activated protein“ (MAP) Kinase „extracellular signal-regulated protein kinase“ 1 und 2 (ERK 1 und 2), die im Zellkern verschiedene Transkriptionsfaktoren, u. a. den Transkriptionsfaktor „activator protein 1“ (AP-1) aktiviert [52] (Abb. 5). Anschließend kann AP-1 beispielsweise die Transkription von γ -Synaptophysin (SNCG), das mit Tumorinvasion und -metastasierung zahlreicher Tumore in Verbindung gebracht wurde, steigern [63].

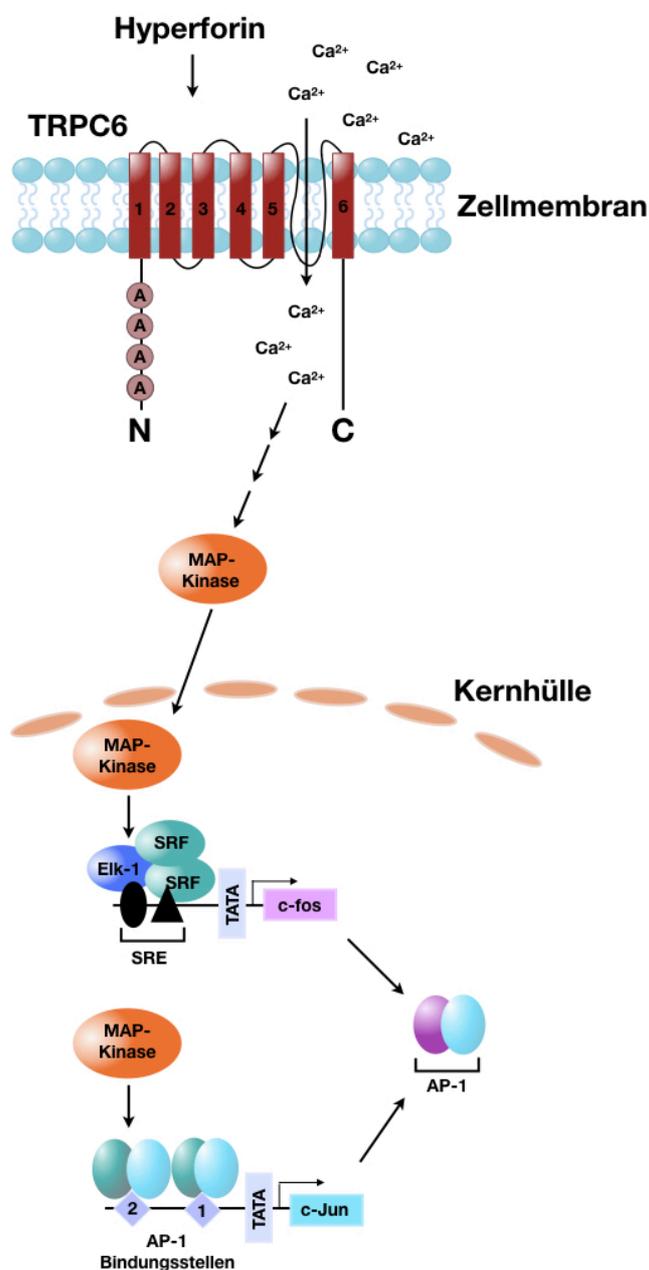


Abbildung 5: Signalkaskade des TRPC6-Kanals

Der aktivierte TRPC6-Kanal induziert einen Ca²⁺-Einstrom. Die Steigerung des intrazellulären Ca²⁺-Konzentration führt zu einer MAP-Kinase-Aktivierung. Die MAP-Kinase aktiviert im Zellkern die c-Jun und c-Fos Genexpression. Diese Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren, die schlussendlich den AP-1 Komplex formen. Der Transkriptionsfaktor Elk-1 ist relevant für die TRPC6-induzierte AP-1-Aktivierung. Entnommen und modifiziert nach Thiel & Rössler [52].

1.1.1.3 Agonisten von TRPC6:

Der TRPC6-Kanal wird direkt durch Diacylglycerol aktiviert [11]. Das Diacylglycerol-Analogon, 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) (Abb. 6A), kann die Zellmembran penetrieren und konnte die TRPC6-Aktivität in unterschiedlichen Experimenten steigern [12,20,26,52]. In den Experimenten von Thiel & Rössler [52] wurde der Effekt von OAG auf die TRPC6-induzierte Genexpression demonstriert. Ein weiterer TRPC6-Agonist ist das Hyperforin (Abb. 6B). Diese Substanz ist ein bizyklisches polyprenyliertes Acylphloroglucinol-Derivat und Hauptwirkstoff der Arzneipflanze Johanniskraut (lat.

Hypericum perforatum), der zur leitliniengerechten („Kann“-Empfehlung) Therapie der mittelgradigen Depression eingesetzt wird [10]. Leuner et al. [26] zeigten, dass Hyperforin über die Aktivierung des TRPC6-Kanals einen Ca^{2+} - und Na^{+} -Einstrom induzierte. In den Folgejahren wurde Hyperforin von einigen Forschungsgruppen als TRPC6-Aktivator genutzt [14,19,38,45,52,54]. Sell et al. [40] schlussfolgerte jedoch, dass Hyperforin als Protonophor und nicht als TRPC6-Ligand agiere. Dem widersprechen jedoch Experimente mit HEK293-Zellen, die TRPC6 nicht exprimierten [14,26,52]. Die Arbeit von Thiel & Rössler [52] lieferte damit auch Hinweise auf eine essenzielle Rolle von TRPC6 für die AP-1-Aktivierung.

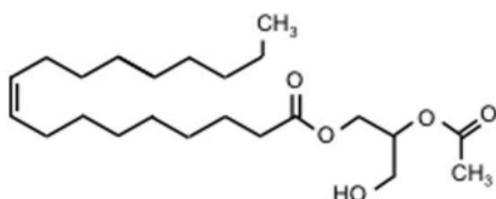
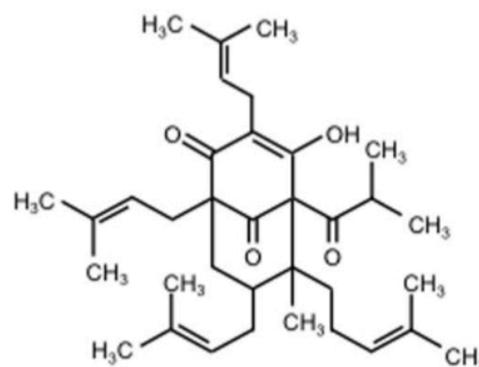
A**OAG****B****Hyperforin**

Abbildung 6: Agonisten von TRPC6

A Strukturformel von 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG). **B** Strukturformel von Hyperforin. Entnommen aus Thiel & Rössler [52].

Es konnte bereits gezeigt werden, dass TRPC6 mit dem Progress von Erkrankungen, wie beispielsweise der fokalen segmentalen Glomerulosklerose und dem Diabetes mellitus Typ 1 in Verbindung gebracht wurde. Für die pharmakologische Therapie und die Grundlagenforschung wäre also die Identifizierung und Charakterisierung von TRPC6-Antagonisten sinnvoll.

1.2 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit hatte zwei Ziele:

1. Analyse der Relevanz des TRPC6-Kanals für die Hyperforin-induzierte AP-1 Aktivierung

Verschiedene Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass Hyperforin als Ligand für TRPC6 wirken kann. Diese These wurde in Frage gestellt und stattdessen postuliert, dass Hyperforin TRPC6-unabhängig als Protonophor wirkt. Die Aktivität von Hyperforin als TRPC6-Ligand sollte hier mit genetischen Werkzeugen verifiziert werden.

2. Untersuchung postulierter TRPC6-Inhibitoren auf ihre Wirksamkeit bezüglich der TRPC6-induzierten Signaltransduktion

Eine erhöhte TRPC6-Aktivität verschlechtert den Verlauf von einigen Pathologien. Ein spezifischer TRPC6-Antagonist ist daher nützlich für Therapieansätze und für weitere Forschung. In der Vergangenheit wurden bereits einige Substanzen mit Hilfe von elektrophysiologischen Untersuchungen wie der Patch-Clamp-Methode oder mit Ca^{2+} -Imaging-Methoden als TRPC6-Antagonisten getestet. Eine andere Methode ist die Messung der TRPC6-induzierten Signalkaskade über die Bestimmung der AP-1-Aktivität. Zugrunde liegt die Annahme, dass über eine TRPC6-Aktivierung eine Signalkaskade induziert wird, die schlussendlich die Genexpression beeinflussen kann. Die Messung der AP-1-Aktivität wurde hier für die Messung von Veränderungen der TRPC6-abhängigen Genexpression genutzt.

2. Material und Methodik

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

2-Aminoethoxydiphenylborinat (2-APB)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany (#sc-201487)
3[7-(trifluoromethyl)-5-[2-(trifluoromethyl)phenyl]-1-H-benzimidazol-2-yl]-1-oxa-2-azaspiro [4.5]dec-2-ene (TC-1 2014)	Alomone's laboratories, Jerusalem, Israel
4-[(1R,2R)-2-[(3R)-3-Amino-1-Piperidinyl]-2,3-Dihydro-1H-inden-1-yl]oxy]-3-Chlorobenzonitril-Dihydrochlorid (SAR 7334)	Tocris, Wiesbaden-Nordenstadt, Germany (#5831)
4-[[3-Chloro-5-(Triuoromethyl)Pyridin-2-yl]-[[4-(Triuoromethoxy) phenyl] methyl] sulfamoyl] Benzoessäure (RQ 00203078)	Alomone's laboratories, Jerusalem, Israel
5x Reporter Lysis Buffer	Promega, Mannheim
BCA Protein Kit	Pierce, Rockford, USA
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
Chloroquin	Sigma-Aldrich, München
di-Natriumphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
DMEM	PAA, Marburg
DMSO	Roth, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol	zentrales Chemikalienlager der UdS
FCS	Biochrom AG, Berlin
Glutamin	PAA, Marburg
HCl	Roth, Karlsruhe
HEPES buffered saline solution (HBSS)	Gibco, Invitrogen, CA, USA (#14025)
Hyperforin	Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Luminol	Roth, Karlsruhe
Luziferin	Sigma-Aldrich, München

N-(4-Tert-butylphenyl)-4-(3-chloropyridin-2-yl)-piperazine-1-carboxamide (BCTC)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany (# sc-205599)
Penicillin/Streptomycin	PAA, Marburg
Hexadimethrinbrimid (Polybrene)	Sigma-Aldrich, München
Reporterlyspuffer (5x)	Gibco

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
96-Loch-Platte, transparent	Greiner bio-one, Frickenhausen
96-Loch-Platte, weiß	Nunc, Roskilde, Dänemark
Einmal-Sprizen Injekt (20 ml)	Braun Melsungen AG, Melsungen
Küvetten (1,5 ml Halbmikro)	Brand, Wertheim
Labor-Zentrifugen-Röhrchen 15 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Labor-Zentrifugen-Röhrchen 50 ml	Sarstedt, Nürnbrecht
Sterilfilter (0,22µm bzw. 0,45 µm)	Sarstedt, Nürnbrecht
Zellkulturflaschen (75 cm ² bzw. 175 cm ²)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturschalen (35x15 mm bzw. 60x15mm)	Sarstedt, Nürnbrecht

2.1.3 Geräte

Analysewaage	Sartorius, Göttingen
Auflichtmikroskop	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Autoklav	Schütt, Göttingen
Brutschrank	Thermo Fisher Scientific Inc., Berlin
Eismaschine	diverse 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, Weilheim

Photometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten (20 µl, 200 µl bzw. 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg Gilson, Middleton USA
Pipetus®Akku	Hirschmann Laborgeräte, Heilbronn
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge (Biofuge®pico)	Heraeus, Hanau
Vortex-Mixer	IKA Labortechnik, Staufen
Wasserbäder, temperierbar	diverse Hersteller

2.1.4 Zelllinien

HEK293/TN

Eine menschliche embryonale Nierenzelllinie, die auf die Herstellung von Viren in großen Mengen spezialisiert ist und die für die Experimente im Rahmen dieser Arbeit zur Herstellung von Lentiviren verwendet wurde.

Diese wurden freundlicherweise von Markus Hoth (Universität des Saarlandes, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

T6.11-Zellen

Eine HEK293-Zelllinie, die TRPC6 exprimiert [3,5,34,52]. Diese wurde freundlicherweise von Alexandre Bouron (UMR CNRS Grenoble, France) mit Erlaubnis von Guylain Boulay (Université de Sherbrooke, Quebec, Canada) zur Verfügung gestellt.

2.1.5 Vektoren und Plasmide

Die Genmanipulation der Zielzellen in diesen Experimenten fand über rekombinante Lentiviren statt. Bei den Viren handelte es sich um veränderte „Human Immunodeficiency Viruses“ (HIV). Da HIV als Lentivirus zur Familie der Retroviren gehört, ist es imstande, teilungsfähige als auch post-mitotische Zellen zu infizieren und eignet sich daher gut als Vektor. Für die Produktion von rekombinanten Lentiviren werden die Gene gag, pol und rev benötigt, die bereits im HIV-Wildtyp Genom enthalten sind. Pol („polymerase“) kodiert u.a. für die reverse Transkriptase und Integrase und gag („group-specific antigen“) für den inneren Proteinmantel. Das rev-Gen dient der Expression des gleichnamigen Proteins, was den Export ungespleißter RNA aus dem Nukleus ins Zytoplasma unterstützt. Das Hüllprotein Glykoprotein 120 (Gp120) des HIV-Wildtyps ist durch seine enge Wirtsspezifität für die Produktion von rekombinanten Lentiviren ungeeignet. Das für Gp120 kodierende Gen env („envelope“) wurde deshalb durch einen „Vesicular Stomatitis Virus-Glykoprotein“(VSV-G) ersetzt. Das Verpackungssignals Ψ dient der Erkennung der korrekten RNA-Sequenz

für die neu produzierten Viren und wird daher auch für die Produktion von rekombinanten Lentiviren benötigt.

Die als relevant genannten Gen-Komponenten sind Bestandteil von drei Plasmiden, die zur Transfektion von HEK293/TN-Zellen und damit zur anschließenden Virusproduktion genutzt wurden [50].

