

Aus dem Bereich Medizinische Biochemie und Molekularbiologie

Theoretische Medizin und Biowissenschaften

Der Medizinischen Fakultät

Der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Signaltransduktion und Genregulation: Analyse der
Pharmakologie und Signaltransduktion des Capsaicin-
Rezeptors TRPV1 und der biologischen Funktion der
Stimulus-responsiven Transkriptionsfaktoren Elk-1 und
AP-1 in pankreatischen β -Zellen**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der

Naturwissenschaften

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes

Homburg/Saar

2023



Vorgelegt von

Tobias Maximilian Backes

Geboren am 10.07.1989 in St. Wendel

Tag des Kolloquiums: 01.03.2024
Dekan: Prof. Dr. M. D. Menger
Berichterstatter: Prof. Dr. G. Thiel
Prof. Dr. F. Schmitz
PD Dr. Emmanuel Ampofo,
Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Barbara Anne Niemeyer-Hoth
Akademische Mitarbeiter:

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel verfasst habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe dieser gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Tobias Maximilian Backes

**„Der Fortgang der wissenschaftlichen
Entwicklung ist im Endeffekt eine ständige
Flucht vor dem Staunen“**

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

Erklärung.....	1
Abkürzungsverzeichnis	10
Zusammenfassung.....	13
Summary	14
1. Einleitung.....	15
1.1. Signaltransduktion	15
1.2. Die “transient receptor potential” (TRP)-Kanäle.....	15
1.2.1. Der Capsaicin-Rezeptor TRPV1.....	17
1.3. Second Messengers.....	18
1.3.1. Proteinkinasen als „Signaltransducer“	19
1.3.2. Stimulus-responsive Transkriptionsfaktoren	20
1.3.2.1. Der Transkriptionsfaktor-Komplex „activator protein-1“ (AP-1)	21
1.3.2.2. Der „Ternary Complex Factor“ (TCF) und das “Serum-Response Element” (SRE)....	22
1.4. Signaltransduktion in der β -Zelle	22
1.4.1. Stimulus-responsive Transkriptionsfaktoren in β -Zellen des Pankreas	24
2. Fragestellung der Arbeit	25
3. Material und Methoden	26
3.1. Material	26
3.1.1. Chemikalien	26
3.1.2. Verwendete Antikörper	29
3.1.3. Verwendete Verbrauchsgüter	29
3.1.4. Verwendete Laborgeräte	31
3.1.5. Verwendeten Enzyme und Nukleotide.....	32
3.1.6. Verwendete Zelllinien	32
3.1.6.1. H2C1 Zellen.....	32
3.1.6.2. HEK293-TN.....	33
3.1.6.3. HEK293/T17	33

3.1.6.4.	HEK293 Δ BRAF:ER	33
3.1.6.5.	INS-1 832/13.....	33
3.1.6.6.	INS-1 Δ BRAF:ER.....	33
3.1.7.	Plasmide und Vektoren	34
3.1.7.1.	Verpackungsplasmid Δ 8.91	34
3.1.7.2.	Expressionsplasmid pCMV-G.....	34
3.1.7.3.	Lentivirale Transfervektoren	35
3.2.	Methoden.....	36
3.2.1.	Zellkultur	36
3.2.1.1.	Zellkulturmedium der HEK293/T17-, HEK293-TN- und H2C1-Zelllinien	37
3.2.1.2.	Zellkulturmedium der INS-1 832/13- und INS-1 Δ BRAF:ER-Zelllinien	37
3.2.1.3.	Passage von Säugerzellen.....	38
3.2.1.3.1.	Passage der HEK293/T17-, HEK293-TN- und H2C1-Zelllinien	38
3.2.1.3.2.	Passage der INS-1 832/13- und INS-1 Δ BRAF:ER-Zelllinien.....	38
3.2.1.4.	Kryokonservierung und Auftauen von Säugerzellen.....	39
3.2.1.5.	Lentivirale Infektion von Säugerzellen	39
3.2.1.5.1.	Lentivirales System	39
3.2.1.5.2.	Generierung von Lentiviren.....	40
3.2.1.5.3.	Infektion von Säugerzelllinien.....	41
3.2.1.6.	RNA-Interferenz.....	42
3.2.1.7.	Stimulation und Inhibition von Säugerzelllinien	45
3.2.1.8.	Reportergenanalyse	46
3.2.1.8.1.	Gewinnung und Aufschluss der zellulären Proben	46
3.2.1.8.2.	Luziferase-Assay	46
3.2.1.8.3.	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchonin-säure Assay (BCA) ...	47
3.2.1.8.4.	Relative Luziferase Aktivität.....	48
3.3.	Proteinbiochemische Methoden.....	48
3.3.1.	MTT-Assay	48
3.3.2.	Caspase 3/7-Assay	49

3.3.3.	Western Blot	50
3.3.3.1.	Aufschluss von Zellen zur Western Blot Analyse	50
3.3.3.2.	SDS-Gel	51
3.3.3.3.	Das Tank-Blot Verfahren zur Proteinauftrennung	52
3.3.3.4.	Proteinnachweis mittels Antikörper	53
3.3.4.	Bestimmung der zytoplasmatischen Calcium-Ionen-Konzentration mittels Fura-2....	54
3.3.5.	Gewinnung von RNA und reverse Transkription	54
3.3.5.1.	Erststrang cDNA-Synthese (RT-PCR).....	54
3.3.6.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	55
3.3.7.	Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA	57
3.4.	Mausexperimente	58
3.4.1.	Regularien der durchgeführten Mausexperimente	58
3.4.2.	Das bakterielle Tetracyclin-Resistenz-System	59
3.4.3.	Das Tet-Expressionssystem	59
3.4.3.1.	Das reverse Tet-Expressions-System (Tet-On System)	60
3.4.4.	Transgene Mäuse.....	61
3.4.4.1.	Transgene [<i>tetO</i>] ₇ <i>REST/Elk-1ΔC</i> -Mäuse	61
3.4.4.2.	Transgene [<i>tetO</i>] ₇ A-Fos-Mäuse	61
3.4.5.	Generierung doppelt transgener Mäuse	62
3.4.6.	Genotypisierung transgener Mäuse	63
3.4.6.1.	Polymerase Kettenreaktion (PCR) der Gewebeproben	63
3.4.7.	Operative Gewinnung und Isolierung von pankreatischen Inseln aus Mäusen	64
3.4.8.	Intraperitonealer Glukosetolleranztest	65
3.4.9.	Histologie.....	65
3.4.9.1.	Apoptose-Nachweis mittels Antikörperfärbung von Gewebsschnitten	65
3.4.9.2.	Morphometrie von β -Zellen des Pankreas	66
3.5.	Statistik und Abbildungen.....	67
4.	Ergebnisse	68
4.1.	Pharmakologie und Signaltransduktion des „Transient receptor potential vanilloid 1“(TRPV1)-Kanals.....	68

4.1.1.	Die H2C1-Zelllinie exprimiert den TRPV1-Kanal.....	68
4.1.2.	Zeitabhängige Induzierbarkeit der AP-1 Aktivität durch Stimulation des TRPV1-Kanals mit Capsaicin	69
4.1.3.	Die TRPV1-Liganden Resiniferatoxin (RTX) und N-Arachidonoyldopamin (NADA)....	70
4.1.3.1.	Die Stimulation von TRPV1 durch Resiniferatoxin (RTX) erhöht die Aktivität des AP-1 Transkriptionsfaktor-Komplexes	71
4.1.3.2.	Die Stimulation von TRPV1 durch N-Arachidonoyldopamin (NADA) aktiviert AP-1 ...	72
4.1.4.	Die Rolle des TRPV1-Kanals und G _{αq} -gekoppelter Rezeptoren in der Capsaicin, NADA und RTX induzierten Aktivierung des AP-1 Transkriptionsfaktors	73
4.1.4.1.	Der TRPV1-Kanal ist essenziell für die Induktion der AP-1 Aktivität nach Stimulation der H2C1-Zellen mit Capsaicin, RTX oder NADA.....	73
4.1.4.2.	Die Aktivierung von AP-1 durch Capsaicin oder NADA ist unabhängig von G _{αq} -gekoppelten Rezeptoren.....	75
4.1.5.	Die TRPV1-vermittelte Signaltransduktion	76
4.1.5.1.	Die gesteigerte Aktivierung des AP-1 Transkriptionsfaktors nach Stimulation von TRPV1-Kanälen durch Capsaicin, RTX oder NADA ist abhängig vom Ca ²⁺ -Einstrom in die Zelle	76
4.1.5.2.	Der ERK1/2-Signalweg verbindet die Stimulation des TRPV1-Kanals mit der gesteigerten AP-1 Aktivität in Capsaicin stimulierten H2C1-Zellen	79
4.1.5.3.	c-Jun ist Teil des AP-1-Komplexes nach Stimulation von H2C1-Zellen mit Capsaicin	80
4.1.5.4.	c-Fos ist Teil des induzierten AP-1-Komplexes in mit Capsaicin stimulierten H2C1-Zellen	80
4.1.6.	Die gesteigerte Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 ist nicht die Folge einer verringerten Zellviabilität, oxidativem Stress oder der Induktion von Apoptose	82
4.1.6.1.	Die Aktivierung von AP-1 durch die Stimulation von TRPV1 führt nicht zu einer verringerten Zellviabilität.....	82
4.1.6.2.	Die Aktivierung des AP-1 Transkriptionsfaktors durch die Stimulation des TRPV1-Kanals mit Capsaicin, NADA oder RTX führt zu keiner erhöhten Caspase 3/7-Aktivität	83
4.1.6.3.	Die Aktivierung von AP-1 ist nicht die Folge von chemisch induziertem oder oxidativem Stress.....	84
4.1.7.	Pharmakologische Untersuchung des TRPV1-Kanals	85
4.1.7.1.	Der TRPV1-Antagonist AMG9810 verhindert die Aktivierung des AP-1 Transkriptionsfaktors nach Stimulation von TRPV1 mit Capsaicin	86
4.1.7.2.	Der MAP-Kinase-Kinase-Inhibitor PD98059 reduziert die AP-1 Aktivität nach Stimulation von H2C1-Zellen mit Capsaicin.....	87
4.1.7.3.	2-Aminoethoxydiphenyl-Borat (2-APB) kann AP-1 aktivieren oder nach Stimulation mit Capsaicin inhibieren.....	88