2.1.6 Verpackungsplasmid Δ 8.91

Das Verpackungsplasmid Δ 8.91 enthält die Gene *gag*, *pol* und *rev*. Das 5'-Ende des Plasmids besitzt einen CMV-Promotor und das 3'-Ende ein Polyadenylierungssignal (SV40 pA) (Abb. 7).

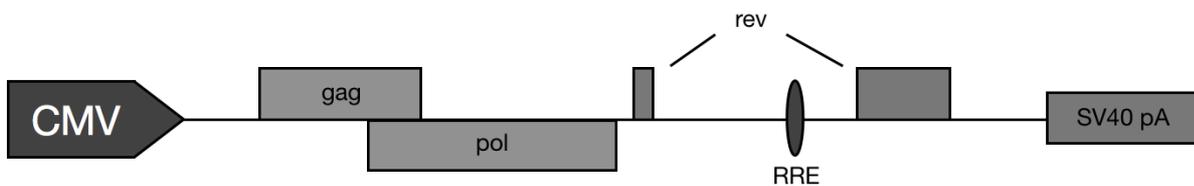


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Verpackungsplasmid Δ 8.91.

Der Vektor des Δ 8.91 kodiert für die viralen Proteine *gag*, *pol* und *rev*. Kontrolliert werden diese kodierenden Abschnitte vom Immediate Early (IE)-Promotor/Enhancer des Cytomegalo-Virus (CMV). Den Abschluss des Plasmids bildet das Polyadenylierungssignal des Simian-Virus 40 (SV40 pA) [50].

2.1.7 Expressionsplasmid pCMV-G

Das Hüllprotein Gp120 des HIV hat einen engen Tropismus, da es nur mit dem CD4-Rezeptor und dem Co-Rezeptor CCR5 interagiert und daher bloß eine Infektion von T-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen möglich ist. Um die Wirtsspezifität zu erweitern, wurde der Virus mit dem Expressionsplasmid pCMV-G pseudotypisiert. Das Hüllprotein stammt vom „Vesicular Stomatitis Virus“ (VSV). Das Plasmid besitzt einen CMV-Promotor (Abb. 8).

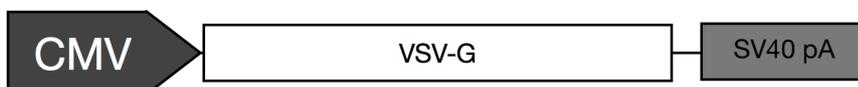


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Expressionsplasmids pCMV-G.

Unter der Kontrolle des „immediate early“-CMV Promotor kodiert der Vektor des pCMV-G-Plasmids für das VSV-Glykoprotein. Das Plasmid verfügt über das Polyadenylierungssignal SV40 pA [50].

2.1.8 SIN-Transfektor

Der SIN-Transfektor enthält die komplementäre DNA (cDNA), die später in das Genom der Zielzelle integriert wird. Das Verpackungssignal Ψ dient der Zusammenführung von Virus-Genom und Proteinmantel. Der Transfektor enthält zwei Promotoren. Zum einen am 5'-long terminal repeat (LTR) den CMV-Promotor, der die Produktion der RNA-Transkripte steigert. Zum anderen einen internen Promotor, der die Expression der cDNA steuert. In den folgenden Experimenten wurde als interner Promotor der Kollagenase-Promotor verwendet (s. Abschnitt 2.1.9). Das 3'LTR besitzt eine U3-Region-Deletion ($\Delta U3$). Diese befindet sich nach der reversen Transkription am 5'-Ende, wodurch das 5'LTR transkriptionell inaktiviert wird. So wird nur noch die gewünschte cDNA-Sequenz in den Zielzellen exprimiert. Außerdem enthält der Transfektor das „woodchuck Hepatitis virus posttranscriptional regulatory element“ (WPRE), das die Expression der cDNA erhöht und dadurch die Luziferase-Aktivität steigert [64]. Das HIV „flap element“ erhöht die Gängigkeit der Virus-cDNA in den Zellkern der Zielzellen [43]. Der SIN-Transfektor ist die Basis für die verwendeten Reporter- und Expressionsplasmide [28] (Abb. 9).

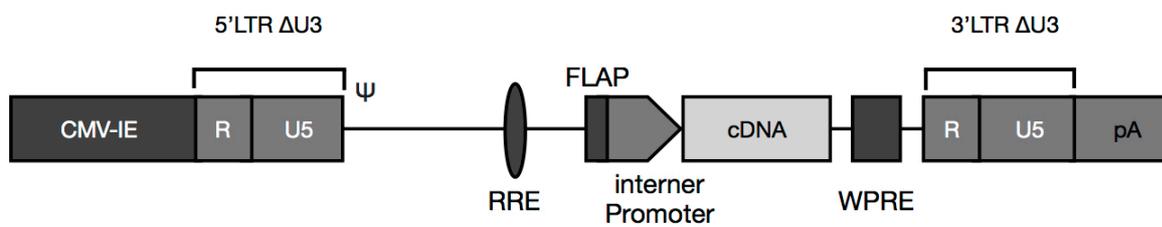


Abbildung 9: Schematische Darstellung des SIN-Transfektors.

Der SIN-Transfektor enthält den CMV-Promotor, einen internen Promotor, das LTR mit der Deletion $\Delta U3$, WPRE, das 3'-Polyadenylierungssignal und das Verpackungssignal Ψ [50].

2.1.9 Lentivirale Reporterplasmide

Der lentivirale Transfektor pFW-Coll.luc (Abb. 10) kodiert für das Luziferasegen, das vom Kollagenase-Promotor kontrolliert wird. Die proximale Promotorregion besitzt ein „12-O-Tetradecadoylphorbol-13-acetate (TPA)-responsive element“ (TRE), das als AP-1-Bindungsstelle dient [1]. Mit Hilfe des Luziferase-Assays kann die Genexpression der Luziferase erfasst werden (s. Abschnitt 2.2.6). Die AP-1 induzierte Regulation der Transkription wird dadurch messbar [46,49,51,52].

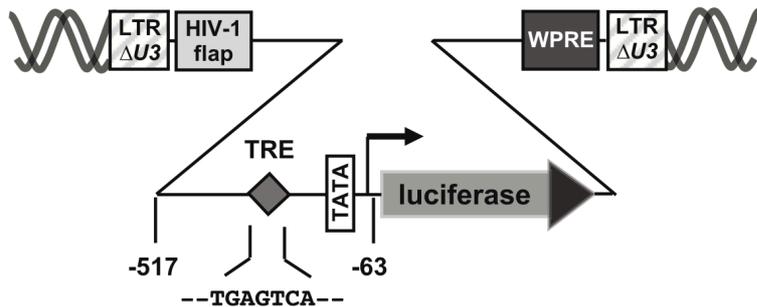
Coll.luc

Abbildung 10: Schematische Darstellung des Kollagenase-Promotor/Luziferase Reportergen (Coll.luc)-Provirus.

Der Kollagenase-Promotor von Coll.luc erstreckt sich von Position -517 bis -63 und besitzt als Bindungsstelle für AP-1 ein TRE. Dem Promotor folgt das Luziferasegen, welches für das gleichnamige Enzym kodiert. Die Luziferaseaktivität wird beim Reportergenassay gemessen und dient der Ermittlung der AP-1-Aktivität. Stromabwärts befindet sich die mutierte U3-Region des 3'- und 5'LTR (LTR Δ U3), das HIV-flap Element sowie das WPRE.

Der Transkriptionsfaktor AP-1:

AP-1 ist ein Transkriptionsfaktor und spielt eine wichtige Rolle als Regulator der Apoptose, der Wachstumskontrolle, der zellulären Transformation, Proliferation und der Differenzierung [22,25,29,41]. AP-1 wird durch die Dimerisierung zweier Proteine aus den Familien der Jun-, Fos- und ATF-Transkriptionsfaktoren gebildet (Abb. 11). Diese Transkriptionsfaktoren gehören zu den basischen Leuzinzipperproteinen (bZIP) [29]. Abhängig von der Zusammensetzung des Dimers besteht eine variable DNA-Affinität: Das c-Fos-Homodimer hat im Vergleich zu c-Jun-Homodimeren keine Affinität zu DNA [17]. Der Jun:Fos Heterodimer besitzt die höchste DNA-Affinität [17] und bindet an das 12-O-Tetradecadylphorbol-13-acetat (TPA)-responsive Element (TRE) [46]. Die Proteinkinasen „extracellular-regulated kinase“ (ERK), „c-Jun N-terminal kinase“ (JNK) und p38 aktivieren AP-1 [60].

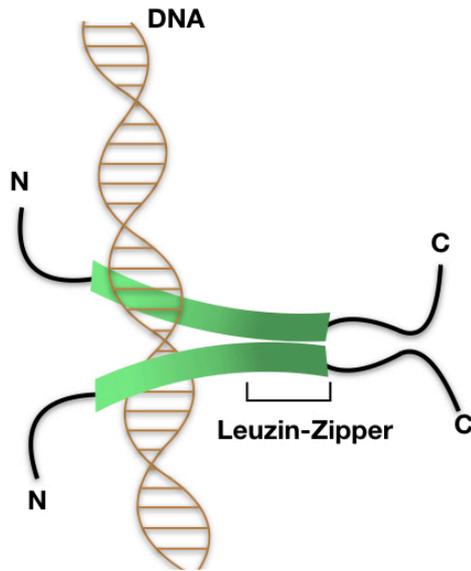


Abbildung 11: Schema des AP-1-Komplexes

AP-1 besteht aus zwei dimerisierten basischen Leuzinzipper (bZIP)-Proteinen. Die beiden C-Terminale lagern sich mit ihren hydrophoben Anteilen aneinander an. Die hydrophilen Anteile der C-Terminale interagieren mit den umliegenden Wassermolekülen. Die beiden N-Terminale binden über Lysin und Arginin an die DNA. Die Leuzinzipper formen eine „coiled-coil“-Struktur [23].
Entnommen und modifiziert nach Krylov & Vinson [23].

2.1.10 Lentivirale Expressionsplasmide

pLentiLox 3.7 (pLL 3.7) ist ein lentiviraler Transfervektor, der den U6-Promotor zur Expression einer shRNA besitzt [37]. Das Plasmid besitzt außerdem eine Transkriptionseinheit, die für das „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP) kodiert und damit bei erfolgreicher Infektion die Zielzellen grün färbt.

pLL3.7-shTRPC6 (Abb.12) besitzt die Grundstruktur von pLL 3.7 und kodiert für eine „short hairpin“ (sh)-RNA gegen TRPC6-mRNA [15,44].

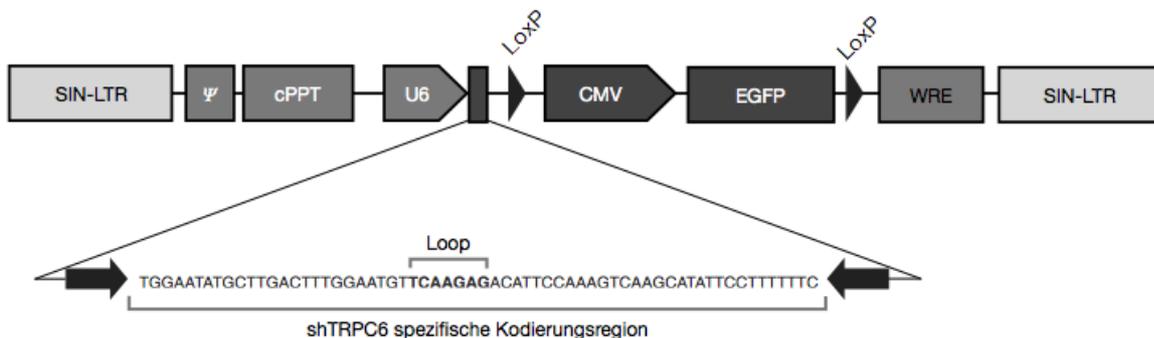


Abbildung 12: Schematische Darstellung des pLentiLox 3.7-shTRPC6 Plasmids.

Der pLL 3.7-shTRPC6 Plasmid besitzt eine „central polypurine track“ (cPPT)-Sequenz, die als Primer fungiert. Ihr folgt der murine Promotor U6. Die LoxP-Stellen sind Teil eines Rekombinationssystems, das für Knockout-Experimente genutzt werden kann. Sie umschließen beim pLL3.7 die CMV- Region und die EGFP-kodierende Transkriptionseinheit. Stromabwärts der letzten LoxP-Stelle schließt sich zur Steigerung der Transkription das „woodchuck hepatitis B virus RNA regulatory element“ (WRE) an. Im Gegensatz zu pLL 3.7 wurde bei pLL 3.7-shTRPC6 in der Loop-Region zwischen U6 und der ersten LoxP-Stelle eine shTRPC6 spezifische Gensequenz inseriert. Die benannten Regionen werden am 3’-und 5’-Terminus von LTRs umschlossen, die aber durch die SIN-Konfiguration inaktiviert sind (modifiziert nach Rubinson et al. [37], TRPC6-mRNA-Sequenz nach Graham et al. [15]).

Für die Experimente dieser Arbeit wurde die Kodierinformation für die TRPC6-spezifische shRNA mit Hilfe rekombinanter Lentiviren in das Genom der Zielzellen integriert. Die exprimierte shRNA bindet nach ihrer Fragmentierung durch das Protein DICER als „small interfering RNA“ (siRNA) an den Proteinkomplex RISC (RNAi-induzierten „silencing complex“). Dort wird sie entwunden und vermittelt nun als einsträngiges RNA-Fragment die Erkennung und Spaltung der TRPC6 spezifischen mRNA, die im Anschluß abgebaut wird [24]. Die Funktionsweise des Gen-Silencing mittels shRNA ist in Abbildung 13 dargestellt.

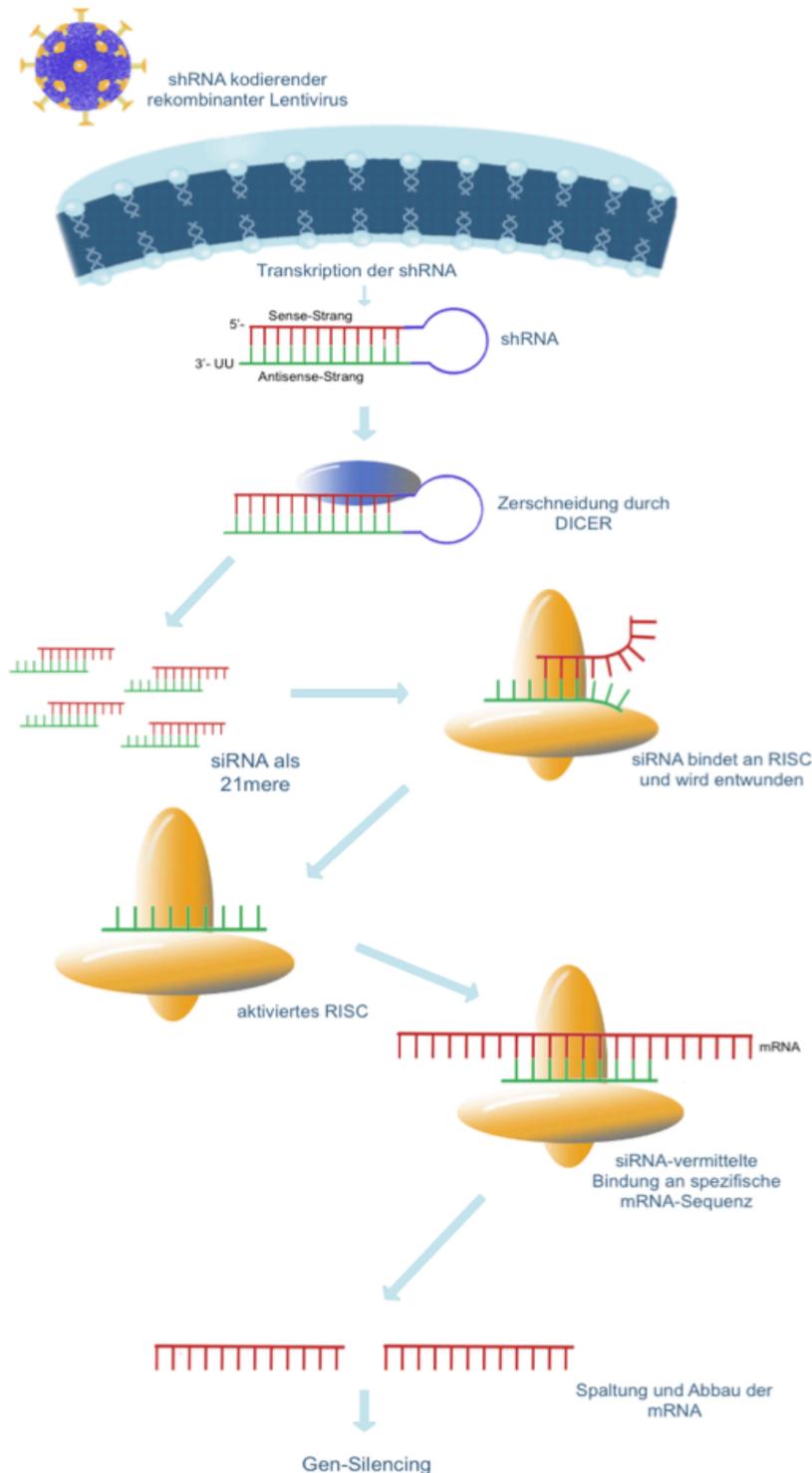


Abbildung 13: shRNA vermitteltes Gen-Silencing mit Hilfe rekombinanter Lentiviren.

Durch lentivirale Infektion gelangt die shRNA kodierende Sequenz in die Zielzelle und wird in das Genom integriert. Anschließend wird die shRNA transkribiert und mit dem Protein DICER in ca. 21 Basenpaare lange Fragmente (21mere) zerschnitten. Die 21mere werden anschließend entwunden und binden an den RNAi-induzierten „silencing complex“ (RISC), wodurch dieser unter Verbrauch von ATP aktiviert wird. RISC kann nun spezifisch an die entsprechende antiparallele mRNA-Sequenz binden und mit dem Proteinkomplex-Bestandteil Argonaute 2 diese zerschneiden [24,27] (Abbildung modifiziert nach Uder et al. [55] und Kuhlmann & Nellen [24]).

2.2 Methodik

2.2.1 Kultivierung der Zelllinien

Die Zelllinien wurden bei einer Temperatur von 37 °C und mit einer CO₂-Konzentration von 5% im Inkubator kultiviert. Alle Arbeitsschritte an den Zellen wurden unter der Sterilbank bei S2-Bedingungen ausgeführt.

Es wurden zwei Medien für die Kultur genutzt.

DMEM

FCS	10 %
L-Glutamin	2mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml

DMEM (serum-reduziert)

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

Im serum-reduzierten Medium wurden die T6.11-Zelllinie mit Hyperforin stimuliert.

2.2.2 Passage

Um eine konstante Proliferationsrate der Zellen zu gewährleisten, sollten optimale und damit gleichbleibende Kultivierungsbedingungen geschaffen werden. Dazu zählt die Zelldichte in den Zellkulturflaschen in einem bestimmten Bereich zu halten und das Kultivierungsmedium regelmäßig zu wechseln. Dafür wurde mit Hilfe eines Lichtmikroskops die Dichte des Zellrasens mehrmals wöchentlich beurteilt und das Zellmedium im Hinblick auf Veränderungen visuell kontrolliert. Das Medium enthielt zu

diesem Zweck Phenolrot als pH-Indikator. Überschritt die Dichte des Zellrasens oder unterschritt der pH einen gewissen Wert, wurden die Zellen passagiert. Dies war in der Regel dreimal die Woche nötig. Für die Passage wurde das Medium von dem Zellrasen abgenommen, um diesen dann mit 1xPBS zu waschen.

1x PBS

NaCl	170 mM
Na ₂ HPO ₂ x 2 H ₂ O	4 mM
KCl	3,35 mM
KH ₂ PO ₂	1,84 mM
Streptomycin	100 µg/ml
pH 7,24	

Nach der Abnahme des PBS wurde 1x Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben, um sie unter 37 °C von der Zellkulturflasche zu lösen.

1x Trypsin/EDTA

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

Das Trypsin wird daraufhin durch die Zugabe von frischem Medium inaktiviert und die Zellen in dem Gemisch resuspendiert. Je nach Dichte des Zellrasens wurden die Zellen in einem bestimmten Verhältnis gesplittet und anschließend in 30 bis 40 ml Medium neu ausgesät.

2.2.3 Herstellung von rekombinanten Lentiviren

Die Herstellung der Viren erfolgte unter S2-Bedingungen. Zunächst wurde die in Abschnitt 3.2 beschriebenen HEK293/TN Zelllinie mit drei Plasmiden transfiziert. Die Zellen wurden nach 20 Stunden gewaschen, um das Calciumphosphat zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in Vollmedium für drei Tage inkubiert. Die produzierten Viren konnten im Virusüberstand abgenommen und zur Infektion der Zielzellen eingesetzt werden.

2.2.3.1 Transfektion der HEK 293/TN-Zellen

Zunächst werden $1,3 \times 10^6$ HEK293/TN-Zellen auf 60 x 15 mm Zellkulturschalen ausgesät, in DMEM Medium kultiviert und am Folgetag lichtmikroskopisch beurteilt. War der Zellrasen dicht genug, wurde mit der Kalziumphosphat- Transfektion begonnen: Hierfür wurden zwei Lösungen hergestellt, die anschließend miteinander vermischt wurden. Lösung A enthielt die zur Transfektion benötigten Plasmide, destilliertes Wasser und eiskaltes CaCl_2 mit einer Konzentration von 2,5 mM. Die Konzentration der Plasmide wurde mit Hilfe photometrischer Messung bestimmt und in solchen Volumina zur Lösung gegeben, dass diese 6,6 μg des Transfervektors, 5 μg des Verpackungsplasmids (s. Abschnitt 2.1.6) und 2,3 μg des VSV-G-Expressionsplasmides (s. Abschnitt 2.1.7) enthielt. Das Plasmidgemisch wurde anschließend mit destilliertem Wasser auf 250 μl aufgefüllt und CaCl_2 wurde hinzugefügt. In Lösung B befand sich 275 μl 2x HBSS. Genannte Mengenangaben beziehen sich auf eine Zellkulturschale.

2x HBSS

NaCl	274 mM
Na_2HPO_2	3,75 mM
Glukose	27,75 mM
KCl	25 mM
HEPES	105 mM
pH	7,08- 7,09

Lösung A wurde unter gleichbleibendem Sprudeln mit einem Pipetus in Lösung B getropft. Das Gemisch trübte sich anschließend durch die Ausfällung des Kalziumphosphat-Plasmid-Präzipitates ein.

Das Zellkulturmedium wurde von den HEK293/TN Zellen abgenommen und durch frisches mit 25 μM Chloroquin versetztes Medium ersetzt. Chloroquin verbessert hierbei die Transfektionseffektivität. Nun wurde zu jeder Zellkulturschale 500 μl des Transfektionsgemisches hinzugegeben. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Das Zellkulturmedium wurde am nächsten Tag abgenommen und die Zellen mit 1x PBS zweimal gewaschen. Frisches Medium wurde auf die Zellen gegeben und nach drei Tagen Inkubationszeit konnte der Virusüberstand zur weiteren Verwendung abgenommen werden.

2.2.4 Infektion der Zielzellen

Die Lentiviren wurden als Überstand von den transfizierten HEK293/TN- Zellen abgenommen und für die Infektion mithilfe einer 20 ml Spritze durch einen Spritzenfilter mit einer Porengröße von 0,45 μm filtriert. Dies diente der Bereinigung des Virusüberstandes von möglichen Resten der HEK293/TN- Zellen. Dem filtrierten Überstand wurde Zellkulturmedium zugegeben, sodass der Virusüberstand in einem Verhältnis von

1:5 in dem Gemisch vorlag. Schlussendlich wurde 1 µg Polybrene pro 1 ml Gemisch zugegeben. Polybrene verstärkt die negative Ladung der Zelloberfläche und erleichtert dadurch das Andocken der Virionen. Die Zielzellen für die Experimente dieser Arbeit waren Zellen der HEK293/T6.11-Zelllinie. Es wurden ca. 450 000 Zellen in 35 x 16 mm Zellkulturschalen mit dem Gemisch aus Virusüberstand, Polybrene und Zellkulturmedium ausgesät. Danach wurden die Zellen inkubiert und das Medium nach einem Tag mit frischem Zellkulturmedium ersetzt.

2.2.5 Stimulation der Zielzellen

Am zweiten Tag nach erfolgter Infektion wurde das DMEM durch serumreduziertes Zellkulturmedium ersetzt. Die Zellen wurden damit für einen Tag inkubiert, um den Einfluss der Komponenten des FCS, wie beispielsweise der enthaltenen Wachstumsfaktoren, auf die Stimulation weitestgehend auszuschließen. Darauf folgte die Stimulation mit 1 µM Hyperforin, was aus echtem Johanniskraut (lat. *Hypericum perforatum*) gewonnen wurde. Für jeden Ansatz wurden vier Zellkulturschalen mit DMSO als Kontrolle und vier weitere Zellkulturschalen mit 1 µM Hyperforin 16 bis 20 Stunden im Inkubator mit serum-reduziertem Zellkulturmedium inkubiert.

Wurde mit Chemikalien gearbeitet, die als TRPC6-Hemmer in Frage kamen beziehungsweise die bereits als Inhibitoren bekannt waren, mussten die Zellen vorinkubiert werden. Für die Vorinkubation wurden die Substanzen in den entsprechenden unten angegebenen Konzentrationen und frischem serum-reduziertem Zellkulturmedium drei Stunden auf den Zellen belassen. DMSO wurde in derselben Menge wie der Hemmstoff auf die Kontroll-Zellkulturschalen gegeben und parallel mitinkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen wie oben beschrieben mit Hyperforin in serum-reduziertem Medium stimuliert.

2.2.6 Reportergenanalyse

Um die Expression der zu analysierenden Gene zu messen, wurde für diese Arbeit die Reportergenanalyse genutzt. Das Reportergen wurde durch lentiviralen Gentransfer in das Genom der T6.11-Zellen integriert. Dadurch konnte ich die Genexpression quantitativ und qualitativ messen. In den Experimenten, die für diese Arbeit durchgeführt wurden, wurde das Luziferase-Gen als Reportergen verwendet. Bei der Luziferase handelt es sich um ein biolumineszentes Enzym, das in der Natur vom nordamerikanischen Leuchtkäfer (lat. *Photinus pyralis*) produziert wird und eine wichtige Rolle im Paarungsverhalten und beim Einfangen von Beutetieren dieser Art spielt.

Für die Reportergenanalyse mussten die Zellen zunächst geerntet werden. Dazu wurde das Medium abgenommen und die Zellen wurden mit 2 ml 8 °C kaltem PBS gewaschen. Im Anschluss wurde 1 ml kaltes PBS auf den Zellen belassen. Mithilfe eines Schabers konnte der Zellrasen vorsichtig vom Boden der Zellkulturschale gelöst werden. Die Zellen wurden mit dem PBS in eine Mikropipette aspiriert und jeweils in ein, auf Eis stehendes, Eppendorfgefäß gefüllt. Die Eppendorfgefäße wurden bei 4 °C für fünf Minuten mit 13 000 rpm zentrifugiert, sodass sich ein Zellpellet am Boden des Gefäßes bilden konnte. Wurden die Zellen

mit pLL3.7 infiziert, erschienen die Zellpellets grün. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt. Die Eppendorfgefäße wurden nochmals unter oben genannten Bedingungen zentrifugiert und die übrigen Reste des Überstandes mit einer Mikropipette abgenommen.

Abhängig von der Pelletgröße wurden circa 70 µl 1x Reporterlysepuffer auf das Zellpellet gegeben, um die Zellen, anschließend auch mechanisch, aufzuschließen. Nachdem das Gemisch mit den aufgeschlossenen Zellen für fünf Minuten mit 13 000 rpm bei 4 °C zentrifugiert wurde, konnten von dem entstandenen Überstand 5 µl abgenommen und auf eine 96-Loch Mikrotiterplatte (Nunc, Roskilde) pipettiert werden. Auf die Proben wurden 50 µl Working Luciferase Assay Reagent gegeben.