4.1.7.4.	Clotrimazol hat keinen Effekt auf die Aktivierung des AP-1 Transkriptionsfaktors in Capsaicin-stimulierten H2C1-Zellen.....	89
4.1.7.5.	Der TRPV1-Antagonist BCTC führt zu einer geringeren Induktion der AP-1-Aktivität nach Stimulation von H2C1-Zellen mit Capsaicin	90
4.1.7.6.	Das Sexualhormon Progesteron hat einen inhibitorischen Effekt auf die AP-1-Aktivität nach Stimulation von H2C1-Zellen mit Capsaicin	91
4.1.7.7.	Pregnenolon wirkt inhibitorisch auf die AP-1-Aktivität, nach der Stimulation von TRPV1 mit Capsaicin	92
4.2.	Stimulus-responsive Transkriptionsfaktoren in Insulinomazellen und pankreatischen β -Zellen	94
4.2.1.	Der Transkriptionsfaktor AP-1 und seine Bedeutung in der Regulation der Glukosehomöostase	94
4.2.1.1.	Die Expression von A-Fos in INS-1 832/13-Zellen verhindert die Aktivierung des AP-1 Transkriptionsfaktors über Cav1.2.....	95
4.2.1.2.	Die dominant negative Mutante A-Fos hat keinen Einfluss auf die Caspase 3/7-Aktivität in KCI/FPL stimulierten INS-1 832/13-Zellen	96
4.2.1.3.	Die Stimulation von INS-1 832/13-Zellen mit KCI und FPL64176 führt zu einer verstärkten Aktivierung des c-Jun Promotors.....	97
4.2.1.4.	Die Expression der dominant negativen Mutante c-Jun Δ N unterdrückt die Aktivierung von AP-1 in INS-1 832/13-Zellen nach Stimulation des Cav1.2-Kanals.....	99
4.2.1.5.	Die pharmakologische Inhibition der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) führt zu einer geringeren AP-1-Aktivierung nach Stimulation der INS-1 832/13-Zellen mit KCI/FPL64176.....	100
4.2.2.	Die transgene Maus [tetO] ₇ A-Fos.....	101
4.2.2.1.	Generierung der doppelt transgenen Mauslinie RIP-rtTA[tetO] ₇ A-Fos	101
4.2.2.2.	Die Expression der dominant negativen Mutante A-Fos in β -Zellen des Pankreas führt zu einer signifikanten Reduktion der Glukosetoleranz.....	102
4.2.2.3.	Die Expression von A-Fos führt nicht zu kleineren β -Zellen	104
4.2.3.	Der „ternary complex factor“ Elk-1 und seine Rolle in pankreatischen β -Zellen	105
4.2.3.1.	Generierung der doppelt transgenen Mauslinie RIP-rtTA[tetO] ₇ -REST/Elk-1 Δ C	106
4.2.3.2.	Die Expression der dominant negativen Mutante REST/Elk-1 Δ C in β -Zellen führt zu einer signifikanten Reduktion der Glukosetoleranz	108
4.2.4.	Ternäre Komplex Faktoren regulieren die Größe von pankreatischen Inseln	110
4.2.5.	Die Expression von REST/Elk-1 Δ C induziert Apoptose in der INS-1 832/13-Zelllinie	111
4.2.6.	Die Expression von REST/Elk-1 Δ C induziert Apoptose im Pankreas transgener RIP-rtTA[tetO] ₇ -REST/Elk-1 Δ C-Mäuse	112
5.	Diskussion.....	114
5.1.	Signaltransduktion des TRPV1-Kanals.....	114

5.1.1.	Die Rolle von TRPV1 im Organismus als schmerz-detektierender Rezeptor	114
5.1.2.	N-Arachidonoyldopamin (NADA) und Resiniferatoxin (RTX) aktivierten AP-1 via TRPV1	116
5.1.3.	Der Einfluss von Capsaicin, RTX oder NADA auf den Einstrom von Calcium-Ionen über den TRPV1-Kanal.....	118
5.1.4.	Der TRPV1-Kanal und die Regulation der Apoptose	119
5.1.5.	Die „Mitogen Activated Protein Kinase“ ERK und ihre Rolle in der TRPV1 induzierten Transkriptionsänderung	119
5.1.6.	Der TRPV1-Kanal und seine regulatorische Wirkung auf die Transkriptionsmaschinerie	120
5.1.7.	Die Bedeutung der Transkriptionsfaktoren c-Jun und c-Fos für den stimulierten TRPV1-Kanal.....	120
5.1.8.	Die Pharmakologie des TRPV1-Kanals	123
5.2.	Der TRPV1-Kanal und seine Assoziation mit der Insulinsekretion	124
5.2.1.	Die Rolle von AP-1 in der Glukosehomöostase und der Regulation der Pankreas-Entwicklung	125
5.2.2.	Die Regulation der Glukosehomöostase und der Inselgröße durch „Ternary complex factors“ im Mausmodell.....	126
6.	Literaturverzeichnis.....	128
7.	Publikationen	143
8.	Kongresse	145
8.1.	Poster	145
8.2.	Vortrag.....	145
9.	Danksagung	146
10.	Publikations-Auswahl	147
11.	Lebenslauf.....	176

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
.luc	Luziferase
°C	Grad Celsius
2-APB	2-Aminoethyl-diphenylborinat
4-OHT	4-Hydroxytamoxifen
Abb.	Abbildung
AP-1	Aktivator Protein-1
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicin Chinonsäure-Assay
BCTC	4-(3-Chloro-2-pyridinyl)-N-[4-(1,1-dimethylethyl)phenyl]-1-piperazinecarboxamide
BSA	Bovines Serum Albumin
bZIP	Basic region leucin zipper
bzw.	Beziehungsweise
C-Terminus	Carboxy Terminus
Ca ²⁺	Calcium-Ion
Cap	Capsaicin
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
CMV	Cytomegalovirus
CNO	Clozapine-N-Oxide
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
Coll.	Kollagenase
dd	Doppelt destilliert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
Dox	Doxyzyklin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor

EGFP	Enhanced green fluorescent protein
Egr-1	Early growth response factor 1
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
EtOH	Ethanol
FCS	Fetal calf serum
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HBSS	Hank's balanced salt solution
HDAC	Histondeacetylase
HEPES	(4-(2-hydroxyethyl)-1- piperazineethanesulfonic acid)
HIV	Humanes Immunodefizienz Virus
IPGTT	Intraperitonealer Glukosetoleranztest
JNK	C-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
l	Liter
LTR	Long terminal repeat
M	Molar
mA	Milliampere
MgSO ₄ 7xH ₂ O	Magnesiumsulfat-heptahydrat
mg	Milligramm
(MgCO ₃) ₄ Mg(OH) ₂ 5 x H ₂ O	Helles Magnesia
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
n.s	Nicht signifikant
NaCl	Natriumchlorid
NADA	N-Arachidonoyldopamine
PCR	Polymerase chain reaction
Preg	Pregnenolon

Prog	Progesteron
REST	RE1-silencing transcription factor
RIP	Rat insulin II promoter
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Revolutions per minute
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RTX	Resiniferatoxin
SDS	Sodium dodecyl sulfate
s.h.	Siehe
SRE	Serum-response element
SV 40	Simian Virus 40
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline + Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat
TRE	TPA responsive Element
TRP	Transient receptor potential
u.a.	Unter anderem
WPRE	Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element
WT	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel
µg	Mikrogramm

Zusammenfassung

Für die Funktion von komplexen Organismen ist eine fein abgestimmte Kommunikation auf zellulärer Ebene unabdingbar. So dienen extrazelluläre Signalmoleküle wie Hormone als Sender und Rezeptoren und spezialisierte Kanalproteine als Empfänger. Aus dem Bereich der Signaltransduktion werden in dieser Arbeit zwei Aspekte beschrieben. Zum einen wurde die intrazelluläre Signalkaskade aufgeklärt, die durch die Stimulation des Capsaicin-Rezeptors TRPV1 initiiert wird. Zum anderen wurden die Funktionen der Stimulus-responsiven Transkriptionsfaktoren AP-1 und Elk-1 in pankreatischen β -Zellen transgener Tiermodelle charakterisiert.

Die Regulation der Genexpressionen kann durch intrazelluläre Signalkaskaden gesteuert werden. Das Aktivieren dieser Signalkaskaden bedarf bestimmter Signalmoleküle, die in der Lage sind an spezifische Rezeptoren zu binden, wie beispielsweise die pflanzliche Verbindung Capsaicin, die in der Plasmamembran von Spinalganglien an den Capsaicin-Rezeptor/TRPV1 bindet. Im peripheren Nervensystem kommt TRPV1 eine zentrale Rolle in der Wahrnehmung schmerzhafter Reize zu. In dieser Arbeit wurde die Signalkaskade untersucht, die nach der Stimulation des TRPV1-Kanals angeschaltet wird und zu einer Transkription führt. Die Ergebnisse zeigen, dass die TRPV1-Liganden Capsaicin, Resiniferatoxin und N-Arachydonoyldopamin zu einer Aktivierung der Proteinkinase „extracellular signal-regulated protein kinase“ (ERK1/2) führten. Nach der Aktivierung von ERK1/2 kam es zur Induktion der Transkriptionsfaktoren Elk-1 und c-Jun. Infolgedessen wurde das Aktivator-Protein-1 (AP-1) aktiviert, einem wichtigen Regulator von Proliferation und Differenzierung innerhalb einer Zelle.

In einer zweiten Studie wurden die Funktionen der Stimulus-responsiven Transkriptionsfaktoren AP-1 und Elk-1 in den β -Zellen des Pankreas näher untersucht. Sowohl AP-1, als auch Elk-1 werden durch die Stimulation mit Glucose aktiviert. Hierzu wurden transgene Mäuse generiert, in denen gezielt und regulierbar die transkriptionelle Aktivität von AP-1 bzw. Elk-1 in pankreatischen β -Zellen blockiert werden konnte. Dabei ergab die Hemmung von AP-1 bzw. Elk-1 eine signifikante Reduktion in der Glukosetoleranz der transgenen Mäuse. Die Hemmung von Elk-1 führte zu einer signifikanten Reduktion der Inselgröße. Eine Hemmung der AP-1 Aktivität hatte keinen Einfluss auf die Größe der pankreatischen Inseln, wodurch die Glukoseintoleranz hier eine andere Ursache haben muss. Die Zusammenfassung der Daten führt zu dem Schluss, dass die Aktivitäten von AP-1 und Elk-1 in den β -Zellen des Pankreas, wichtig sind in der Regulation der Glukosehomöostase.

Summary

A fine organized communication on the cellular level is inevitable for the function of a cell. Extracellular signal molecules bind to receptors that function as receivers for those signals and transduce the encoded information to the cells. In this thesis, two signaling transduction studies are described. The first study clarified the induced intracellular signaling cascade after the stimulation of TRPV1. The second study focused on the role of the stimulus responsive transcription factors AP-1 and Elk-1 in pancreatic β -cells.

The regulation of gene expression can be regulated by a great variety of different intracellular signaling cascades. To activate a signaling cascade a specified signaling molecule must bind to its defined receptor, for example the plant derived compound capsaicin must bind to its so-called capsaicin receptor/TRPV1 channel that is located in the plasma membrane of dorsal root ganglia. TRPV1 plays a central role in the detection of pain in the peripheral nervous system.

The signaling cascade induced after the stimulation of TRPV1 was investigated. The results display that the TRPV1 ligands capsaicin, resiniferatoxin and N-Arachidonoyldopamine induced the activation of the protein kinase “extracellular signal-regulated protein kinase” (ERK1/2). Activation of ERK1/2 lead to the activation of the transcription factors Elk-1 and c-Jun. Therefore, the “activator protein-1” (AP-1), a prominent regulator of proliferation and differentiation in the cell, was activated.

The second study addressed the significance of the stimulus-responsive transcription factors AP-1 and Elk-1 in pancreatic β -cells. Elk-1 as well as AP-1 are induced in order of the stimulation of β -cells by glucose. Transgenic mice were generated to investigate impaired activity of AP-1 and Elk-1 in a specific and regulatable manner. The impairment of AP-1 and Elk-1 resulted in a significant reduction in glucose tolerance. The inhibition of Elk-1 led to a significant reduction in islet size, indicating that Elk-1 is required for the generation of pancreatic islets of proper size. Impairing the activity of AP-1 led to no altered islet size, indicating that other molecular mechanisms are involved in the AP-1 regulated glucose homeostasis. Thus, the activity of Elk-1 and AP-1 in the β -cells of the pancreas was essential for their physiological function.