Working Luciferase Assay Reagent

Luciferase Assay Reagent Stock

Tricine pH 7,8	22 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2,94 mM
EDTA (Natriumsalz)	0,11 mM
(MgCO ₃) ₄ Mg(OH) ₂ x 5 H ₂ O	25 mM
DTT	36,3 mM
ATP	583 µM
Coenzym A	297µM
Luziferin	4,7 mM

Luziferin liegt im Verhältnis von 1:10 im Working Luciferase Assay Reagent vor.

Sobald das Working Luziferase Assay Reagent zu dem lysierten Zellgemisch gegeben wird, oxidiert die Luziferase das im Reagenz enthaltene D-Luziferin zu Oxyluziferin. Bei dieser Reaktion kommt es zu Emission von Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda = 562$ nm. Bei Enzymsättigung, also Substratüberschuss, ist die Luziferaseaktivität proportional zum emittierten Licht [9]. Damit steht das emittierte Licht auch proportional zur Expression der zu analysierenden Gensequenz und Promotoraktivität. Die Luziferaseaktivität wurde mit Hilfe eines Luminometers gemessen.

2.2.7 Bicinchoninsäure (BCA) Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration

Es wurden jeweils 12 µl des lysierten Zellgemisches von jedem Ansatz auf eine weitere 96 Lochplatte (Greiner bio-one) aufgetragen. Parallel dazu wurde der BSA-Standard mit bekannten Konzentrationen (0, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 µl/ml) mit jeweils 12 µl auf die Lochplatte aufgetragen. Zu den Proben und dem Standard wurde dann die BCA-Lösung mit jeweils 100 µl/Loch pipettiert. Die BCA-Lösung wurde

frisch mit den BCA-Lösungen A und B (Interchim, Frankreich) in einem Verhältnis von 1:50 ([A]:[B]) angesetzt. Die Proben wurden daraufhin bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Währenddessen reagierten die zweiwertigen Kupferionen durch den Proteinkontakt zu einwertigen Kupferionen. Dies ergibt eine lila Färbung der Proben abhängig von der vorhandenen Proteinmenge. Die Absorption wurde bei $\lambda = 562$ nm gemessen.

Da der Gesamtproteingehalt und die Absorption proportional zueinander stehen, kann mit Hilfe der gemessenen Absorption und bekannten Konzentration der Standards der Gesamtproteingehalt der Proben bestimmt werden.

Um die Ergebnisse der Proben untereinander vergleichbar zu machen, wurde die Luziferaseaktivität [lu] durch den Gesamtproteingehalt genormt:

$$\text{relative Luziferaseaktivität } [rlu] = \frac{\text{gemessene Lichteinheiten } [lu]}{\text{Gesamtproteingehalt } [\mu g]}$$

Für jedes Experiment gab es vier Ansätze. Die daraus bestimmten Mittelwerte und Standardabweichungen werden weiter unten in Form von Balkendiagrammen dargestellt.

2.2.8 Statistik

Ausgewertet wurden die Ergebnisse mit Microsoft Excel und mit Hilfe von Microsoft PowerPoint grafisch dargestellt. Es wurde ein zweiseitiger, gepaarter student t-Test verwendet. Die Signifikanz wurde folgendermaßen definiert:

$$\text{Signifikanz} \Rightarrow \begin{cases} n . s . & \text{falls } p \geq 0,05 \\ * & \text{falls } p < 0,05 \\ ** & \text{falls } p < 0,01 \\ *** & \text{falls } p < 0,001 \end{cases}$$

Nicht signifikante Ergebnisse ($p \geq 0,05$) wurden mit n.s. bezeichnet.

3. Ergebnisse

3.1 Hyperforin induziert die AP-1-Aktivierung in T6.11-Zellen

2017 wurde erstmals publiziert, dass das prenylierte Phloroglucin Hyperforin in TRPC6-exprimierenden (T6.11)- Zellen die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 induziert. Die Stimulation des TRPC6-Kanals bewirkt daher Veränderungen auf dem Niveau der Genexpression [52]. Die Hyperforin-induzierte AP-1-Aktivierung war die Grundlage für die folgenden Experimente. Die T6.11-Zellen wurden hierfür mit Lentiviren, die für das Kollagenase-Promotor/ Luziferase-Reportergen (Coll.luc) (Abb. 14A) kodierte, infiziert. Die Kollagenase-Promotor-Region enthält ein TRE, welches als Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor AP-1 fungiert. Um die Aktivierung von AP-1 messbar zu machen, reguliert der Kollagenase-Promotor die Expression des Luziferase-Gens. Die Zellen wurden 24 h in serum-reduziertem Medium kultiviert (Serumreduktion) und danach 16 Stunden mit Hyperforin stimuliert. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und die Luciferase-Aktivität, sowie die Proteinkonzentration gemessen. Durch Zugabe von Luziferin wurde dieses durch die Luciferase oxidiert und emittierte Licht, das mit Hilfe eines Luminometers gemessen wurde. Die so gemessene Luciferaseaktivität wurde auf die Proteinkonzentration genormt. Die relative Luciferaseaktivität entspricht somit der AP-1-Aktivität und ist in Abbildung 14B dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass die AP-1-Aktivität nach Stimulation des TRPC6-Kanals signifikant erhöht war (Abb. 14B). Diese Daten bestätigen frühere Beobachtungen, nach denen die Stimulation des TRPC6-Kanals die zelluläre AP-1-Aktivität erhöht [52].

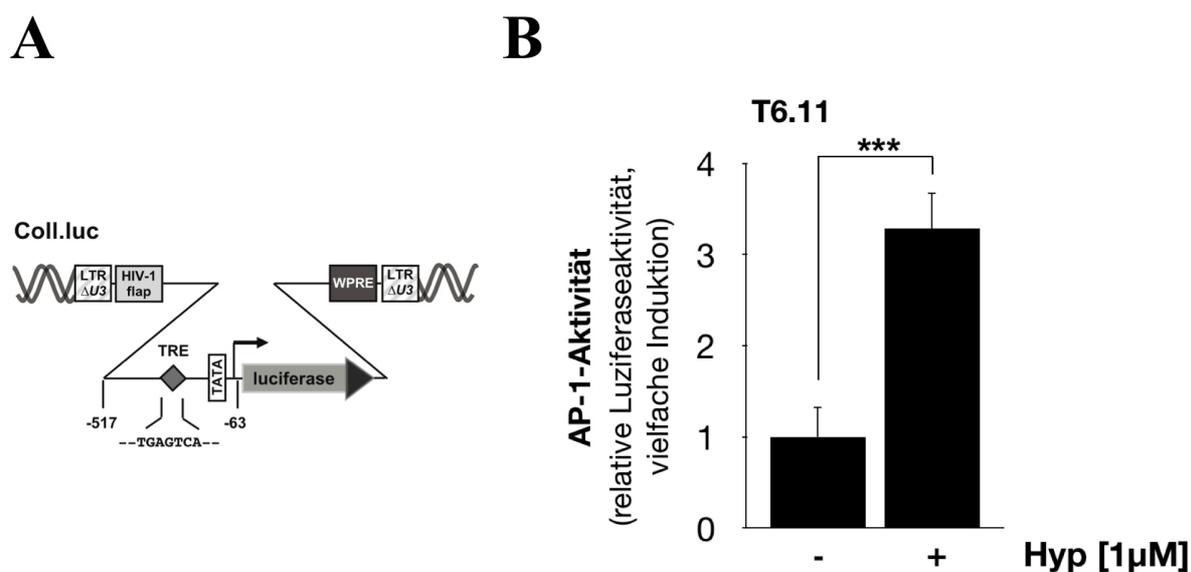


Abbildung 14: Hyperforin induziert die AP-1-Aktivierung in T6.11-Zellen.

A Schema des Provirus, der für das Reportergen Coll. luc kodiert. Er enthält den Kollagenase-Promotor mit dem 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate Response Element (TRE), das als AP-1 Bindungsstelle dient [1]. Stromabwärts befindet sich das Luziferasegen. Die Abbildung zeigt die mutierte U3-Region des 3'- und 5'LTR (LTR Δ U3), das HIV-flap Element und das „woodchuck Hepatitis virus posttranscriptional regulatory element“ (WPRE).

B Mit Hilfe lentiviralen Gentransfers wurde das Reportergen Coll.luc in das Chromatin der TRPC6-exprimierende HEK293 (T6.11)-Zellen inseriert. Die Zellen wurden für 24 Stunden in serumreduziertem Medium kultiviert. Die Stimulation erfolgte mit Hyperforin (1 μ M) für 16 Stunden in serum-reduziertem Medium. Die Zellen wurden anschließend geerntet und lysiert. Die Luciferaseaktivität wurde bestimmt und an die Proteinkonzentrationen der Zellextrakte angeglichen. Dargestellt ist der Mittelwert von elf unabhängigen, in Quadrupeln durchgeführten Experimenten (***, $p < 0,001$). Die Fehlerindikatoren stellen die positive Standardabweichung dar.

Hyperforin konnte die AP-1 Aktivität in T6.11-Zellen signifikant steigern. Die folgenden Experimente wurden deshalb mit Hyperforin in einer Konzentration von 1 μ M durchgeführt.

3.2 Die Expression einer TRPC6-spezifischen „small hairpin“ (sh)RNA hemmt die Hyperforin-induzierte Aktivierung von AP-1 in T6.11-Zellen

Hyperforin ist seit einigen Jahren als Ligand des TRPC6-Kanals bekannt und etablierte sich als Aktivator des TRPC6-Kanals [14,19,26,38,45,52,54]. Es wurde gezeigt, dass Hyperforin die AP-1 Aktivierung bei T6.11-Zellen induziert, jedoch nicht bei HEK293-Zellen, die TRPC6 nicht exprimierten [52].

Um die Relevanz der TRPC6-Kanäle für die Hyperforin-induzierte AP-1-Aktivierung zu bestätigen, wurde die Konzentration von TRPC6 durch Expression einer TRPC6-spezifischer „small hairpin RNA“ (shRNA) reduziert. In Western-Blot-Experimenten wurde bestätigt, dass die Expression einer TRPC6-spezifischen

shRNA die Expression von TRPC6 signifikant reduzierte [39]. Mit dem lentiviralen Transfervektor pLL3.7-shTRPC6 wurden Lentiviren für die Infektion von T6.11-Zellen hergestellt. Als Kontrolle dienten Lentiviren, die mit dem lentiviralen Transfervektor pLL 3.7 hergestellt wurden. Die T6.11-Zellen wurden mit den Lentiviren infiziert. Zusätzlich wurde für die Reporteranalyse das Reporter Gen Coll.luc durch lentivirale Infektion in das Genom der T6.11-Zellen integriert. Die Zellen wurden für 24 Stunden serumreduziert und anschließend für 16 Stunden mit Hyperforin stimuliert. Nach der Zellernte wurde die Luziferaseaktivität auf die Protein-Konzentration genormt und vergleichend dargestellt (Abb. 15). Die Daten zeigen, dass die Expression einer TRPC6-spezifischen shRNA zu einer signifikanten Reduktion der AP-1-Aktivität in Hyperforin-stimulierten T6.11-Zellen führte. Daraus lässt sich schlußfolgern, dass der TRPC6-Kanal für die Hyperforin-induzierte AP-1-Aktivierung relevant ist.

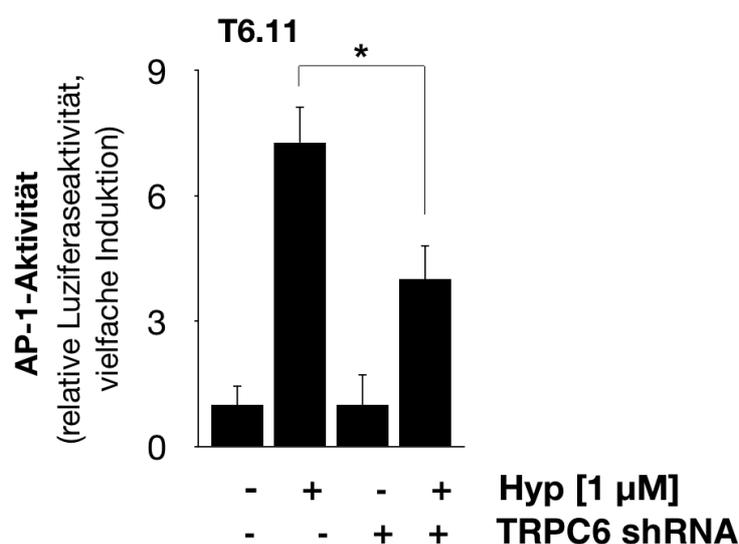


Abbildung 15: Die Expression einer TRPC6-spezifischen shRNA reduziert die Hyperforin-induzierte AP-1-Aktivierung in T6.11-Zellen.

T6.11-Zellen, die TRPC6-Kanäle exprimierten, wurden mit einem Lentivirus, der das Coll.luc Reporter Gen enthielt, infiziert. Zusätzlich wurde mit Hilfe lentiviralen Gentransfers eine Gensequenz, die für TRPC6-spezifische shRNA kodiert, in das Genom der T6.11-Zellen integriert. Für die Kontrolle wurden mit Hilfe des pLL3.7 Transfervektors Lentiviren hergestellt, die im Anschluss für die Infektion von T6.11-Zellen verwendet wurden. Die Zellen wurden in serumreduziertem Medium mit Hyperforin (1 µM) für 16 Stunden stimuliert und anschließend geerntet. Die AP-1-Aktivität wurde mit Hilfe der Luziferaseaktivität bestimmt und auf den Proteingehalt genormt. Dargestellt ist der Durchschnittswert von sechs unabhängigen, in Quadrupeln durchgeführten Experimenten (*, $p < 0,05$). Die Fehlerindikatoren stellen die positive Standardabweichung dar.