1. Einleitung

1.1. Signaltransduktion

In eukaryotischen Organismen liegen Zellen selten isoliert vor. In der Regel bilden sie einen Verbund und stehen im ständigen Austausch miteinander. Um ihre Funktionalität aufrecht erhalten zu können, müssen sie auf eine Vielzahl unterschiedlicher endogener als auch exogener Reize reagieren. Rezeptoren stellen dabei das Bindeglied zwischen der Wahrnehmung von Signalmolekülen zu intrazellularen Signalkaskaden dar, die dann beispielsweise eine Änderung der Transkription bewirken können. So bindet der Insulinrezeptor Insulin und der EGF-Rezeptor das Mitogen „epidermal growth factor“ (EGF). Das Binden dieser Signalmoleküle führt bei den Rezeptoren zur einer Aktivierung in deren Folge eine definierte Signalkaskade in Gang gesetzt wird. So können beispielsweise Ca^{2+} -Ionen als „second messenger“ fungieren. Eine Zelle nimmt Signale aus der Umgebung aber nicht nur über Rezeptoren auf. Es gibt eine große Zahl unterschiedlichster Ionenkanäle, die nicht nur im Menschen zu finden sind, sondern im gesamten Tierreich. Oft weisen sie eine Selektivität für bestimmte Ionen auf. Sie können über Änderungen der Druckverhältnisse, Liganden oder wie der $\text{Ca}_v1.2$ „L-Type voltage-gated calcium channel“ über Spannungsänderungen an der Membran aktiviert werden, was zu einem Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle führt. Dieser Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in das Lumen einer Zelle führt zu einem Anstieg der Calcium-Ionen-Konzentration im Inneren der Zelle. In der Folge können dann Proteine wie Proteinkinasen, -phosphatasen oder Proteasen aktiviert werden. Am Ende vieler Signalkaskaden steht die Aktivierung stimulus-responsiver Transkriptionsfaktoren, welche diverse biologische Änderungen in der Zelle auslösen, z.B. Proliferation oder Zelltod. So vielfältig wie die Signale sind, die auf eine Zelle einwirken, so vielfältig können und müssen die zellulären Regelmechanismen zu deren Erkennung und Prozessierung sein. Nur so ist komplexes Leben überhaupt möglich.

1.2. Die “transient receptor potential” (TRP)-Kanäle

Eine menschliche Zelle kann 27 verschiedene „transient receptor potential“ (TRP)-Kanäle exprimieren. Diese TRP-Kanäle sind nicht-selektive Kationen-Kanäle, die zu 6 unterschiedlichen Untergruppen zusammengefasst werden können. Die Klassifizierung der TRP-Kanäle erfolgt über Sequenzhomologie, wobei die Untergruppen untereinander geringe Sequenz-Homologien aufweisen können. Allen TRP-Kanälen gemein ist deren Aufbau aus sechs Membran-durchspannenden Helices, die durch Schleifen miteinander verbunden sind.

Zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne befindet sich die nicht-selektive Kationen-Pore. Ebenfalls allen TRP-Kanälen gemeinsam ist die intrazelluläre Lokalisation des N- und C-Terminus, an denen sich zahlreiche regulatorische Domänen befinden (Bourinet et al., 2014). Zu diesen regulatorischen Domänen zählen beispielsweise Ankyrin-Repeats oder die TRP-Box (Abbildung 1). Alle Mitglieder der TRPV1-Kanäle weisen diese Ankyrin-Wiederholungen an ihrem N-Terminus auf. Diese Motive dienen als regulatorische Stellen für Phospholipide und Calmodulin, die so eine Änderung der Kanal-Sensitivität bewirken können (Jin et al. 2006; Lishko et al., 2007; Ho et al. 2012; Gregorio-Teruel et al., 2014).

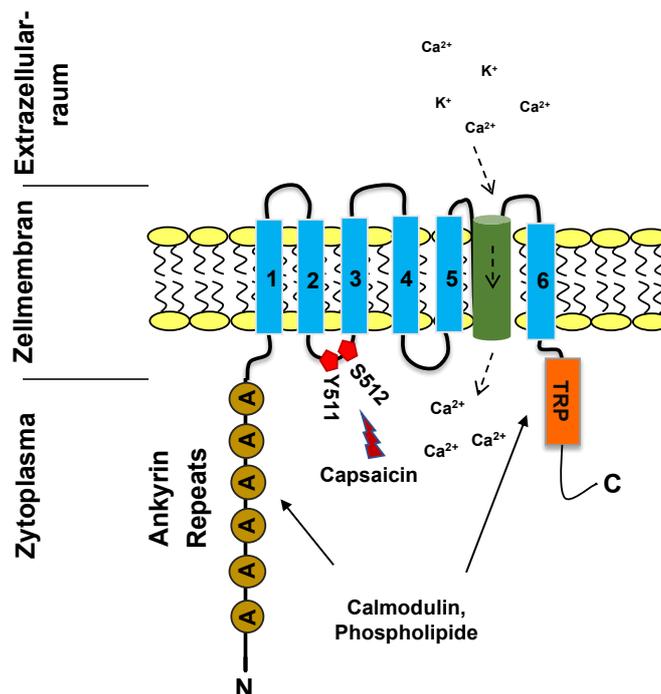


Abbildung 1: Schema des TRPV1-Kanals in der Plasmamembran

Die sechs Membrandomänen durchspannen die Plasmamembran und sind über Schleifen miteinander verbunden. Zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne öffnet sich nach Aktivierung des Kanals die nicht selektive Kationen-Pore (grün). Die N- und C-Termini sind innerhalb des Zytoplasmas lokalisiert. Der N-Terminus weist Wiederholungen von Ankyrin-Strukturen (braune Kreise, Ankyrin-Repeats) auf und ist Ansatzpunkt diverser regulatorischer Moleküle, wie Calmodulin und Phospholipiden. Der C-Terminus enthält eine sogenannte TRP-Box (orangefarbenes Rechteck), ebenfalls eine Bindestelle für regulatorische Moleküle. Im Zytoplasma bindet Capsaicin unter anderem an die Aminosäuren Y511 und Y512 (rotes Pentagon). Die Abbildung wurde entnommen und verändert nach Thiel, et al., 2020.

Ursprünglich wurden die TRP-Kanäle in *Drosophila* entdeckt und charakterisiert. In *Drosophila* kommt dem TRP-Kanal eine essenzielle Bedeutung bei der optischen Sinneswahrnehmung zu. 1995 wurden durch Homologie-Studien in Säugetieren erstmals ein zu *trp* homologes Gen beschrieben. Aufgrund seiner 40 %igen Übereinstimmung wurde diese neue Rezeptor-Klasse in Säugern als „transient receptor potential channel-related protein 1“ (TRPC1) benannt (Wes

et al., 1995). Heute werden die TRPC-Kanäle als „canonical“ oder „classical“ bezeichnet, abweichend von ihrer ursprünglichen Namensgebung.

Bedeutung und Funktion der TRP-Kanäle sind sehr breit gefächert. Sie reicht von der Wahrnehmung von Schmerzen über die Wahrnehmung von Hitze und Kälte bis hin zur Regulation des Herzkreislaufs, Proliferation und Zelltod (Nilius, 2007; Nilius et al., 2007; Nilius und Szallasi, 2014).

1.2.1. Der Capsaicin-Rezeptor TRPV1

Der Vanilloid Rezeptor 1 wurde erstmals 1997 durch Caterina et al. beschrieben. Es handelt sich um einen nicht-selektiven Kationenkanal, durch den Ca^{2+} -Ionen in das Zytoplasma einer TRPV1-exprimierenden Zelle strömen können (Abbildung 2) (Caterina et al., 1997). Capsaicin ist bekannt als die Schärfe-induzierende Substanz der Chilipflanzen (Abbildung 2 A) und ist von seiner chemischen Struktur ein Vanilloid, enthält also eine Vanillyl-Gruppe (Abbildung 2 B), was zur Namensgebung der TRPV-Kanäle führte.

A



B

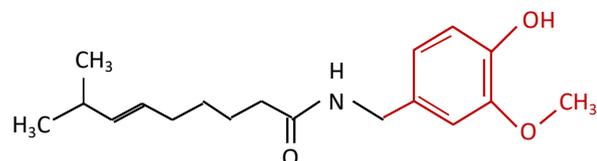


Abbildung 2: Chili-Früchte und ihr Schärfe-induzierender Inhaltsstoff Capsaicin

A) Verschiedene Varianten von Chilifrüchten der Pflanzengattung *Capsicum* in unterschiedlichen Schärfeegraden, in Abhängigkeit der Konzentration des Vanilloids Capsaicin. **B)** Die chemische Struktur von Capsaicin mit der charakteristischen Vanillyl-Gruppe (rot markiert) und seiner Hydroxyl- Methoxybenyl-Struktur, sowie dem assoziierten Rest. Abbildungen entnommen und verändert nach Thiel, et al., 2020.

Durch das Essen von Chili-Früchten kommt es zum Ausbilden von Symptomen, wie einem brennenden Gefühl im Mundraum, Schweißausbrüche und Hitzegefühl, je nach Konzentration von Capsaicin und körperlicher Konstitution. Ursache dafür ist die Expression von TRPV1 in den Spinalganglien des peripheren Nervensystems. Hier führt die Aktivierung von TRPV1 durch Capsaicin zu einer Depolarisation der Plasmamembran, wodurch ein Aktionspotential in der Nervenzelle entsteht, welches vom Organismus letztendlich als schmerzhafter Reiz

interpretiert wird (Caterina et al., 1997). Auch in den Nervenzellen von Vögeln wird der TRPV1-Kanal exprimiert, diese zeigen aber keine schmerzbedingte Reaktion beim Fressen von Chilifrüchten. Sequenzvergleiche zwischen dem *trpv1* Gen von Vögeln und Säugern zeigte eine Abweichung in bestimmten Bereichen der Primärstruktur (Jordt und Julius, 2002). Hierdurch wurde nachgewiesen, dass die Bindung von Capsaicin an TRPV1 hauptsächlich im Intrazellularraum erfolgt und die Aminosäuren Serin 512 und Tyrosin 511 involviert sind. Lokalisiert sind diese in der Schleife zwischen der Transmembrandomäne zwei und drei (Abbildung 1). Neben diesen beiden Hauptbindungsstellen dient auch der Threonin-Rest 550 zwischen der vierten und fünften Transmembrandomäne als Bindestelle (Jordt und Julius, 2002; Ho et al., 2012).

Neben Capsaicin können Temperaturen über 42 °C, saurer pH-Wert und Ethanol (Trevisani et al., 2002; Ho et al., 2012) den TRPV1-Kanal aktivieren. Aber auch endogene Verbindungen wie N-Arachidonoyl-Dopamin (NADA) sind als effiziente Agonisten des TRPV1 Kanals beschrieben worden (Huang et al., 2002; Grabiec und Dehghani, 2017). Mit Resiniferatoxin wurde zusätzlich ein um das Vielfache wirksamere Pflanzentoxin beschrieben (Szallasi und Blumberg, 1989).

Hauptsächlich wird TRPV1 in den Spinalganglien des peripheren Nervensystem exprimiert (Sanchez et al., 2001). Hier konnten Untersuchungen in den letzten Jahren zeigen, dass nicht nur die Wahrnehmung von Schmerzen aus der Peripherie zentrale Aufgabe des TRPV1-Kanals ist, sondern auch die Regulation der Genexpression wie beispielsweise die Regulation der Insulin-Biosynthese und-Sekretion in den β -Zellen des Pankreas (Akiba et al., 2004; Gram et al., 2007; Riera et al., 2014). Dabei führt die Aktivierung von TRPV1 über einen Stimulus in Pankreas innervierenden Spinalganglien zur Induktion einer „second messenger“ kontrollierten Signalkaskade. In der Folge wird die Insulin-Sekretion vermindert und die Glukosehomöostase gestört (Riera et al., 2014). Es besteht somit eine Verbindung zwischen TRPV1 und der Aktivierung von Signalkaskaden, die zur Insulin Sekretion führen.

1.3. Second Messengers

Die Stimulation eines Rezeptors kann dazu führen, dass die Konzentration von „Second messengern“ erhöht wird. Zu ihnen zählen cAMP, IP₃ und Ca²⁺-Ionen. cAMP seinerseits kann die Proteinkinase A (PKA), sowie den „exchange factor directly activated by cAMP“ (EPAC) aktivieren. Neben cAMP ist Ca²⁺ ein wichtiger „second messenger“ in der Zelle. Verschiedene Kompartimente können dabei unterschiedliche Calciumkonzentrationen aufweisen. Deren Erhaltung und Wiederherstellung nach Veränderung kommt eine übergeordnete Rolle zu. Der Organismus investiert hohe Mengen an Energie, um über ATPasen Calcium-Ionen aus dem

Zytoplasma in den Extrazellularraum bzw. das Endoplasmatische Retikulum (ER) zu transportieren (Clapham, 2007). Calcium-Ionen haben eine wichtige Rolle bei der Übertragung von Signalen von der Plasmamembran der Zelle über das Zytoplasma hin zum Zellkern. Strömen Calcium-Ionen entsprechend ihrem Konzentrationsgefälle in das Zytoplasma einer Zelle, so können sie Proteinkinasen wie die Proteinkinase C und verschiedene Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinasen aktivieren. Neben dem Einstrom über spezielle Calcium-Kanäle wie den „L-Type voltage-gated channels“ können Calcium-Ionen auch aus intrazellulären Kompartimenten, wie dem Endoplasmatischen Retikulum rekrutiert werden. Am Ende dieser Signalkaskaden steht unter anderem die Aktivierung von Stimulus-responsiven Transkriptionsfaktoren.

1.3.1. Proteinkinasen als „Signaltransducer“

Die durch „second messengers“ aktivierten Kinasen vermitteln nach ihrer Aktivierung die Weiterleitung eines Signals, indem sie spezifisch Proteine oder Lipide phosphorylieren. Für den Menschen sind 518 Proteinkinasen beschrieben, was im Genom 1,7 % aller menschlichen Gene entspricht (Manning et al., 2002).

Proteinkinasen können dabei sowohl im Zytosol, als auch membrangebunden vorliegen. Die Proteinkinase A (PKA) liegt als PKA Typ I im Zytosol und als PKA Typ II membrangebunden vor. Die Aktivierung erfolgt bei beiden Varianten durch cAMP (Di Benedetto et al., 2008).

Bei intrazellulären Signalkaskaden findet man häufig die „mitogen activated protein kinases“ (MAPKs). Bedeutsam sind hier vor allem die „extracellular signal regulated kinase“ (ERK1/2), die „c-Jun N-terminal kinase“ (JNK) und die Proteinkinase p38. ERK1/2 wurde als erste Proteinkinase dieser Familien beschrieben und kann durch Wachstumsfaktoren und durch viele Liganden G-Protein gekoppelter Rezeptoren aktiviert werden (Belcheva und Coscia, 2002). Innerhalb der zellulären Regulation fungiert ERK1/2 unter anderem als Regulator der Proliferation (Cargnello und Roux, 2011), aber auch anti-apoptotische Prozesse können unter ihrer Kontrolle stehen (Lavoie et al., 2020). Eine Stimulation von G α q-gekoppelten Rezeptoren oder spannungsabhängiger Calcium-Kanäle bewirkt einen Anstieg der intrazellulären Calcium-Ionen-Konzentration, in dessen Folge es zu einer verstärkten Aktivierung von ERK1/2 kommt. Dabei führt der Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), die wiederum die Serin/Threonin-Proteinkinase Raf-1 phosphoryliert und aktiviert (Abbildung 3).

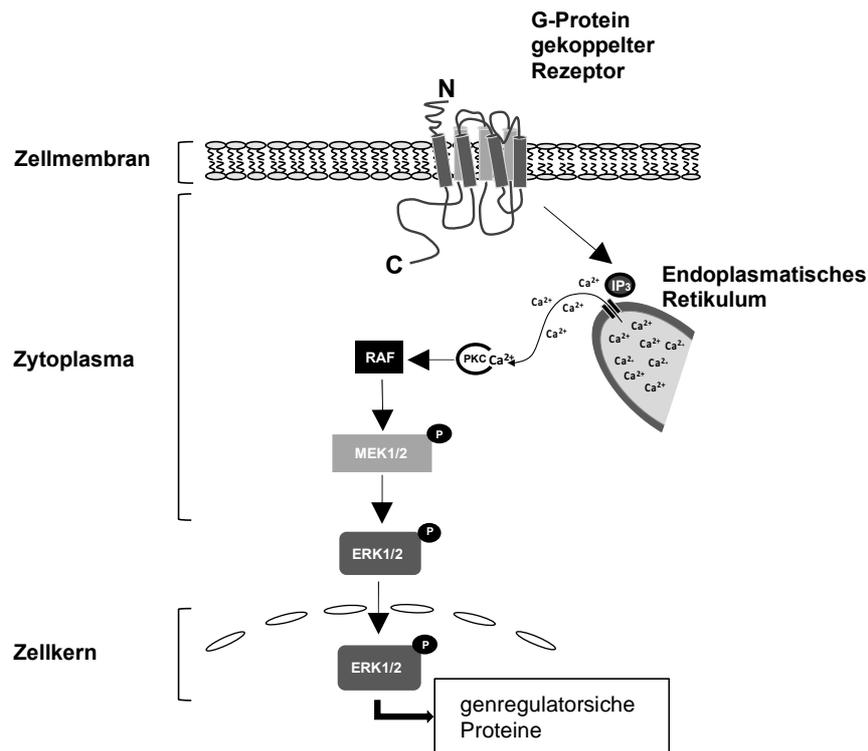


Abbildung 3: Aktivierung des ERK-Signalwegs

Die Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors über einen Liganden führt zur Bildung von Inositoltriphosphat (IP₃), welches zur Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus dem Endoplasmatischen Retikulum in das Zytoplasma führt. Das freigesetzte Calcium induziert die Aktivierung der Proteinkinase C, die dann die Serin/Threonin-Kinase RAF aktiviert. RAF wiederum aktiviert MEK1/2 über Phosphorylierung. Diese Proteinkinase phosphoryliert und aktiviert ERK1/2. In der Folge kann ERK1/2 in den Zellkern translozieren und dort genregulatorische Proteine aktivieren.

Die aktivierte Raf-Kinase phosphoryliert und aktiviert MEK1/2, die wiederum die Proteinkinase ERK1/2 phosphoryliert und aktiviert (Payne et al., 1991; Kolch et al., 1993; Schliess et al., 1996; Schönwasser et al., 1998). Nach der Aktivierung kann ERK1/2 Substrate im Zytoplasma phosphorylieren und in den Zellkern translozieren. Im Zellkern kann ERK1/2 genregulatorische Proteine phosphorylieren. Somit sind Proteinkinasen die entscheidenden Verbindungselemente, zwischen Rezeptoren und intrazellulären Zielen.

1.3.2. Stimulus-responsive Transkriptionsfaktoren

Proteinkinasen wie ERK1/2 können in Folge ihrer Aktivierung die Expression von „immediate early genes“ (IEGs) induzieren, um so eine schnelle zelluläre Antwort auf ein Signal zu bewirken. IEGs sind Gene, die sehr schnell transkribiert werden können und es einer Zelle somit ermöglichen eine schnelle Antwort auf bestimmte Reize zu finden.

1.3.2.1. Der Transkriptionsfaktor-Komplex „activator protein-1“ (AP-1)

Zu diesen IEGs gehört das *c-fos*-Gen. Die Transkription des *c-fos*-Gens wird durch ERK1/2 induziert, sowie die Phosphorylierung des c-Fos Proteins. c-Fos dimerisiert mit dem Transkriptionsfaktor c-Jun und bildet dadurch den Transkriptionsfaktorkomplex AP-1 „activator protein 1“ (Chiu et al., 1988; Whitmarsh und Davis, 1996). Sowohl c-Jun als auch c-Fos gehören zu den „basic leucine zipper“ (bZIP) Transkriptionsfaktoren. Die „leucine zipper“ Region dient der Dimerisierung mit Proteinen der c-Jun Familie, die basische Region wird zur Bindung an die DNA benötigt (Abbildung 4) (Hurst, 1994).

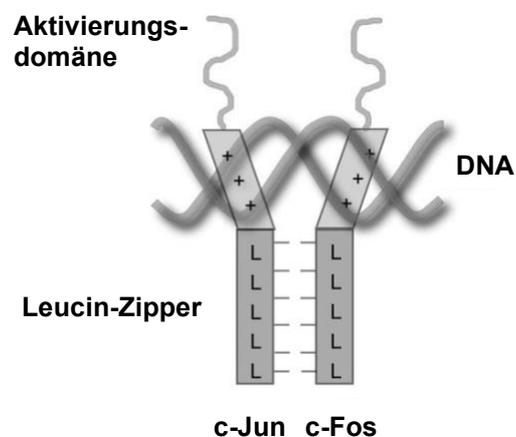


Abbildung 4: Der Transkriptionsfaktor-Komplex AP-1

AP-1 ist ein Transkriptionsfaktor-Komplex, der sich aus den Transkriptionsfaktoren c-Jun und c-Fos zusammensetzen kann. Beide Untereinheiten dimerisieren über die Leucin-Zipper-Domäne miteinander, wodurch sie einen Komplex bilden. Die beiden basischen DNA-Bindedomänen stoßen sich gegenseitig ab, wodurch die DNA-Bindefurche entsteht. So kann AP-1 an seine spezifische Erkennungssequenz binden und eine Transaktivierung induzieren. Abbildung entnommen und verändert nach Backes et al., 2021.

Aktivierbar ist c-Jun beispielsweise durch den ERK1/2-Signalweg (Adisheshaiah et al., 2008). In seiner Funktion als Transkriptionsfaktor bindet AP-1 an ein „TPA response element“ (TRE) (Lee et al., 1987) mit der Sequenzfolge 5'-TGA(G/C)TCA-3' (Angel et al., 1987). TPA (2-O-tetradecanoylphorbol-13-Acetat) ist eine pflanzliche Verbindung, die eine starke Aktivierung von AP-1 bewirkt (Karin, 1995). In seiner Rolle als Transkriptionsfaktor fungiert es u.a. als Regulator der Zellproliferation (Angel und Karin, 1991; Jochum et al., 2001; Shaulian und Karin, 2001, 2002; Eferl und Wagner, 2003).