Diese Ergebnisse bestätigen die Erkenntnisse von Thiel & Rössler [52] und konnten auf genetischer Ebene die Signifikanz des TRPC6-Kanals für die Hyperforin-induzierte AP-1-Aktivierung darstellen.

3.3 Inhibitoren der Hyperforin-induzierten AP-1-Aktivierung bei

T6.11-Zellen

In vergangenen Studien wurden bereits Inhibitoren des TRPC6-Kanals durch unterschiedliche Methoden identifiziert: Mit 2-Aminoethoxydiphenylborinat (2-APB) und SAR 7334 konnten in Patch- bzw. Voltage-Clamp-Versuchsreihen Ionenströme entlang des TRPC6-Kanals gehemmt werden [21,32,62]. BCTC, TC-1 2014, sowie RQ 00203078 wurden für die Hemmung der AP-1-Aktivität anderer TRP-Kanäle erfolgreich eingesetzt [48].

In den folgenden Versuchsreihen werden die genannten Substanzen auf ihre Eignung als Inhibitor der Hyperforin-induzierten AP-1-Aktivierung in T6.11-Zellen analysiert.

3.3.1 2-APB hemmt die AP-1-Aktivierung nach der Stimulation des TRPC6-Kanals mit Hyperforin

2-Aminoethoxydiphenyl Borat (2-APB) (Abb. 16A) wurde bereits als Aktivator von TRPV1-, TRPV2- und TRPV3-Kanälen und als Antagonist von TRPM2-, TRPM3-, TRPM8-, TRPC3- und TRPC5- Kanäle identifiziert [21,30,53,62]. Vorangegangene Voltage-Clamp-Versuchsreihen zeigten, dass ein mit 10 μM 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) stimulierter Ionen-Strom entlang des TRPC6-Kanals durch 2-APB dosisabhängig gehemmt werden konnte [21]. In weiteren Experimenten wurden die Ca^{2+} -Ströme entlang der TRPC6-Kanäle bei TRPC6-exprimierenden HEK293-Zellen nach Stimulation mit Carbachol (100 μM) durch 2-APB mit einer Konzentration von 75 μM , vollständig gehemmt [62].

Es wurde hier der Einfluss von 2-APB auf die Hyperforin-induzierte AP-1-Aktivierung in T6.11-Zellen getestet. Die Zellen wurden dafür mit einem Coll.luc kodierenden Lentivirus infiziert und nach 24 Stunden Serumreduktion, mit 75 μM 2-APB für drei Stunden vorinkubiert. Anschließend wurden die T6.11-Zellen 16 Stunden in serumreduziertem Medium stimuliert, das zuvor mit 75 μM 2-APB und 1 μM Hyperforin versetzt wurde. Die Luciferaseaktivität wurde gemessen und auf die, mittels BCA Assay bestimmten, Protein-Konzentration normiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16B dargestellt. Die Daten zeigen, dass die Verbindung 2-APB die AP-1 Aktivität nach Stimulation des TRPC6-Kanals mit Hyperforin in T6.11-Zellen signifikant hemmte.

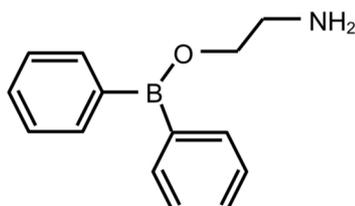
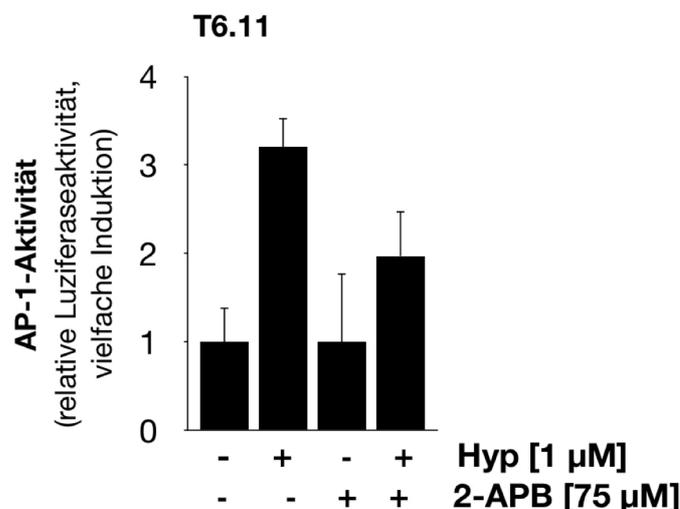
A**2-APB****B**

Abbildung 16: 2-APB hemmt die Hyperforin-induzierte AP-1 Aktivität in T6.11-Zellen.

A Strukturformel von 2-Aminoethoxydiphenylborinat (2-APB).

B Mit Hilfe lentiviralen Gentransfers wurde das Reportergen Coll.luc in das Chromatin der TRPC6-exprimierende HEK293 (T6.11)-Zellen inseriert. Die Zellen wurden in serumreduziertem Medium für 3 Stunden mit 2-APB vorinkubiert und anschließend mit Hyperforin (1 μ M) stimuliert. Nach der Zellernte wurde die AP-1 Aktivität mit Hilfe der Reportergenanalyse bestimmt: Die gemessene Luciferaseaktivität der einzelnen Extrakte wurde mittels BCA-Assay auf die jeweilige Proteinkonzentration genormt. Dargestellt ist der Mittelwert von einem, in einem Quadrupel durchgeführten Experiment. Die Fehlerindikatoren stellen die positive Standardabweichung dar. Die Ergebnisse wurden im Labor von anderen Wissenschaftlern bestätigt.

3.3.2 BCTC blockiert die durch Hyperforin induzierte, TRPC6-gesteuerte, Aktivierung von AP-1

Es wurde publiziert, dass die Verbindung BCTC (Abb. 17A) die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach Stimulation von TRPV1-, TRPM3- und TRPM8- Kanälen hemmt [4,31,58]. In weiteren Experimenten wurde gezeigt, dass BCTC die TRPM8-vermittelte AP-1 Aktivität hemmt und damit in die TRPM8-induzierte intrazelluläre Signalkaskade eingreift [48].

In dieser Arbeit wurde getestet, ob die, über TRPC6-Kanäle mit Hyperforin induzierte AP-1 Aktivität ebenso durch BCTC gehemmt wird. Dafür wurden die T6.11-Zellen mit dem Lentivirus, der das Reportergen Coll.luc kodierte, infiziert und 24 Stunden in serumreduziertem Medium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit 10 μ M BCTC für drei Stunden vorinkubiert. Hyperforin wurde in einer Konzentration von 1 μ M und BCTC in einer Konzentration von 10 μ M in serumreduziertem Medium gelöst, das anschließend auf die T6.11-Zellen gegeben wurde. Nach 16 Stunden wurden die Zellen geerntet und die genormte Luciferaseaktivität (AP-1-Aktivität) bestimmt. Die Hyperforin-induzierte AP-1-Aktivität konnte mit BCTC vollständig gehemmt werden (Abb. 17B).

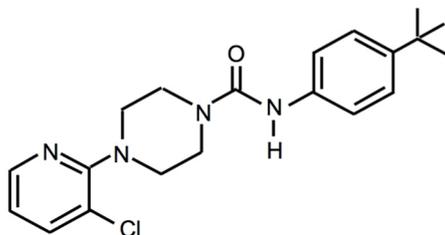
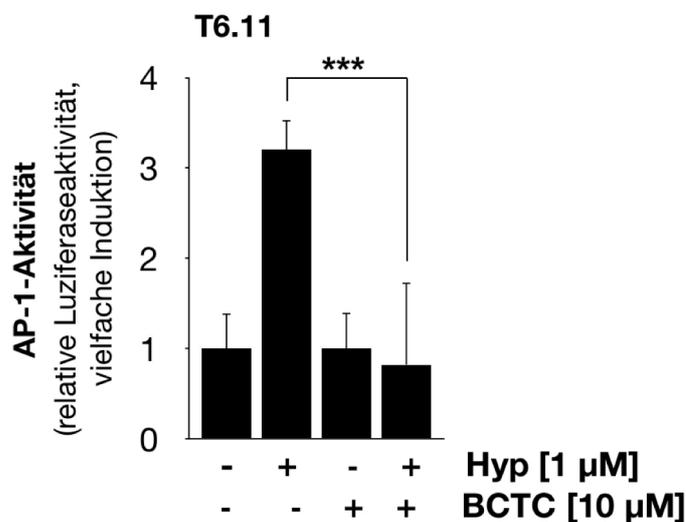
A**BCTC****B**

Abbildung 17: BCTC hemmt die Hyperforin induzierte AP-1-Aktivität in T6.11-Zellen.

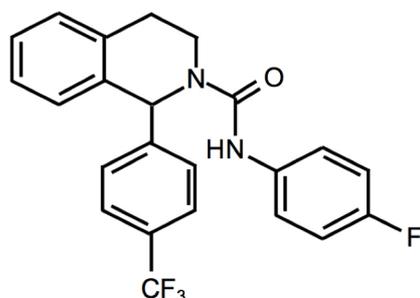
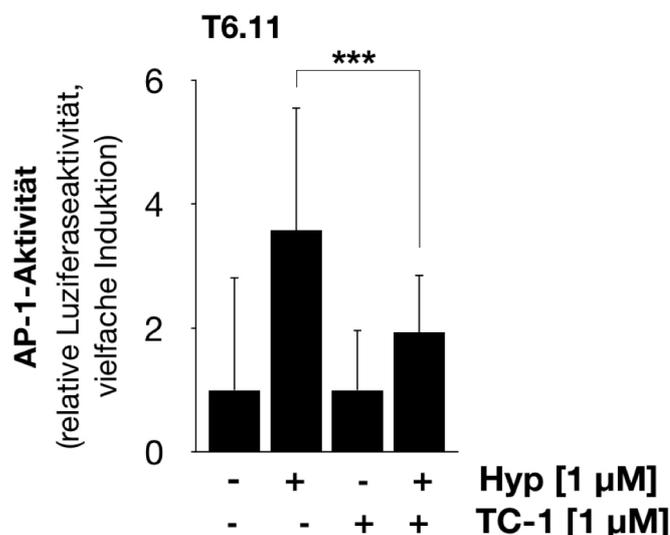
A Strukturformel von BCTC.

B T6.11-Zellen, die TRPC6-Kanäle exprimierten, wurden mit dem für Coll.luc kodierenden Lentivirus infiziert. Nach einer dreistündigen Vorinkubation mit BCTC (10 μ M), wurde frisches mit Hyperforin (1 μ M) und BCTC (10 μ M) versetztes serumreduziertes Medium auf die Zellen gegeben. Nach der Stimulation für 16 Stunden wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die Luziferaseaktivität der präparierten Zellen wurde gemessen und auf den, mit Hilfe des BCA Assays bestimmten, Proteingehalt genormt. Dargestellt ist der Mittelwert von drei, in Quadrupeln durchgeführten Experimenten (***, $p < 0,001$). Die Fehlerindikatoren stellen die positive Standardabweichung dar.

Diese und die Ergebnisse aus vorherigen Studien zeigen, dass BCTC ein breites Wirkspektrum in Bezug auf die TRP-Kanäle besitzt.

3.3.3 TC-1 2014 hemmt die über TRPC6-Kanäle gesteuerte Hyperforin-induzierte AP-1-Aktivierung

Es wurde gezeigt, dass die, bereits als TRPM8-Inhibitor bekannte, Verbindung TC-1 2014 (Abb. 18A), die TRPM3-, TRPM8-, sowie die von spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle vom Typ L vermittelte AP-1-Aktivität hemmt [48]. In dieser Arbeit wurde getestet, ob TC-1 2014 auch die TRPC6-gesteuerte, Hyperforin-induzierte, AP-1-Aktivität hemmt: Die mit dem für Coll.luc kodierenden Lentivirus infizierten T6.11-Zellen wurden mit 1 μ M TC-1 2014 für drei Stunden vorinkubiert und anschließend in serum-reduziertem Medium mit Hyperforin (1 μ M), im Beisein von TC-1 2014 (1 μ M), stimuliert. Nach der Zellernte wurde die AP-1-Aktivität mittels Normierung der gemessenen Luziferaseaktivität auf den Protein-Gehalt bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, dass TC-1 2014 in Hyperforin-stimulierten T6.11-Zellen die AP-1-Aktivität hemmte (Abb. 18B).

A**TC-1 2014****B****Abbildung 18: TC-1 hemmt die Hyperforin induzierte AP-1-Aktivität in T6.11-Zellen.**

A Strukturformel von TC-1 2014.

B TRPC6-Kanäle exprimierende T6.11-Zellen wurden mit Lentiviren, die das Reportergen Coll.luc kodieren, infiziert. Nach der Vorinkubation mit TC-1 2014 (1 μ M) für drei Stunden wurden die Zellen in mit Hyperforin (1 μ M) und TC-1 2014 (1 μ M) versetztem Medium stimuliert. Nach 16 Stunden wurden die Zellen geerntet und die relative Luciferaseaktivität mit Hilfe des Luciferase- und BCA-Assays bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert von vier, in Quadrupeln durchgeführten Experimenten (***, $p < 0,001$). Die Fehlerindikatoren stellen die positive Standardabweichung dar.

3.3.4 Die Verbindung RQ-00203078 hat keinen signifikanten Einfluß auf die Hyperforin-induzierte AP-1-Aktivität in T6.11-Zellen

Die Verbindung RQ-00203078 (Abb. 19A) wurde als selektiver Hemmstoff für TRPM8-Kanäle mit Hilfe der Hochdurchsatz-Screening-Methode (HTS) identifiziert [35]. In darauffolgenden Reportergenanalyse-Experimenten konnte mit RQ-00203078 die TRPM8-Kanal-gesteuerte AP-1-Aktivierung gehemmt werden [48]. Eine Hemmung der Stimulation von TRPA1-, TRPV1-, TRPM3-, TRPV4-, sowie spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen war nicht möglich [35,48].