1.3.2.2. Der „Ternary Complex Factor“ (TCF) und das „Serum-Response Element“ (SRE)

Die Regulation des *c-fos* Gens erfolgt u.a. über die Bindung von Transkriptionsfaktoren an das „serum-response element“ (SRE) in der Promotorregion (Johansen und Prywes, 1994). Dieses Sequenzmotiv wird von einem Dimer des „serum response factors“ (SRF) gebunden (Treisman, 1992). Die Bindung eines SRF-Dimers genügt jedoch nicht, um eine Transkription des *c-fos*-Gens zu initiieren. Es bedarf noch einem Komplex-bildenden Faktor, dem sogenannten „ternary complex factor“ (TCF). Ein wichtiger Vertreter dieser TCFs ist das „ETS like-1“ (Elk-1) Protein. Es hat einen modularen Aufbau mit einer DNA-Bindestelle, einer Aktivierungsdomäne und einer B-Domäne, die zur Interaktion mit dem SRF-Dimer dient (Abbildung 5) (Janknecht und Nordheim, 1992).

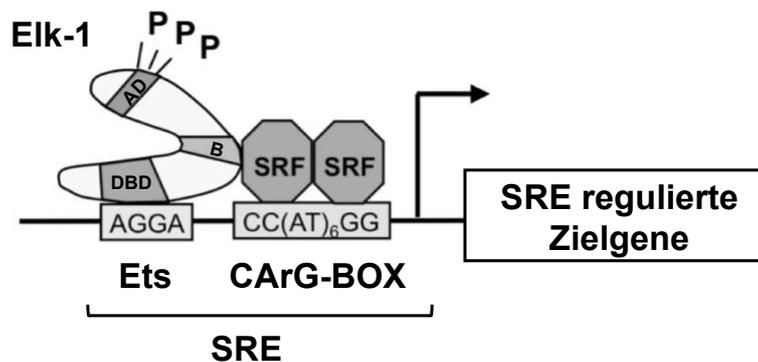


Abbildung 5: Die Bindung von Elk-1 an das Serumresponse Element und den SRF-Dimer

Ein phosphorylierter „ternary complex factor“ wie Elk-1 kann mittels seiner DNA-Bindedomäne (DBD) an seine Erkennungssequenz (Ets) innerhalb des „serum response elements“ (SRE) der Promotorregion des Zielgens binden. Dabei bindet es außerdem mit der B-Domäne an einen „serum response factor“ (SRF)-Dimer. Dieses SRF-Dimer ist an die CArG-Box, innerhalb des SRE, gebunden. Abbildung entnommen und verändert nach Thiel et al., 2021.

Elk-1 kann durch die MAP-Kinase ERK1/2 und andere MAP-Kinasen aktiviert werden (Gille et al., 1995).

1.4. Signaltransduktion in der β -Zelle

In den β -Zellen des Pankreas kommt den „voltage-gated calcium channels“ (VGCCs) eine wichtige Rolle in der Regulation der Insulinsekretion zu. Diese Kanäle werden auch in anderen endokrinen Zellen und in Neuronen exprimiert. Dabei sind die induzierten Effekte über die VGCCs sehr vielfältig und reichen von Sekretion über Neurotransmission hin zu einer Veränderung der Genexpression. Die Aktivierung der Kanäle erfolgt über die Depolarisation

der Membran, in der sie lokalisiert sind. Öffnen sich die Kanäle, so können Calcium-Ionen in das Zytoplasma der Zelle strömen. Innerhalb der VGCCs unterscheidet man verschiedene Subtypen, abhängig von ihrer Induzierbarkeit durch Depolarisation. Der L-type Subtyp zeichnet sich dabei durch eine langanhaltende Öffnung aus, für die es aber eine starke Depolarisation der Membran braucht (Catterall et al., 2005).

Innerhalb der „L-type voltage gated calcium channels“ spielt der Subtyp $Ca_v1.2$ eine bedeutende Rolle in der Regulation der Glucosehomöostase. Dabei führt die Aktivierung von $Ca_v1.2$ zu einer schnellen Insulin-Exozytose (Schulla et al., 2003; Vignali et al., 2006). Eine erhöhte Glukosekonzentration im Blut sowie verschiedene Liganden G-Protein gekoppelter Rezeptoren bewirkt die Exozytose von Insulin (siehe Abbildung 6) (Murthy et al., 2007; Thorens, 2015).

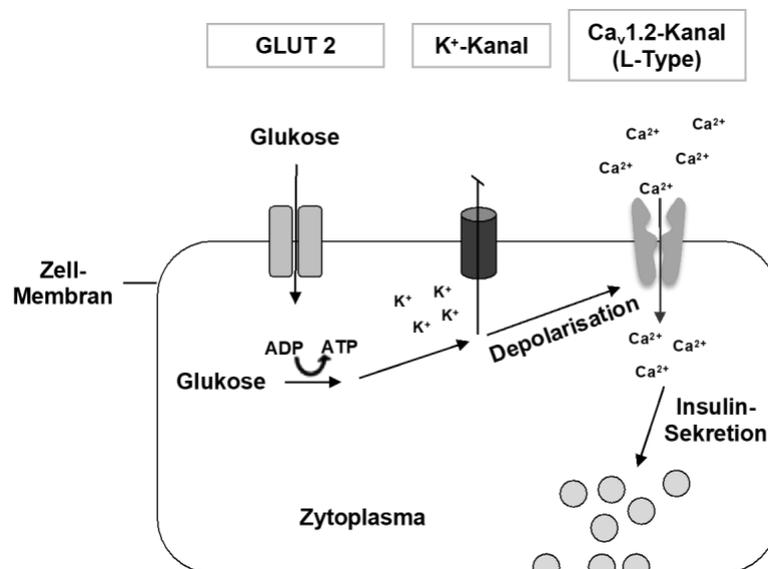


Abbildung 6: Regulation der Insulin-Sekretion in pankreatischen β -Zellen

Glukose induziert die Insulin-Sekretion in β -Zellen des Pankreas. Dabei wird Glukose durch einen Glukosetransporter in das Zytoplasma transportiert. Dort wird die Glukose unter Umwandlung von ADP zu ATP metabolisiert. Der Konzentrationsanstieg von ATP führt zur Inhibition ATP-abhängiger K⁺-Kanäle. In der Folge strömt weniger K⁺ aus der Zelle, wodurch es zu einer Depolarisation der Membran kommt. Diese Depolarisation führt zum Öffnen von „L-Type Ca²⁺ channels“ wie $Ca_v1.2$. Die in das Zytoplasma einströmenden Calcium-Ionen bewirken eine Sekretion des gespeicherten Insulins.

Die Glukose wird in der Glykolyse, dem Citratzyklus und der Atmungskette metabolisiert, wodurch es zur Bildung von ATP aus ADP kommt. Die Konzentration von ATP steigt an, wodurch es zu einer Verschiebung des ADP/ATP Verhältnisses kommt. Die gesteigerte ATP-Konzentration hat einen inhibitorischen Effekt auf ATP-abhängige Kalium-Kanäle. Die Folge ist eine Depolarisation der Membran durch eine Anhäufung von K⁺-Ionen im Zytoplasma. Diese Depolarisation führt daraufhin zum Öffnen von „L-Type voltage-gated calcium channels“ und dem Einstrom von Ca²⁺-Ionen in das Zytosol. Dieser Einstrom bewirkt die Freisetzung von Insulin durch Exozytose (Ashcroft et al., 1994; Meisenberg und Simmons, 2012).

1.4.1. Stimulus-responsive Transkriptionsfaktoren in β -Zellen des Pankreas

Neben der Sekretion des gespeicherten Insulins hat der Anstieg des Ca^{2+} -Spiegels noch einen weiteren Effekt. In Insulinoma-Zellen führt eine Erhöhung der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration zu einer Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 und JNK, welche ihrerseits die Aktivierung Stimulus-responsiver Transkriptionsfaktoren wie AP-1 induzieren (Müller et al., 2010). Der Transkriptionsfaktor AP-1 wird durch den „ternary complex factor“ (TCF) „ETS like-1“ (Elk-1) reguliert, der seinerseits durch ERK 1/2 aktiviert wird. In Insulinoma-Zellen wurde beobachtet, dass Glukose eine verstärkte Aktivierung von Elk-1 bewirkt (Bernal-Mizrachi et al., 2001; Mayer und Thiel, 2009). Neben Elk-1 kann auch die Biosynthese des Transkriptionsfaktors „Early growth response protein-1“ (Egr-1) durch eine erhöhte Glukosekonzentration induziert werden. Auch hier ist die Aktivierung der L-type Calcium-Kanäle durch Glukose unabdingbar (Mayer und Thiel, 2009). Egr-1 ist ein wichtiger Regulator der Aktivität des Pdx-1 Transkriptionsfaktors, einem Regulator der Insulin-Gen-Expression (Watada et al., 1996).

2. Fragestellung der Arbeit

1. In der Wahrnehmung von Schmerzen in der Peripherie kommt dem TRPV1-Kanal eine wichtige Rolle zu. Anschließend an die Resultate meiner Masterarbeit sollte hier die TRPV1-induzierte Signalkaskade aufgedeckt werden, sowie die Pharmakologie des TRPV1-Kanals näher beleuchtet werden.
2. Glucose bewirkt über die Stimulation von pankreatischen β -Zellen eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und Elk-1. Welche Funktion diese aktivierten Transkriptionsfaktoren hier übernehmen ist bisher aber nicht bekannt. Über die Generierung neuer transgener Mausmodelle sollte die Rolle von Ap-1 und Elk-1 in pankreatischen β -Zellen entschlüsselt werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien

Produkt	Bestellnummer	Hersteller, Firmensitz
ATP	ATPD-RO	Merck, Darmstadt
4-Hydroxytamoxifen	H7904	Merck, Darmstadt
BCA	UP40840A	Interchim, Montluçon
Biozym LE Agarose	840004	Biozym, Hessisch Oldendorf
Calciumchlorid	T885.2	Roth, Karlsruhe
Capsaicin	M2028	Merck, Darmstadt
Chelex 100	1421253	Bio-Rad, Feldkirchen
Cloroquine diphosphate salt	C6628	Merck, Darmstadt
Clozapine N-Oxide	BML-NS105-0005	Enzo Life Sciences, Lörrach
Coenzym A	A2056	Merck, Darmstadt
Complete™, Mini, EDTA-Free Protease Inhibitor Cocktail	4693159001	Merck, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat	NIST SRM 2186II	Merck, Darmstadt
DMEM	52100047	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
DME	D5030	Merck, Darmstadt
DMSO	A994.1	Roth, Karlsruhe
dNTP Mix (10 mM jeweils)	R0192	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
DTT	6908.1	Roth, Karlsruhe
EDTA	X986.2	Roth, Karlsruhe
EGTA	E3889	Merck, Darmstadt
GeneRuler 100 bp Plus	SM0321	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Essigsäure	818755	Merck, Darmstadt
Ethanol, vergällt	702543	ZBDS2, Saarbrücken
Ethanol 99,8%	34852-2.5L-M	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	7870.1	Roth, Karlsruhe