Im Folgenden wurde die Hemmung von TRPC6-Kanälen durch RQ-00203078 mit Hilfe der Reportergenanalyse getestet: Die TRPC6-Kanal exprimierenden T6.11-Zellen wurden mit dem Lentivirus, der für Coll.luc kodiert, infiziert und nach 24 Stunden Serumreduktion für drei Stunden mit RQ-00203078 (1 μ M) vorinkubiert. Anschließend wurde frisches serumreduziertes Medium mit Hyperforin (1 μ M) sowie RQ-00203078 (1 μ M) für 16 Stunden auf den Zellen belassen. Nach anschließender Zellernte wurde die relative Luciferaseaktivität (AP-1-Aktivität) berechnet. Es zeigte sich keine signifikante Hemmung der AP-1-Aktivität (Abb. 19B).

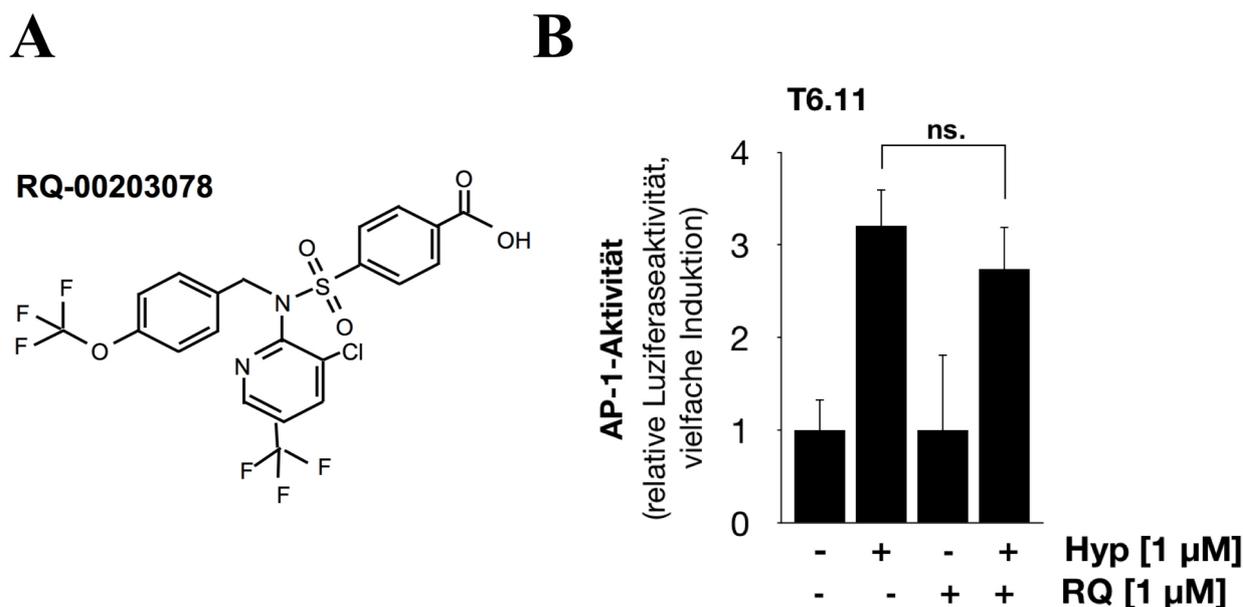


Abbildung 19: RQ-00203078 hemmt die Hyperforin-induzierte AP-1-Aktivität in T6.11-Zellen.

A Strukturformel von RQ-00203078.

B T6.11-Zellen wurden mit Coll.luc kodierenden Lentiviren infiziert. Nach der Vorinkubation mit RQ-00203078 (1 μ M) für drei Stunden, wurden die Zellen im Beisein von RQ-00203078 (1 μ M) mit Hyperforin (1 μ M) stimuliert. Die Zellen wurden nach 16 Stunden geerntet und die gemessene Luziferaseaktivität auf die Gesamt-Proteinkonzentration genormt. Dargestellt ist der Mittelwert von drei, in Quadrupeln durchgeführten Experimenten (n.s., $p \geq 0,05$). Die Fehlerindikatoren stellen die positive Standardabweichung dar. Die Ergebnisse wurden von anderen Wissenschaftlern des Labors bestätigt.

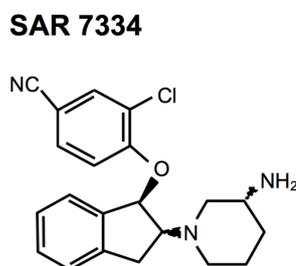
Damit bestätigt sich die TRPM8-Selektivität von RQ-00203078.

3.3.5 Die Verbindung SAR 7334 hemmt die Hyperforin-induzierte AP-1-Aktivierung

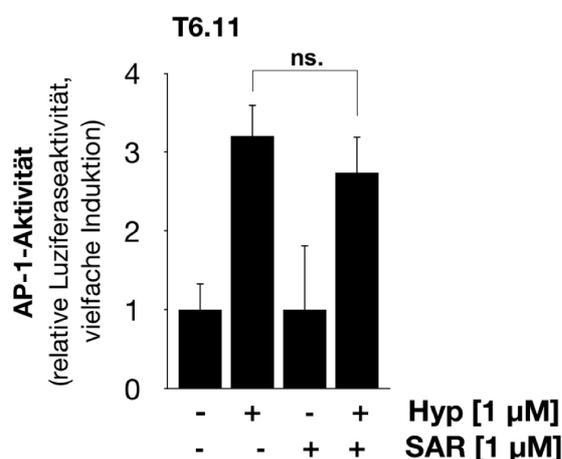
Das (1R,2S)-Inden Oxid-Derivat SAR 7334 (Abb. 20A) konnte im Rahmen von FLIPR (fluorometric imaging plate reader) -Experimenten den Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch OAG an TRPC3-, TRPC7-, sowie TRPC6-Kanäle exprimierenden Zellen hemmen. Darüber hinaus wurden mit der whole cell-Patch-Clamp-Technik der OAG-induzierte Ioneneinstrom entlang der Membran TRPC6 exprimierender Zellen antagonisiert [32]. In dieser Arbeit wurde der Effekt von SAR 7334 auf die TRPC6 gesteuerte AP-1-Aktivierung getestet. Es wurden dafür zwei Versuchsreihen mit einer Konzentration von 1 μ M und mit 5 μ M SAR 7334 durchgeführt. Zunächst wurden die T6.11-Zellen mit Coll.luc kodierenden Lentiviren infiziert und für 24 Stunden serumreduziert. Die Zellen wurden anschließend drei Stunden mit SAR 7334 in der jeweiligen Konzentration vorinkubiert und anschließend mit Hyperforin (1 μ M) und entsprechend konzentriertem SAR 7334 stimuliert. Die Luziferaseaktivität wurde auf die Proteinkonzentration genormt. Die Ergebnisse ergaben, dass SAR 7334 in einer Konzentration von 1 μ M

keinen signifikanten Einfluss auf die Hyperforin-induzierte AP-1-Aktivierung hatte (Abb. 20B), mit einer Konzentration von 5 μM SAR 7334 jedoch eine Hemmung zu beobachten war (Abb. 20C).

A



B



C

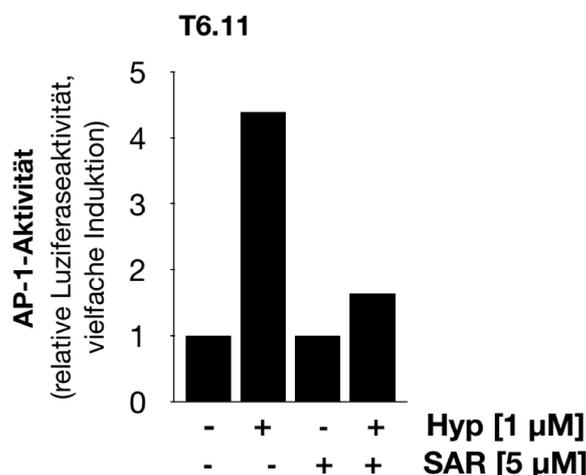


Abbildung 20: SAR 7334 hemmt die Hyperforin induzierte AP-1-Aktivität in T6.11-Zellen.

A Strukturformel von SAR 7334.

B,C Mit Hilfe lentiviralen Gentransfers wurde das Reportergen Coll.luc in das Chromatin der TRPC6-exprimierende-Zellen inseriert. Die Zellen wurden mit 1 μM (**B**) bzw. 5 μM SAR 7334 (**C**) vorinkubiert und anschließend im Beisein von SAR 7334 (1 μM) (**B**) bzw. (5 μM) (**C**) mit Hyperforin (1 μM) stimuliert. Nach der Zellernte wurde die relative Luziferaseaktivität anhand des Gesamt-Proteingehaltes bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert von fünf (**B**) bzw. einem (**C**), in Quadrupeln durchgeführten Experimenten (n.s., $p \geq 0,05$). Die Fehlerindikatoren stellen die jeweilige positive Standardabweichung dar. Die Daten wurden von anderen Wissenschaftlern des Labors bestätigt.

Die Verbindung SAR 7334 hemmt konzentrationsabhängig die TRPC6-gesteuerte AP-1-Aktivierung durch Hyperforin.

Es wurden darüber hinaus auch Versuche mit SAR 7334 in einer Konzentration von 10 μM durchgeführt. Dies führte allerdings während der Hyperforin-Stimulation zu einer Ablösung der Zellen vom Boden der Zellkulturschale. Es ist also davon auszugehen, dass SAR 7334 in einer Konzentration von 10 μM toxisch auf die Zellen wirkt.

4. Diskussion

Die TRP-Kanäle wurden in den letzten Jahren zunehmend erforscht. Es wurden bereits viele Korrelationen zu physiologischen Prozessen, unterschiedlichen Pathologien verschiedenster Organsysteme und deren Pathogenesen herausgearbeitet. Die Erforschung dieser Kanäle spielt daher eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Therapieansätzen für die entsprechenden Erkrankungen. Es wurde bereits gezeigt, dass beispielsweise der TRPC6-Kanal, der Gegenstand dieser Arbeit ist, die Progredienz verschiedener Erkrankungen der Nierenglomeruli, wie beispielsweise der primären und sekundären fokalen segmentalen Glomerulosklerose und des Typ-1 Diabetes steigern kann [13]: Die Deletion von TRPC6 bei Mäusen verringerte die interstitielle Fibrosierung bei unilateraler Ureterobstruktion [61]. Darüber hinaus konnte der TRPC6-induzierte Ca^{2+} -Einstrom durch Angiotensin II und Sauerstoffradikale aktiviert werden, was zu einer Hypertrophie und dem Absterben von Podozyten bei der diabetischen Nephropathie führte. [13]

Damit wurde eine Korrelation zur Pathogenese der diabetesbedingten Nierenerkrankung hergestellt. Es gab diesbezüglich jedoch auch kontroverse Ergebnisse: Wang et al. [56] zeigten, dass die bei TRPC6-defizienten Akita-Mäusen zwar die Proteinurie und Tubulus-Schädigung der Glomeruli verringert war, jedoch auch eine Insulinresistenz und die Erweiterung der Mesangia der Glomeruli induziert wurde [13].

Andere Versuche, wie die von Wang et al. [57] zeigten, dass TRPC6 die Interaktion vom Amyloid-Precursor-Protein (APP) mit Presenilin 1 hindert und damit die Spaltung von APP durch die γ -Sekretase, sowie die β -Amyloid-Produktion herunterreguliert [13]. Dies wurde als potentiell neuer Therapieansatz für die Alzheimer-Demenz postuliert [13]. Dafür spricht, dass die Aktivierung von TRPC6 die Neurogenese im Hippocampus beim Erwachsenen steigert und das räumliche Langzeitgedächtnis verbessert, andererseits konnten jedoch neurotoxische Wirkungen des TRPC6-induzierten Ca^{2+} -Einstroms festgestellt werden [13]. In zerebralen Ischämie-Modellen hat TRPC6 neuroprotektive Eigenschaften gezeigt und könnte in Zukunft eine Rolle in der Behandlung von Schlaganfällen spielen [42].

In Bezug auf die onkologische Forschung konnten einige Zusammenhänge zwischen der TRPC6-Expression und der Onkogenese und Proliferation spezifischer Tumorentitäten gezeigt werden: Beispiele sind die Steigerung der Proliferation von A549 Lungenkarzinomzellen durch eine TRPC6 Expression, die Induktion der Proliferation und Migration von klarzelligen Nierenzellkarzinomen durch Aktivierung des TRPC6-NFAT Signalweg und eine gesteigerte Wirksamkeit von Doxorubicin bei Zellen des hepatozellulären Karzinoms durch Hemmung von TRPC6 [13]. Der Kanal ist außerdem ein entscheidender Faktor für die Angiogenese, Invasion und das Wachstum vom malignen Glioblastom [7]. Kontrovers diskutiert wurde, welche Rolle TRPC6 in der Hyperforin induzierten Hemmung von Brustkrebszellwachstums spielt [13].

Diese Ergebnisse unterstreichen die Relevanz und mögliche Zukunftsperspektiven einer intensiveren Erforschung dieses Kanals, vor allem im Rahmen einer zielgerichteten Therapie durch einen spezifischen TRPC6-Inhibitor.