FCS	10270-106	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
FURA-2/AM	F1221	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Glucose	G8270	Merck, Darmstadt
Glutamin	G7513	Merck, Darmstadt
Glycin	HN07.2	Roth, Karlsruhe
1 x HBSS	14025	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
HCl 37 %	9277.2	Roth, Karlsruhe
HEPES	H3375	Merck, Darmstadt
H ₂ O (DEPC)	T143.4	Roth, Karlsruhe
H ₂ O (nukleasefrei)	P1193	Promega, Walldorf
Kaliumchlorid	12009	Grüssing GmbH, Filsum
Kaliumhydrogenphosphat	4873	Merck, Darmstadt
D-Luziferin-Natriumsalz	4096.2	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	2189.2	Merck, Darmstadt
(MgCO ₃) ₄ Mg(OH) ₂ 5 x H ₂ O	M5671	Merck, Darmstadt
Magnesiumhydrogencarbonat	1058270250	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	105886	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat-heptahydrat	105886	Merck, Darmstadt
Methanol	34860	Merck, Darmstadt
MTT	475989	Merck, Darmstadt
N-Arachidonoyldopamine	90057	Cayman, Ann Arbor, USA
Natriumchlorid	121221000U	Grüssing GmbH, Filsum
NP40	74385	Merck, Darmstadt
Page Ruler Prestained Protein Ladder	26616	Fermentas, St. Leon-Rot
PD98059	S513000	Calbiochem, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	P4333	Merck, Darmstadt
Proteinkinase K	7528.1	Roth, Karlsruhe
Hexadimethrine Bromide (Polybrene)	107689	Merck, Darmstadt
Random Hexamer Primer	SO142	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Resiniferatoxin	1137	Tocris, Wiesbaden

Revert Aid™ Reverse Transcriptase	EP0441	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
RiboLock-RNase-Inhibitor	EO0382	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
RNeasy MiniElute columns	1026497	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	74104	Qiagen, Hilden
RNeasy Plus Micro Kit	74034	Qiagen, Hilden
Triton-X-100	3051.3	Roth, Karlsruhe
QIAshredder	79654	Qiagen, Hilden
Rotiphorese® Nf-Acrylamid/Bis- Lösung 30 %	A124.2	Roth, Karlsruhe
SDS	2326.2	Roth, Karlsruhe
Sodium Lauroyl Sarcosine	L-5125	Merck, Darmstadt
Supersignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	34094	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Taq DNA Polymerase	M0267S	New England Biolabs, Frankfurt
TEMED	2367.3	Roth, Karlsruhe
TPA	524400	Merck, Darmstadt
Tricine	39468	Merck, Darmstadt
Tris	4855.2	Roth, Karlsruhe
Trypsin/EDTA 10x	L2153	Merck, Darmstadt
Caspase-Glo® 3/7 Assay Systems	G8091	Promega, Walldorf
Bacillol Plus	973375	Bode Chemie GmbH, Hamburg
RPMI 1640	51800-043	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
PREGNENOLON	P2129	Merck, Darmstadt
PROGESTERON	2835	Bio-Techne, Wiesbaden- Nordenstadt
AMG9810	2316	Bio-Techne, Wiesbaden- Nordenstadt
BCTC	sc-205599	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
JNK-IN-8	HY13319	Hycultec, Beutelsbach

Tabelle 1: Dargestellt sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien mit ihren entsprechenden Bestellnummern, sowie die Namen der herstellenden Firmen und deren Firmensitz.

3.1.2. Verwendete Antikörper

Epitop	Bestellnummer	Verdünnung	Hersteller, Firmensitz
c-Fos	sc-52	1:3000	Santa Cruz, Heidelberg
c-Jun	sc-1694	1:1000	Santa Cruz, Heidelberg
Cleaved Caspase-3	9661	1:400	Cell Signaling, Frankfurt am Main
ERK	sc-7383	1:2000	Santa Cruz, Heidelberg
FLAG	F-1804	1:3000	Merck, Darmstadt
HDAC-1	sc-81598	1:5000	Santa Cruz, Heidelberg
P-ERK	sc-153	1:1000	Santa Cruz, Heidelberg

Tabelle 2: Dargestellt sind die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper mit ihren entsprechenden Bestellnummern, sowie die Namen der herstellenden Firmen und deren Firmensitz. Genannt ist das entsprechende Epitop und die eingesetzte Verdünnung.

3.1.3. Verwendete Verbrauchsgüter

Name	Bestellnummer	Hersteller, Firmensitz
1,5 ML Reagiergefäße	72.706	Sarstedt, Nürnberg
15 ml Cellstar® Polypropylen Röhrchen	188272	Greiner bio-one, Frickenhausen
50 ml Cellstar® Polypropylen Röhrchen	227261	Greiner bio-one, Frickenhausen
96-Lochplatte, transparent	655101	Greiner bio-one, Frickenhausen
96-Lochplatte, weiß	236105	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Biosphere® Fil. Tip. 10 µl farblos	70.1130.210	Sarstedt, Nürnberg

Biosphere® Fil. Tip. 100 µl farblos	70.760.212	Sarstedt, Nürnberg
Biosphere® Fil. Tip. 100-1000 µl farblos	70.762.211	Sarstedt, Nürnberg
Biosphere® Fil. Tip. 2-20 µl farblos	70.760.219	Sarstedt, Nürnberg
Deckglas	0657.2	Roth, Karlsruhe
Einmalspritze, Injekt® 10 ml	4606108V	Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmalspritze, Injekt® 20 ml	4606205V	Braun Melsungen AG, Melsungen
Filtropur s 0.2	83.1826.001	Sarstedt, Nürnberg
Filtropur s 0.45	83.1826	Sarstedt, Nürnberg
Kryoröhrchen	72.379.002	Sarstedt, Nürnberg
Küvetten	0030106300	Eppendorf, Hamburg
Objektträger 76 x 26 mm	MZ-0002	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Pipettenspitze, 1000 µl	70.762	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitze, 200 µl	70.760.002	Sarstedt, Nürnberg
Zellkulturflasche mit Filter, 250 ml	658175	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturflasche mit Filter, 550 ml	660175	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturschaber	83.1830	Sarstedt, Nürnberg
Zellkulturschalen 35x15 mm	130180	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Zellkulturschalen 60x15 mm	130181	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt

Tabelle 3: Dargestellt sind die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsgüter und deren Bestellnummern, sowie die Namen der herstellenden Firmen und deren Firmensitz

3.1.4. Verwendete Laborgeräte

Gerät	Hersteller, Firmensitz
Accu-Check Aviva	Roche Diagnostics, Mannheim
Analysewaage	Sartorius, Göttingen
Auflichtmikroskop	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Autoklav	Schütt, Göttingen
Brutschrank	Hareous, Hanau
BZ-8000 Fluoreszenzmikroskop	Keyence, Neu-Isenburg
Eismaschine	diverse Hersteller
Feinanalysewaage	Sartorius, Göttingen
Chemidoc™ Xrs+ System	Bio-Rad, München
Heizschüttler	Eppendorf, Hamburg
Luminometer	Berthold Detection Systems, Alabama, USA
Magnetrührer	diverse Hersteller
Multiskan™ Fc Mikrotiterplatten-Photometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mikrotom (Leica SM2000R)	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Millipore-Wasseranlage Milli Q	Millipore, Milford, USA
Neubauer Zählkammer	VWR, Darmstadt
pH-Meter, Inolab Ph 720	WTW, Weilheim
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Glaspipetten (5, 10, 25 ml)	diverse Hersteller
Pipetus®Akku	Hirschmann Laborgeräte, Heilbronn
Sterilbank	Hareus, Hanau
Biofuge®Pico	Hareus, Hanau
Vortexer	diverse Hersteller
Wasserbad	diverse Hersteller
Mr. Frosty™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Tabelle 4: Dargestellt sind die in dieser Arbeit verwendeten Laborgeräte, sowie die Namen der herstellenden Firmen und deren Firmensitz.

3.1.5. Verwendeten Enzyme und Nukleotide

Name	Bestellnummer	Hersteller, Firmensitz
Taq DNA Polymerase	M0267L	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Gel Loading Dye, Purple (6x)	B7024S	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
DATP Solution, 100 Mm	R0141	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DCTP Solution, 100 Mm	R0151	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DGTP Solution, 100 Mm	R0161	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DTTP Solution, 100 Mm	R1191	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Revertaid Reverse Transcriptase	EP0441	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Random Hexamer	SO142	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ribolock RNase Inhibitor	EO0381	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Tabelle 5: Dargestellt sind die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme und Nukleotide mit deren Bestellnummern, sowie die Namen der herstellenden Firmen und deren Firmensitz.

3.1.6. Verwendete Zelllinien

3.1.6.1. H2C1 Zellen

H2C1-Zellen sind HEK293-Zellen, welche den humanen TRPV1 (hTRPV1)-Kanal exprimieren (Mergler et al., 2012). Die Zellen wurden mir freundlicherweise von Herrn Dr. rer. nat. Carsten Grötzinger (Charité, Berlin) zur Verfügung gestellt.

3.1.6.2. HEK293-TN

HEK293-TN-Zellen sind embryonale Nierenzellen, die das große T-Antigen des SV40-Virus exprimieren.

3.1.6.3. HEK293/T17

HEK293/T17 ist eine Zelllinie, die 1977 aus einer embryonalen Niere gewonnen und mit dem großen T-Antigen aus SV-40 transformiert wurde (DuBridgde et al., 1987; Graham et al., 1977). Aufgrund der gesteigerten Transfizierbarkeit wurde Klon 17 ausgewählt.

3.1.6.4. HEK293 Δ B-Raf:ER

Für diese Zelllinie wurden HEK293T-Zellen mit Retroviren infiziert, die mit dem retroviralen Transfektor pBabepuro3 Δ B-Raf:ER generiert wurden. Dieses kodiert für die aktive Form des B-Raf Proteins, welches mit der Hormonbindedomäne des murinen Östrogenrezeptors fusioniert ist und die Induzierbarkeit über 4-Hydroxytamoxifen ermöglicht (Al-Sarraj et al., 2005).

3.1.6.5. INS-1 832/13

INS-1 832/13-Zellen sind immortalisierte Insulinomazellen der Ratte, welche Glukose-abhängig Insulin sezernieren. Dazu wurden die Zellen durch Transfektion so verändert, dass sie das humane Insulin produzieren (Hohmeier et al., 2000; Henkel-Rieger et al., 2007; Hectors et al, 2013). Die INS-1 832/13 Zelllinie wurde mir freundlicherweise von Hindrik Mulder von der Lund University in Schweden zur Verfügung gestellt und deren Verwendung, durch Hans-Ewald Hohmeier und Christopher Newgard von der Duke University in den USA, genehmigt.

3.1.6.6. INS-1 Δ B-Raf:ER

Um diese stabile Zelllinie zu generieren, wurden Insulinomazellen (INS-1 Zellen) der Ratte mit Retroviren infiziert, die mit dem retroviralen Transfektor pBabepuro3 Δ B-Raf:ER generiert wurden (Müller et al., 2010).

3.1.7. Plasmide und Vektoren

Die Generierung der in dieser Arbeit verwendeten Lentiviren basiert auf einem System mit drei Plasmiden. Zur Generierung der Viren wurden jeweils ein Verpackungsplasmid, ein Expressionsplasmid und der lentivirale Transfervektor transient in HEK293-TN-Zellen transfiziert.

3.1.7.1. Verpackungsplasmid $\Delta 8.91$

Das Verpackungsplasmid enthält die genetischen Informationen des HI Virus für *gag*, *pol* und *rev*. Im 5'-Bereich der Transkriptionseinheit ist ein Promotor/Enhancer des „Cytomegalovirus“ (CMV) vorangeschaltet (Abbildung 7), welcher eine starke Expression der lentiviralen Gene *gag*, *pol* und *rev* ermöglicht. Am 3'-Ende befindet sich eine Polyadenylierungssequenz des Simian-Virus 40 (SV40) (Thiel und Rössler, 2007).

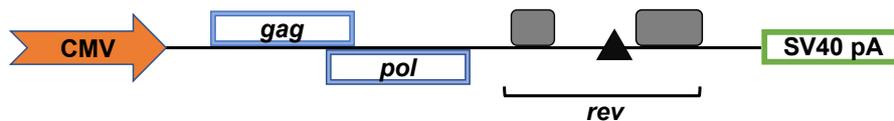


Abbildung 7: Transkriptionseinheit des Verpackungsplasmides $\Delta 8.91$

Das Verpackungsplasmid kodiert für die viralen Gene *gag*, *pol* und *rev*. Vorangestellt ist ihnen der Promotor/Enhancer des Cytomegalovirus (CMV). Der kodierenden Region ist an ihrem Ende ein Polyadenylierungssignal (pA) des Simian-Virus 40 (SV40) angeschlossen. Abbildung entnommen aus Backes 2014.

3.1.7.2. Expressionsplasmid pCMV-G

Das Expressionsplasmid *pCMV-G* kodiert für ein virales Glykoprotein des „Vesicular Stomatitis Virus“ (VSV) (Abbildung 8), welches den Tropismus des Virus erweitert. Es ermöglicht somit, dass ein größeres Spektrum an unterschiedlichen Zelltypen infiziert werden kann. Der Kodierregion des VSV-Glykoproteins ist der CMV Promotor/Enhancer vorangestellt. Die kodierende Region wird von einem Polyadenylierungssignal des SV40 abgeschlossen (Thiel und Rössler, 2007).



Abbildung 8: Funktionale Transkriptionseinheit des Expressionsplasmides pCMV-G

Das virale Hüllprotein (VSV-G) wird im 5'-Bereich von dem starken Promotor des Cytomegalovirus und im 3'-Bereich von einem Polyadenylierungssignal des Simian-Virus 40 (SV40) flankiert. Abbildung entnommen aus Backes 2014.

3.1.7.3. Lentivirale Transfervektoren

Der Transfervektor enthält genetische Information des rekombinanten Lentivirus (Tabelle 6).

Transfervektor	Funktion
<i>pFUW</i>	Lentiviraler Expressionsvektor (Lois et al., 2002)
<i>pFUW-FLAG-REST/Elk-1ΔC</i>	Lentiviraler Expressionsvektor, der für die dominant negative Mutante von Elk-1 kodiert. Zusätzlich enthält dieser Vektor die Information für einen FLAG-Tag (Stefano et al., 2006)
<i>pFUW-MKP-1</i>	Lentiviraler Expressionsvektor, der für die „MAP-Kinase-Phosphatase-1“ (MKP-1) kodiert (Bauer et al., 2007)
<i>pFUW-c-junΔN</i>	Lentiviraler Expressionsvektor, der für die dominant negative Mutante des Transkriptionsfaktors c-Jun kodiert (Bauer et al., 2007)
<i>pFW-Coll.luc</i>	Lentiviraler Expressionsvektor, der für das, Luziferasegen kodiert, vor welches der Promotor des Kollagenase-Gens kloniert wurde. Der Kollagenase Promotor enthält eine Bindestelle für den Transkriptionsfaktor AP-1 (Rössler et al., 2008)
<i>pFW-Coll.lucΔTRE</i>	Lentiviraler Expressionsvektor, der für das Luziferasegen kodiert, vor welches ein mutierter Kollagenasegenpromotor kloniert wurde. Die AP-1 Bindestelle wurde hier aber

	mutiert, wodurch ein Binden von AP-1 verhindert wird (Müller et al., 2010)
<i>pFW-StRE.luc</i>	Lentiviraler Expressionsvektor, der für das Luziferasegen kodiert. Vor dem Luziferasegen wurden in einem Minimalpromotor drei Kopien des „stress-response elements“ des „Hämoxygenase-1“ (<i>ho-1</i>) Promotors inseriert (Alam et al., 2003; Müller et al., 2009)
<i>plentilox3.7(pLL3.7)</i>	Lentiviraler Transfervektor zur Expression von shRNAs (American Type Culture Collection, Manassas, VA). Zusätzlich exprimiert der Vektor EGFP unter der Kontrolle des CMV Promotors (Rubinson et al., 2003). Siehe Kapitel 3.2.1.6.
<i>pll3.7-shtrpv1</i>	Lentiviraler Transfervektor, der für eine shRNA kodiert, die gegen die humane TRPV1 mRNA gerichtet ist (Christoph et al., 2006). Siehe Kapitel 3.2.1.6.

Tabelle 6: Liste der verwendeten lentiviralen Transfervektoren und ihrer kodierenden genetischen Information.

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur

Alle Zellkultur betreffenden Arbeiten wurden in einem der Sicherheitsstufe 2 klassifizierten Labor durchgeführt. Die sterilen Arbeiten wurden entsprechend unter einer Sterilbank nach den gängigen Verfahrensweisen und unter Einhaltung der entsprechenden Sicherheitsbestimmungen ausgeführt. Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien erfolgte bei konstant 37 °C und einer feuchten Atmosphäre mit 5 % CO₂.

Für die Kultivierung der unterschiedlichen Zelllinien wurden die folgenden Fertig-Medien aus dem entsprechenden Pulvergemisch als Stocklösung angesetzt und mit entsprechenden Zusätzen in das gebrauchsfertige Medium überführt.

3.2.1.1. Zellkulturmedium der HEK293/T17-, HEK293-TN- und H2C1-Zelllinien

Die humanen Zelllinien HEK293/T17, HEK293-TN und H2C1 wurden in „Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium“ (DMEM) kultiviert, dem die in Tabelle 7 aufgeführten Zusätze beigemischt wurden.

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

Tabelle 7: Das DMEM-Kulturmedium für die Zelllinien HEK293/T17, HEK293-TN und H2C1 mit den zur fertigen Nährlösung beigemischten Agentien in ihrer jeweiligen Endkonzentration.

3.2.1.2. Zellkulturmedium der INS-1 832/13- und INS-1ΔBRaf:ER-Zelllinien

Die Ratten-Zelllinien INS-1 832/13 und INS-1ΔBRaf:ER wurden in RPMI-1640-Medium kultiviert. Dem Medium wurden vor der Inkubation der Zellen die in Tabelle 8 gezeigten Zusätze beigemischt.

Zusätze	Endkonzentration
FCS	10 %
L-Glutamin	2 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Natriumpyruvat	1 mM
β-Mercaptoethanol	50 µM

Tabelle 8: Dem RPMI-1640-Medium für die Zelllinien INS-1 832/13 und INS-1ΔBRaf:ER wurden zur Herstellung der fertigen Nährlösung die gezeigten Agentien in ihrer jeweiligen Endkonzentration beigemischt.

3.2.1.3. Passage von Säugerzellen

3.2.1.3.1. Passage der HEK293/T17-, HEK293-TN- und H2C1-Zelllinien

Mit allen drei Zelllinien wurde nach dem gleichen Kultivierungsschema verfahren. Entsprechend der Wachstumsstärke dieser Zellen wurden diese an drei Tagen in der Woche mit „phosphate buffered saline“ (PBS) (pH 7,2) gewaschen (Tabelle 9) und danach von der Zellkulturflasche mittels Trypsin/EDTA (Tabelle 9) enzymatisch abgelöst.

Name	Zusammensetzung	Konzentration	pH-Wert
PBS	KCl	3,4 mM	7,2
	KH ₂ PO ₄	1,8 mM	
	Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	4 mM	
	NaCl	170 mM	
Trypsin/EDTA	EDTA	0,1 % (w/v)	-
	Trypsin	0,25 % (w/v)	

Tabelle 9: Zusammensetzung des zur Passage der Zelllinien verwendeten PBS- sowie des Trypsin/EDTA-Gemischs.

Durch die Zugabe von frischem Medium wurde die Enzymaktivität des Trypsin/EDTA gestoppt und die Zellen in der Flasche resuspendiert. Die HEK293/T17- bzw. HEK293-TN-Zelllinien wurden stets in einem Verhältnis von 1:10 umgesetzt. Wegen des langsameren Wachstums der H2C1 Zellen wurden diese weniger stark verdünnt in die Zellkulturflasche zurückgegeben (1/7). Zu den in der Flasche befindlichen Zellen wurde jeweils 40 ml frisches Medium gegeben. In regelmäßigen Abständen wurden die Zellkulturflaschen der einzelnen Zelllinien erneuert.

3.2.1.3.2. Passage der INS-1 832/13- und INS-1ΔBRaf:ER-Zelllinien

Aufgrund ihres langsamen Wachstums wurden die Insulinomazellen an zwei Tagen in der Woche im Verhältnis 1:5 umgesetzt. Abweichend davon erfolgte das Vorgehen wie für die HEK293-Zellen beschrieben.

3.2.1.4. Kryokonservierung und Auftauen von Säugerzellen

Um Zelllinien über einen langen Zeitraum nutzen zu können, wurden diese kryokonserviert. Dazu wurden die Zellen in der Zellkulturflasche mittels Zugabe von PBS (20 ml) gewaschen (Tabelle 9). Das PBS wurde abgenommen und die Zellen mit einer Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst (Tabelle 9). Unmittelbar nach dem Ablösen, wurde Medium (entsprechend der verwendeten Zelllinie) zugegeben und die Zellsuspension in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einer dreiminütigen Zentrifugation bei 200 g (4 °C) wurde das Medium abgenommen und das entstandene Pellet mit FCS, supplementiert mit 10 % DMSO, versetzt und vorsichtig resuspendiert. Die entstandene Zellsuspension wurde auf 1,5 ml in Kryoröhrchen aufgeteilt. Die Kryokonservierung erfolgte in einem Mr. Frosty™ für 24 h bei -80 °C. Zur kurzzeitigen Aufbewahrung wurden die Zellen bei -80 °C gelagert. Für eine längerfristige Lagerung wurden die Zellen bei -198 °C in flüssigem Stickstoff eingelagert. Das Auftauen der Zellen erfolgte langsam in einem 37 °C Wasserbad. Nach dem Auftauen wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für drei Minuten bei 200 g zentrifugiert (Zimmertemperatur). Das überschüssige FCS/DMSO Gemisch wurde entfernt und das Zellpellet in frischem Zellkulturmedium aufgenommen. Das Resuspendieren erfolgte durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren. Danach wurden die Zellen in eine neue Zellkulturflasche mit frischem Medium überführt.