Zur Aktivierung des TRPC6-Kanals verwendete ich Hyperforin, ein acetyliertes bicyclisches Phloroglucinolderivat aus der Pflanze *Hypericum perforatum*. Hyperforin wurde in der Vergangenheit schon von anderen Forschungsgruppen als TRPC6-Ligand für ihre Versuche verwendet [14,19,26,38,45,54]. Sell et al. [40] postulierte hingegen, dass Hyperforin nicht als TRPC6-Ligand, sondern als Protonophor agiere: Ein

H⁺-Einstrom würde das Zytosol der Zelle ansäuern und durch den Na⁺-/ H⁺-Antiporter einen Na⁺-Einstrom in die Zelle verursachen, ergo unabhängig des TRPC6-Kanals für einen Ioneneinstrom sorgen. Gegen diese Hypothese spricht, dass in Hyperforin-stimulierten HEK293-Zellen, die keine TRPC6-Kanäle exprimieren, der Ca²⁺-Einstrom im Vergleich zu TRPC6-exprimierenden HEK293-Zellen signifikant verringert ist [14,26]. Analog waren die Ergebnisse von Versuchsreihen mit OAG (1,2-Oleoyl-Acetyl-glycerol) als TRPC6-Stimulator [52]. Darüber hinaus führte Hyperforin im Vergleich zu Karbonyl-Zyanid-m-Chlorophenyl-Hydrazin, einem bekannten Protonophor, bei extrazellulärer Ca²⁺-Depletion, nicht zu einer intrazellulären Ca²⁺-Erhöhung [45]. Diese Daten widersprechen der Protonophor-Hypothese von Sell et al. [40]. Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen dieser Hypothese auch entgegen und bestätigen, dass Hyperforin ein TRPC6-Ligand ist: Es wurde zuerst mit einem genetischen Versuchsansatz verifiziert, ob Hyperforin als Ligand des TRPC6-Kanals fungiert. Durch die Expression einer TRPC6-spezifischen shRNA wurde die TRPC6-Konzentration reduziert. Die shRNA exprimierenden Zellen hemmten die Hyperforin-induzierte TRPC6-Signalkaskade, im Vergleich zu Zellen derselben Linie mit unveränderter TRPC6-Expression, signifikant. Es konnte also gezeigt werden, dass eine Reduktion der TRPC6-Expression die Transkription von Hyperforin-induzierten Genen hemmt. In den weiteren Experimenten wurde deshalb Hyperforin als TRPC6-Ligand verwendet und verschiedene Verbindungen auf ihre Fähigkeit getestet, die TRPC6-induzierte intrazelluläre Signalkaskade zu hemmen.

Die Mess-Methode dieser Arbeit basiert auf der Erfassung der AP-1-Aktivität als Sensor der TRPC6-Aktivität. Durch die Stimulation des TRPC6-Kanals wird eine intrazelluläre Signalkaskade induziert, die letztlich in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 kulminiert [52]. Mit diesem Versuchsansatz wurde ein Endpunkt der TRPC6-induzierten Signalkaskade gemessen [52], was ein besonderer Vorteil dieser Methode, im Vergleich zu in der Vergangenheit zur Bestimmung der TRPC6-Aktivität genutzten Patch-Clamp, Voltage-Clamp, beziehungsweise Ca²⁺-Imaging Techniken. Da bei diesen Versuchsansätzen das Experiment nach wenigen Sekunden beendet ist, wurden vielfach hohe Konzentrationen der Hemmstoffe eingesetzt [4,21,32]. Die Zellen waren im Vergleich dazu mit der hier verwendeten Methode wesentlich länger, nämlich 24 Stunden, statt Millisekunden bis Minuten lang den Inhibitoren exponiert. Dadurch war es möglich geringere Konzentrationen zu wählen, um toxische Reaktionen zu vermeiden. Unvorhergesehene toxische Reaktionen konnten andererseits helfen, Rückschlüsse für die potenzielle Nutzung als Pharmakon, zu ziehen. Beispielsweise zeigten die Experimente mit der Verbindung SAR 7334 eine toxische Wirkung bei 10 µM über 24 Stunden. Dieses Ergebnis könnte als Basis weiterführenden Experimenten zur Untersuchung der Toxizität von SAR 7334 in unterschiedlichen humanen Gewebetypen dienen.

Darüber hinaus haben einige Studien bereits gezeigt, dass TRPC6 nicht nur Ca²⁺-, sondern auch Na⁺-Einströme in die Zelle induzieren kann: Soboloff et al. [44] hat an glatten Muskelzellen, der A7r5-Linie, demonstriert, dass TRPC6-Kanäle durch einen Na⁺-Einstrom spannungsgesteuerte Ca²⁺-Kanäle aktivieren und so einen Ca²⁺-Einstrom bewirken konnte. Wurde die Anzahl der TRPC6-Proteine durch RNA-Interferenz reduziert, wurde zwar der OAG-induzierte Kationenstrom reduziert, der Ca²⁺-Einstrom veränderte sich jedoch nicht [44]. Auch als die spannungsgesteuerten Ca²⁺-Kanäle mit einem spezifischen Hemmstoff, dem Nimodipin, gehemmt wurden, kam auch kein Ca²⁺-Einstrom zustande [44]. Damit zeigte Soboloff et al. [44], dass TRPC6 in glatten Muskelzellen hauptsächlich als Na⁺-Kanal wirkt. Ähnliche

Effekte konnten bei PHM1-41-Myometrienzellen beobachtet werden: Chung et al. [8] konnte die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mit Nifedipin reduzieren. Wurden die Zellen ohne extrazelluläres Na^+ mit OAG stimuliert, war die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration verringert [8]. Damit zeigte Chung et al. [8], dass die TRPC6 induzierte Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zum Teil an einen TRPC6-induzierten Na^+ -Einstrom gekoppelt ist.

Des Weiteren wurden die Eigenschaften der Na^+ -abhängigen und Na^+ -unabhängigen Induktion des Ca^{2+} -Einstrom durch TRPC6-Kanäle an kortikalen Neuronen gezeigt [54]. Aus diesem Grund würden Ca^{2+} -Imaging-Methoden hier nur eine indirekte Korrelation zu der Aktivität der TRPC6-Kanäle messen und die Ergebnisse eventuell zusätzlich durch die Aktivität spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle verzerrt werden.

In den Experimenten dieser Arbeit konnten die Verbindungen 2-APB, BCTC, TC-I 2014 und SAR 7334 die TRPC6-induzierte Signalkaskade hemmen. Diese Substanzen waren bereits als Hemmstoffe anderer TRP-Kanäle bekannt [4,31,48,58].

Eine weitere hier untersuchte Verbindung war RQ-00203078, von der bekannt ist, dass sie eine hohe Selektivität gegenüber dem TRPM8-Kanal aufweist [48]. In meinen Experimenten zeigte sich, dass RQ-00203078 die TRPC6-induzierte Signalkaskade nicht hemmen konnte.

Der Effekt von 2-APB auf verschiedene TRP-Kanäle ist unterschiedlich: Es wurde gezeigt, dass 2-APB TRPM2-, TRPM3-, TRPM8-, TRPC3- und TRPC5- Kanäle hemmt, jedoch als Aktivator für TRPV1-, TRPV2- und TRPV3-Kanäle fungiert [21,30,48,53,62]. Eine signifikante Hemmung von TRPV1- und TRPM8 konnte mit Patch-Clamp-Experimenten und auf dem Niveau der Genexpression durch eine Steigerung der AP-1-Aktivität demonstriert werden [21,48]. In Bezug auf TRPM3-Kanäle konnte neben einer signifikanten Inhibition, auch eine dosisabhängige toxische Wirkung von 2-APB auf die verwendeten Zellen bei einer Konzentration von $75 \mu\text{M}$ 2-APB festgestellt, was bei Insulinoma (INS-1 832/13)-Zellen auch beobachtet wurde [48,62]. Die toxische Wirkung von $75 \mu\text{M}$ 2-APB war bei den T6.11-Zellen, die für die Experimente dieser Arbeit verwendet wurden, nicht evident. Die Wirkung auf die Aktivität des TRPC6-Kanals wurde bisher nur im Rahmen von Patch-Clamp-Experimenten mit OAG und Carbachol als Agonisten nachgewiesen [21,62]. Die Experimente dieser Arbeit zeigen nun, dass 2-APB den hyperforininduzierten TRPC6-Signalweg hemmt und auch einen inhibitorischen Effekt auf die Genexpression vorweist. Die genannten Ergebnisse demonstrieren also, dass TRPC6 zu den zahlreiche Zielrezeptoren und -proteinen von 2-APB gehört.

BCTC ist bereits als breit wirkender TRP-Hemmstoff bekannt und konnte in vergangenen Experimenten TRPV1-, TRPV3- und TRPM8-induzierte Effekte hemmen [2,4,31,48,58].

Die hemmende Wirkung von BCTC auf die Menthol-induzierte TRPM8-Aktivität in HEK293-Zellen wurde zunächst durch Ca^{2+} -Assays gezeigt und war in den Folgejahren durch Patch-Clamp-Experimente, mit ratiometrischen Ca^{2+} -Messungen, sowie vor Kurzem durch lentivirale Experimente auch unter Stimulation mit Icillin nachweisbar [4,31,48].

Genauso war es möglich, mit BCTC die TRPM3- und die $\text{Ca}_v1.2$ -induzierte Signalkaskade zu hemmen [48]. Im Rahmen von Patch-Clamp-Experimenten wurden mit BCTC auch Ca^{2+} -Kanäle vom T-Typ (Ca_v3 -Kanäle) gehemmt [33,48]. Hier konnte mit BCTC auch die TRPC6-induzierte Signaltransduktion gehemmt werden. Damit wurde das breite Wirkspektrum von BCTC in Bezug auf TRP-Kanäle bestätigt.

Als TRPM8- und TRPM3-Kanal-Blocker wurde die Verbindung, TC-1 2014, identifiziert: Diese Verbindung konnte die Signaltransduktion von TRPM3 und TRPM8-Kanälen hemmen [48]. Darüber hinaus konnte die Signalkaskade, die nach Aktivierung des $Ca_v1.2$ -Kanals ausgelöst wird, ebenfalls durch TC-1 2014 inhibiert werden [48]. Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen, dass TC-1 2014 auch die Signalkaskade hemmt, die nach Stimulation des TRPC6-Kanals mit Hyperforin ausgelöst wird.

RQ-00203078 (RQ) wurde in der wissenschaftlichen Literatur als selektiver TRPM8-Hemmstoff beschrieben. Aufnahmen von Ganzzellströmen zeigten, dass RQ die menthol- und die durch den spezifischen TRPM8-Agonisten WS-12-induzierten Membranströme bei TRPM8-exprimierenden HSC3-Zellen hemmt und die durch Kühlung induzierte Stromerhöhung entlang der Membran umkehrt [36]. Bei mentholinduzierten Ca^{2+} -Influx-Assays zeigte RQ eine hohe TRPM8-Selektivität, eine hohe Wirkstärke, sowie eine hohe mittlere effektive Wirkkonzentration. Des Weiteren wurde im Icillin-induzierten Wet-Dog Shake Modell von Rattenzellen eine hohe orale Bioverfügbarkeit im Vergleich zu anderen getesteten TRPM8-Antagonisten festgestellt [35]. Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit von Thiel et al. [48] zeigte eine spezifische Inhibition der TRPM8-induzierten Signalkaskade durch RQ, während die Signaltransduktion nach Stimulation der TRPM3 und TRPV1-Kanäle nicht durch RQ beeinträchtigt wurde. Diese Verbindung konnte auch die Signaltransduktion des $Ca_v1.2$ -Kanals ändern [48]. In meinen Experimenten konnte ich keine Inhibition der TRPC6-induzierten Signalkaskade durch RQ-00203078 beobachten. Damit wird die Schlussfolgerung von Thiel et al. [48] bestätigt, nach der RQ-00203078 ein TRPM8-spezifischer Antagonist ist.

SAR 7334 ist ein (1R,2S)-Inden Oxid-Derivat, das durch die Bindung an die spannungssensible Domäne („voltage sensor like domain“) der Ca^{2+} -Bindungsstelle, die Ca^{2+} -Bindung an den TRPC6-Kanal blockiert [16]. Die Verbindung konnte bisher in Ca^{2+} -Imaging Experimenten die TRPC3-, TRPC6- und TRPC7-Kanäle induzierte Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration hemmen. Außerdem wurde der Effekt von SAR 7334 auf den OAG-induzierten Ionenstrom an TRPC6-exprimierenden Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen getestet. Die Versuche zeigten eine Hemmung der TRP-Kanal-induzierten Ca^{2+} -Erhöhungen mit einem IC_{50} -Wert von 7,9 nM [32]. In meinen Experimenten konnte die Verbindung SAR 7334 in einer Konzentration von 5 μ M die TRPC6-induzierte Signalkaskade hemmen. SAR 7334 hemmte ebenfalls die Signaltransduktion des TRPM3-Kanals [39], so dass es sich bei der Verbindung um einen Inhibitor der TRPC6 und TRPM3-Kanalproteine handelt.

4.1 Fazit

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Verbindungen auf die Signalkaskade des TRPC6-Kanals untersucht. Ich konnte zeigen, dass die Verbindungen 2-APB, BCTC, TC-I 2014 und SAR 7334 die Signalkaskade, die nach Stimulation des TRPC6-Kanals induziert wird, hemmen konnten. Die Verbindung RQ-00203078, die als Inhibitor des TRPM8-kanals beschrieben wurde, hatte hingegen keinen Effekt auf die Signaltransduktion von TRPC6.

Literaturverzeichnis

1. Angel P, Baumann I, Stein B, Delius H, Rahmsdorf HJ, Herrlich P (1987) 12-0-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetate Induction of the Human Collagenase Gene Is Mediated by an Inducible Enhancer Element Located in the 5'-Flanking Region. *Mol Cell Biol* 7:2256-2266.
2. Arcas JM, González A, Gers-Barlag K, González-González O, Bech F, Demirkhanyan L, Zakharian E, Belmonte C, Gomis A, Viana F (2019) The Immunosuppressant Macrolide Tacrolimus Activates Cold-Sensing TRPM8 Channels. *J Neurosci* 39:949-969.
3. Basora N, Boulay G, Bilodeau L, Rousseau E, Payet MD (2003) 20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid (20-HETE) Activates Mouse TRPC6 Channels Expressed in HEK293 Cells. *J Biol Chem* 278:31709–31716.
4. Behrendt HJ, 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.
5. Boulay G, Zhu Z, Peyton M, Jiang M, Hurst R, Stefani E, Birnbaumer L (1997) 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 Gq class of G protein. *J Biol Chem* 272:29672–29680.
6. Chen X, Souch G, Demaree IS, White FA, Obukhov AG (2020) Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) Channels: Then and Now. *Cells* 9:1983.
7. Chinigò G, Castel H, Chever O, Gkika D (2021) TRP Channels in Brain Tumors. *Front Cell Dev Biol* 9:617801.
8. Chung D, Kim Y-S, Phillips JN, Ulloa A, Ku C-Y, Galan HL, Sanborn BM (2010) Attenuation of Canonical Transient Receptor Potential-Like Channel 6 Expression Specifically Reduces the Diacylglycerol-Mediated Increase in Intracellular Calcium in Human Myometrial Cells. *Endocrinology* 151:406–416.
9. de Wet JR, Wood KV, DeLuca M, Helinski DR, Subramani S (1987) Firefly luciferase gene: Structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 7:725-737.
10. DGPPN, BÄK, KBV, AWMF (Hrsg.) für die Leitliniengruppe Unipolare Depression (2015) S3-Leitlinie/Nationale Versorgungs Leitlinie Unipolare Depression – Langfassung, 2. Aufl. 5. Ausg. https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/nvl-0051_S3_Unipolare_Depression_2017-05_abgelaufen.pdf [Zugriff: 2022-08-23]

11. Dietrich A, Gudermann T (2014) TRPC6: Physiological Function and Pathophysiological Relevance. In: Nilius B, Flockerzi V (Hrsg) Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels: Volume I. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 157–188
12. Fuchs B, Rupp M, Ghofrani HA, Schermuly RT, Seeger W, Grimminger F, Gudermann T, Dietrich A, Weissmann N (2011) Diacylglycerol regulates acute hypoxic pulmonary vasoconstriction via TRPC6. *Respir Res* 12:20.
13. Gao Y-Y, Tian W, Zhang H-N, Sun Y, Meng J-R, Cao W, Li X-Q (2021) Canonical transient receptor potential channels and their modulators: biology, pharmacology and therapeutic potentials. *Arch Pharm Res* 44:354–377.
14. Gibon J, Tu P, Bohic S, Richaud P, Arnaud J, Zhu M, Boulay G, Bouron A (2011) The over-expression of TRPC6 channels in HEK-293 cells favour the intracellular accumulation of zinc. *Biochim Biophys Acta* 1808:2807–2818.
15. Graham S, Ding M, Ding, Y., Sours-Brothers S, Luchowski R, Gryczynski Z, Yorio T, Ma H, Ma R (2010) Canonical transient receptor potential 6 (TRPC6), a redox-regulated cation channel. *J Biol Chem* 285:23466–23476.
16. Guo W, Tang Q, Wei M, Kang Y, Wu J-X, Chen L (2022) Structural mechanism of human TRPC3 and TRPC6 channel regulation by their intracellular calcium-binding sites. *Neuron* 110:1023-1035.
17. Halazonetis TD., Georgopoulos, K., Greenberg, ME and Leder, P (1988) c-jun dimerizes with itself and with c-fos, forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell* 55:917-924.
18. Heinrich PC, Müller M, Graeve L (2014) Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, 9. Aufl. Springer-Lehrbuch. Springer, Berlin
19. Heiser JH, Schuwald AM, Sillani G, Ye L, Müller WE, Leuner K (2013) TRPC6 channel-mediated neurite outgrowth in PC12 cells and hippocampal neurons involves activation of RAS/MEK/ERK, PI3K, and CAMKIV signaling. *J Neurochem* 127:303–313.
20. Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G (1999) Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 397:259-263.
21. Hu H-Z, Gu Q, Wang C, Colton CK, Tang J, Kinoshita-Kawada M, Lee L-Y, Wood JD, Zhu MX (2004) 2-Aminoethoxydiphenyl Borate Is a Common Activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3. *J Biol Chem* 279:35741–35748.
22. Karin M, Liu Z-g, Zandi E (1997) AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9:240-246.

23. Krylov D, Vinson CR (2005) Leucine Zipper. In: John Wiley & Sons L (Hrsg) Encyclopedia of life sciences. John Wiley & Sons, London, New York
24. Kuhlmann M, Nellen W (2004) Gen, sei still! RNAinterferenz. *Biologie in unserer Zeit* 34:142-150.
25. Leppä S, Bohmann D (1999) Diverse functions of JNK signaling and c-Jun in stress response and apoptosis. *Oncogene* 18:6158-6162.
26. Leuner K, Kazanski V, Müller M, Essin K, Henke B, Gollasch M, Harteneck C, Müller WE (2007) Hyperforin—a key constituent of St. John’s wort specifically activates TRPC6 channels. *FASEB J* 21:4101-4111.
27. Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song J-J, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ (2004) Argonaute2 Is the Catalytic Engine of Mammalian RNAi. *Science* 305:1437-1441.
28. Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D (2002) Germline Transmission and Tissue-Specific Expression of Transgenes Delivered by Lentiviral Vectors. *Science* 292:268-271.
29. Lopez-Bergami P, Lau E, Roani Z (2010) Emerging roles of ATF2 and the dynamic AP1 network in cancer. *Nat Rev Cancer* 10:65-76.
30. Ma H, Venkatachalam K, Parys JB, Gill DL (2002) Modification of Store-operated Channel Coupling and Inositol Trisphosphate Receptor Function by 2-Aminoethoxydiphenyl Borate in DT40 Lymphocytes. *J Biol Chem* 277:6915-6922.
31. Madrid R, Donovan-Rodríguez T, Meseguer V, Acosta MC, Belmonte C, Viana F (2006) Contribution of TRPM8 Channels to Cold Transduction in Primary Sensory Neurons and Peripheral Nerve Terminals. *J Neurosci* 26:12512-12525.
32. Maier T, Follmann M, Hessler G, Kleemann H-W, Hachtel S, Fuchs B, Weissmann N, Linz W, Schmidt T, Löhn M, Schroeter K, Wang L, Rütten H, Strübing C (2015) Discovery and pharmacological characterization of a novel potent inhibitor of diacylglycerol-sensitive TRPC cation channels. *Br. J. Pharmacol* 172:3650–3660.
33. McArthur JR, Finol-Urdaneta RK, Adams DJ (2019) Analgesic transient receptor potential vanilloid-1-active compounds inhibit native and recombinant T-type calcium channels. *Br J Pharmacol* 176:2264-2278.
34. Monet M, Francoeur N, Boulay G (2012) Involvement of Phosphoinositide 3-Kinase and PTEN Protein in Mechanism of Activation of TRPC6 Protein in Vascular Smooth Muscle Cells. *J Biol Chem* 287:17672–17681.

35. 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. *Bioorg Med Chem Lett* 24:5364–5368.
36. 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.
37. Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja J, Rooney DL, Zhang M, Ibrigg MM, McManus MT, Gertler FB, Scott ML, Van Parijs L (2003) A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* 33:401-406.
38. Samapati R, Yang Y, Yin J, Stoerger C, Arenz C, Dietrich A, Gudermann T, Adam D, Wu S, Freichel M, Flockerzi V, Uhlig S, Kuebler WM (2012) Lung endothelial Ca²⁺ and permeability response to platelet-activating factor is mediated by acid sphingomyelinase and transient receptor potential classical 6. *Am. J. Respir Crit Care Med* 185:160–170.
39. Scheuble J, Rössler OG, Ulrich M, Thiel G (2020) Pharmacological and genetic inhibition of TRPC6-induced gene transcription. *Eur J Pharmacol* 886:173357.
40. Sell T, Belkacemi T, Flockerzi V, Beck A (2014) Protonophore properties of hyperforin are essential for its pharmacological activity. *Sci Rep* 4:7500.
41. Shaulian E, Karin M (2002) AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 4:131-136.
42. Shekhar S, Liu Y, Wang S, Zhang H, Fang X, Zhang J, Fan L, Zheng B, Roman RJ, Wang Z, Fan F, Booz GW (2021) Novel Mechanistic Insights and Potential Therapeutic Impact of TRPC6 in Neurovascular Coupling and Ischemic Stroke. *Int J Mol Sci* 22:2074.
43. Sirven A, Pflumio F, Zennou V, Titeux M, Vainchenker W, Coulombel L, Dubart, Kupperschmitt A, 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.
44. Soboloff J, Spassova M, Xu W, He L-P, Cuesta N, Gill DL (2005) Role of Endogenous TRPC6 Channels in Ca²⁺Signal Generation in A7r5 Smooth Muscle Cells. *J Biol Chem* 280:39786–39794.
45. Soni H, Abebiyi A (2016) TRPC6 channel activation promotes neonatal glomerular mesangial cell apoptosis via calcineurin/NFAT and FasL/Fas signaling pathways. *Sci Rep* 6:29041.

46. Steinmüller L, Cibelli G, Moll JR, Vinson C, Thiel G (2001) Regulation and composition of activator protein 1 (AP-1) transcription factors controlling collagenase and c-Jun promoter activities. *Biochem J* 360:599–607.
47. Takahashi N, Koazi D, Mori Yasuo (2012) TRP channels: sensors and transducers of gasotransmitter signals. *Front. Physio.* 3:324.
48. Thiel G, Backes TM, Welck J, Steinhausen S, Fischer A-L, Langermann DS, Ulrich M, Wissenbach U, Rössler OG (2019) Pharmacological inhibition of TRPM8-induced gene transcription. *Biochem Pharmacol* 170:113678.
49. Thiel G, Lesch A, Keim A (2012) Transcriptional Response to Calcium-Sensing Receptor Stimulation. *Endocrinology* 153:4716–4728.
50. Thiel G, Rössler OG (2007) Wie aus einem Retrovirus ein Gentransfer-Vektor entsteht: Viren als Werkzeuge der Gentherapie. *Biologie in unserer Zeit* 37:241-248.
51. Thiel G, Rössler OG (2011) Immediate-Early Transcriptional Response to Angiotensin II in Human Adrenocortical Cells. *Endocrinology* 152:4716-4728.
52. Thiel G, Rössler OG (2017) Hyperforin activates gene transcription involving transient receptor potential C6 channels. *Biochem Pharmacol* 129:96-107.
53. Togashi K, Inada H, Tominaga M (2008) Inhibition of the transient receptor potential cation channel TRPM2 by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). *Br J Pharmacol* 153:1324–1330.
54. Tu P, Kunert-Keil C, Lucke S, Brinkmeier H, Bouron A (2009) Diacylglycerol analogues activate second messenger-operated calcium channels exhibiting TRPC-like properties in cortical neurons. *J Neurochem* 108:126-138.
55. Uder S, George H, Boedeker B (2022) MISSION™ shRNA Library: Next Generation RNA Interference.
56. Wang L, Chang JH, Buckley AF, Spurney RF (2019) Knockout of TRPC6 promotes insulin resistance and exacerbates glomerular injury in Akita mice. *Kidney Int* 95:321–332.
57. Wang J, Lu R, Yang J, Li H, He Z, Jing N, Wang X, Wang Y (2015) TRPC6 specifically interacts with APP to inhibit its cleavage by γ -secretase and reduce A β production. *Nat Commun* 6:8876.
58. Weil A, Moore SE, Waite NJ, Randall A, Gunthorpe MJ (2005) Conservation of Functional and Pharmacological Properties in the Distantly Related Temperature Sensors TRPV1 and TRPM8. *Mol Pharmacol* 68: 518-527.

59. Weissmann N, Dietrich A, Fuchs B, Kalwa H, Ay M, Dumitrascu R, Olschewski A, Storch U, Mederos y Schnitzler M, Ghofrani HA, Schermuly RT, Pinkenburg O, Seeger W, Grimminger F, Gudermann T (2006) Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and aveolar gas exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:19093–19098.
60. Whitmarsh AJ, Davis RJ (1996) Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med* 74:589-607.
61. Wu Y-L, Xie J, An S-W, Oliver N, Barrezeuta NX, Lin M-H, Birnbaumer L, Huang C-L (2016) Inhibition of TRPC6 channels ameliorates renal fibrosis and contributes to renal protection by soluble klotho. *Kidney Int* 91:830-841.
62. Xu S-Z, Zeng F, Boulay G, Grimm C, Harteneck C, Beech DJ (2005) Block of TRPC5 channels by 2-aminoethoxydiphenyl borate: a differential, extracellular and voltage-dependent effect. *Br J Pharmacol* 145:405–414.
63. Zheng W, Wu F, Fu K, Sun G, Sun G, Li X, Jiang W, Cao H, Wang H, Tang W (2021) Emerging Mechanisms and Treatment Progress on Liver Metastasis of Colorectal Cancer. *OncoTargets and Ther* 14:3013–3036.
64. Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TD (1999) Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* 73:2886-92.

Publikationen

Julia Scheuble, Oliver G. Rössler, Myriam Ulrich, Gerald Thiel (2020) Pharmacological and genetic inhibition of TRPC6-induced gene transcription. *European Journal of Pharmacology*, 886: 173357

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Fertigstellung meiner Promotion unterstützt haben.

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Thiel, der mir die Möglichkeit gegeben hat, bei ihm zu promovieren. Durch seine engagierte Betreuung und seine stete Offenheit für Rückfragen habe ich mich sehr gut aufgehoben gefühlt.

Darüber hinaus möchte ich mich gern bei meinen Labor-KollegInnen bedanken: Maximilian Backes danke ich für seine Unterstützung bei Problemen und Fragen und natürlich die gelegentliche Machete für das Gedankendickicht. Genauso danke ich Daniel Langfermann für seine Unterstützung rund um Fragen und Problemen im Labor. Oliver Rössler danke ich für die hilfreichen Erklärungen rund um die Statistik und die unterhaltsamen Gespräche. Vielen Dank an Iris Dlugosch, das Mastermind der AG, ohne die wahrscheinlich jeder Termin und Geburtstag vergessen worden wäre. Es war wirklich eine wunderbare Zeit mit Euch und ich werde mich immer mit einem Schmunzeln an meine Zeit in der AG zurückerinnern.

Vielen Dank auch an meine Familie und Freunde, die mich durch diese Zeit begleitet haben, die mir vor allem Ruhe und Geduld geschenkt haben. Dank gilt meinen Eltern, Bożena und Lothar Scheuble, ohne die ich nicht dort stehen würde, wo ich jetzt bin. Wielkie podziękowania dla moich dziadków, Helena i Dr. Ludwik Mikołajczyk, że zawsze mogę na was liczyć, nawet z odległości 1200 kilometrów. Vielen Dank an meine Freunde, die mir immer den Kopf nach dem Promotionsstress wieder freigemacht und mich geerdet haben. Danke Olga und Tabea, die die Höhen und Tiefen meiner Doktorarbeit mitgemacht haben, das kollektive Aufregen hat geholfen. Danke an Tim, den besten Mitbewohner, der mir mit unerschütterlichem Pragmatismus zur Seite stand. Und vor allem Danke an Gil, der die beeindruckende Fähigkeit besitzt mit zusammengebissenen Zähnen Händchen zu halten.

Vielen Dank für Alles.

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