3.2.1.5. Lentivirale Infektion von Säugerzellen

3.2.1.5.1. Lentivirales System

Lentiviren wie das HI-Virus haben einen engen Tropismus und können somit nur wenige spezifische Zelltypen infizieren. Da dies in der Forschung von Nachteil ist, wurden die in dieser Arbeit hergestellten Lentiviren genetisch so verändert, dass ihr Tropismus erweitert war.

Zur Generierung der Lentiviren wurden drei Plasmide verwendet. Das Verpackungsplasmid $\Delta 8.91$ (Abbildung 7) kodierte für die viralen Proteine gag, pol und rev. Das Expressionsplasmid *pCMV-G* (Abbildung 8) kodierte für das virale Glykoprotein des „vesicular stomatitis virus“ (VSV-G), welches zur Erweiterung des Tropismus diente (Thiel und Rössler, 2007). Als drittes Plasmid wurde ein Transfervektor verwendet, welcher die genetische Information des rekombinanten Lentivirus enthielt. Die in dieser Arbeit verwendeten Transfervektoren sind in Tabelle 6 aufgelistet.

3.2.1.5.2. Generierung von Lentiviren

Die Generierung von Lentiviren erfolgte unter S2 Laborbedingungen. Zur Erzeugung der Lentiviren wurden HEK293/T17-Zellen auf 60 mm Zellkulturschalen zu je 1,5 Millionen Zellen pro Schale ausgebracht. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde auf HEK293-TN-Zellen umgestiegen, da diese eine höhere Effizienz in der Produktion der Virus-Partikel aufwiesen. Die Zellen wurden mit 4 ml Medium je Zellkulturschale für 24 h im Brutschrank kultiviert. Danach erfolgte die transiente Transfektion der Zellen mittels der Calciumphosphat-Methode. Dazu wurde eine 2 x HBSS (pH 7,09)-Gebrauchslösung (Tabelle 10) hergestellt und in ein Polystyrol Rundboden-Gefäß vorgelegt (im Folgenden als Ansatz B bezeichnet).

Name	Zusammensetzung	Konzentration	pH-Wert
2 x HBSS	NaCl	274 mM	7,09
	Na ₂ HPO ₄	3,75 mM	
	Glukose	27,75 mM	
	KCl	25 mM	
	HEPES	105 mM	

Tabelle 10: Die Zusammensetzung der zur Transfektion verwendeten 2 x HBSS-Lösung mit ihren Konzentrationen und ihrem pH-Wert.

In ein zweites Gefäß wurde H₂O, CaCl₂, Expressionsplasmid, Verpackungsplasmid und Transfektor gegeben (im Folgenden als Ansatz A bezeichnet). Die entsprechenden Mengen pro einfachen Ansatz können Tabelle 11 entnommen werden.

Transfer- Vektor	Verpackungs- Plasmid	Expressions- Plasmid	H ₂ O	CaCl ₂ [2,5 mM]	2 X HBSS
6,6 µg/Ansatz	5 µg/Ansatz	2,3 µg/Ansatz	250	27,5	275
			µl/Ansatz	µl/Ansatz	µl/Ansatz

Tabelle 11: Die eingesetzten Mengen der Plasmide, sowie die Mengen an Wasser, CaCl₂ und 2 x HBSS je einfachem Ansatz.

Danach wurde Ansatz A zu Ansatz B mittels einer elektronischen Pipettierhilfe überführt und der Ansatz mittels Luftausstoß in das Gefäß für einige Sekunden vermengt. Dabei präzipitierte die Lösung und band die Plasmide an das sich bildende Calciumphosphat. Bevor das Präzipitat zu den Zellen gegeben wurde, wurde diesen frisches Medium zugeführt. In das Medium wurde Chloroquin in einer Konzentration von 25 µM gegeben, um die

Transfektionseffizienz zu verbessern. Je Platte wurde daraufhin 500 µl des Präzipitates gegeben und durch kreisende Bewegungen auf der Platte vermengt. Die Ansätze wurden darauf für 24 Stunden kultiviert. Am Folgetag wurde das Transfektionsmedium abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde je Platte 4 ml frisches Medium zugegeben und für 48 Stunden im Inkubator kultiviert.

3.2.1.5.3. Infektion von Säugerzelllinien

Die zuvor hergestellten Lentiviren wurden, nach der 48-72 h-Inkubation von den Zellkulturschalen abgenommen und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Danach wurde die virale Lösung in eine Einmalspritze (25 ml) aufgenommen und mittels eines Filtropur S 0.45 µm-Filters gefiltert und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Das Virus-Medium-Gemisch wurde im Anschluss mit neuem Medium oder einem zweiten Lentivirus-Gemisch, je nach Versuchsansatz, vermischt. In die Ansätze wurde Hexadimethrine-bromide (Polybrene) (8 µg/ml) zur Steigerung der Infektionseffizienz im Verhältnis 1:1000 zugegeben. Entsprechend des Versuchsansatzes wurden dann die entsprechenden Zelllinien mittels Trypsin/EDTA von der Zellkulturflasche abgelöst und die Zellzahl unter dem Mikroskop mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die verwendete Zellzahl je 30 mm Zellkulturschale kann Tabelle 12 entnommen werden.

Zelllinie	Zellzahl/30 mm Zellkulturschale
HEK293/T17	200.000
H2C1	200.000
INS-1 832/13	500.000
INS-1ΔBRAF:ER	500.000

Tabelle 12: Die eingesetzten Zellzahlen der entsprechenden Zelllinien je 30 mm Zellkulturschale für die Infektion mit Lentiviren.

Nach dem Aufbringen des Virus-Gemischs auf die Zellkulturschalen wurden die Zellen zu den einzelnen Platten pipettiert und durch vorsichtige Kreisbewegungen gleichmäßig verteilt. Die Zellkulturschalen wurden für 24 h im Inkubator kultiviert. Am Folgetag wurde der virale Ansatz von den Zellen abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Nach 6-24 h wurde das Vollmedium abgenommen und durch Serum-reduziertes Medium ausgetauscht (Tabelle 13) und für 24 h inkubiert. Die Serum-Reduktion der HEK293 basierten Zelllinien erfolgte in serum-reduziertem DMEM-Medium. DME-Medium wurde für die Serum-Reduktion der INS-1 basierten Zelllinien verwendet.

Name	Zelllinie	Zusätze	Endkonzentration	
Serum-reduziertes DMEM-Medium	HEK293/T17	FCS	0,05 %	
	HEK293-TN	L-Glutamin	2 mM	
	H2C1	Penicillin	100 U/ml	
Serum reduziertes DME-Medium	INS-1 832/13	Streptomycin	100 µg/ml	
		FCS	0,5 %	
		INS-1ΔBRaf:ER	L-Glutamin	2 mM
		Penicillin	100 U/ml	
		Streptomycin	100 µg/ml	
Natriumpyruvat/	1 mM			
β-Mercaptoethanol	50 µM			

Tabelle 13: Die verwendeten Serum-reduzierten Medien für die Zelllinien HEK293/T17, HEK293-TN, H2C1, INS-1 und INS-1ΔBRaf:ER. Zusätzlich dargestellt sind die zugegebenen Agentien für die gebrauchsfertige Lösung.

3.2.1.6. RNA-Interferenz

Zur Reduktion der TRPV1-Expression in H2C1-Zellen wurde die Methode der RNA-Interferenz genutzt. Dazu wurde auf Grundlage der von Christoph et al. (2006) beschriebenen Sequenz eine „small hairpin RNA“ (shRNA) nach folgendem Protokoll erstellt: http://mcmanuslab.ucsf.edu/protocols/1137stemloop_design.pdf. Die shRNA setzte sich aus dem Sense- und dem Antisense-Strang zur TRPV1 mRNA zusammen. Verbunden waren diese durch eine Haarnadelstruktur bildende Nucleotid-Sequenz (s.h. Abbildung 9).

pLentiLox 3.7 (pLL3.7)

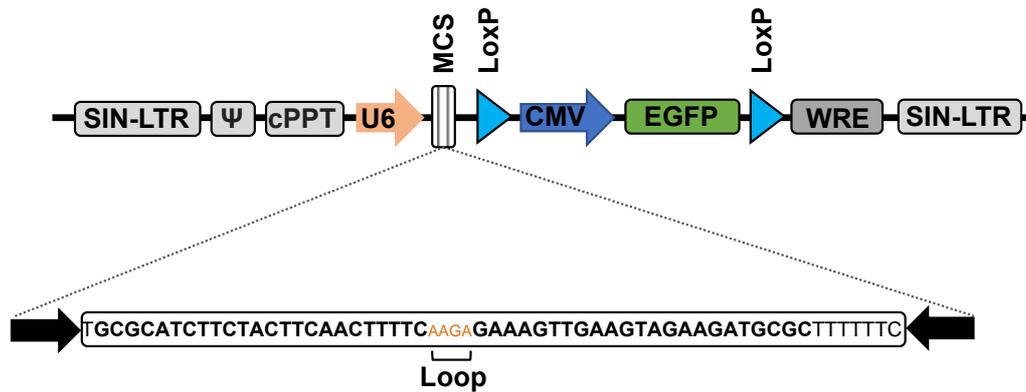


Abbildung 9: Ausschnitt des für shTRPV1 kodierenden lentiviralen Vektors pLL3.7

Der lentivirale Vektor pLentiLox (pLL3.7) diente als viraler Vektor zur Expression der TRPV1 shRNA. Die Sequenz des Sense- und Antisense-Stranges (fett hinterlegt), sowie die Loop-Sequenz und deren Insertion in die „Multiple Cloning Site“ (MCS) sind gezeigt. Als Promotor der Expression diente die murine Polymerase III U6. In 3'-Richtung war dieser ein „central polypurine tract“ (cPPT) für eine gesteigerte Transduktion vorangeschaltet. Das Ψ-Element des HIV diente als Verpackungssignal. Hinter der MCS waren, von zwei LoxP-Sequenzen eingerahmt, eine regulatorische Promotor-Region des Cytomegalovirus (CMV) zur Expressionssteigerung und eine Sequenz des grün fluoreszierenden Proteins (EGFP) geschaltet. Weiter in Richtung 5' war zur erhöhten Expression die Sequenz des „woodchuck hepatitis virus response element“ (WRE) lokalisiert. Sowohl in 3'-, als auch in 5'-Richtung war diese Sequenzfolge von einem „self-inactivating construct-long terminal repeat“ (SIN-LTR) umschlossen, welches als Schutzmaßnahme, die Generierung von wildtypischem Virus verhindern sollte. Die Abbildung wurde entnommen und verändert nach Rubinson et al., 2003.

Die in Abbildung 9 gezeigte shRNA-Sequenz wurde in die „Multiple Cloning Site“ (MCS) in den viralen Vektor pLentiLox 3.7 (pLL3.7) (siehe Tabelle 6) eingefügt. Zur Expression der shRNA diente der murine Polymerase III-Promotor U6, welcher der MCS vorangeschaltet war. Ein Nachweis der Expression der shRNA war durch die Expression des grün-fluoreszierenden Proteins (EGFP) gegeben. Der pLL3.7-shTRPV1-Vektor wurde dann wie in Kapitel 3.2.1.5 beschrieben, zur Generierung von für shTRPV1 kodierenden Lentiviren verwendet und H2C1-Zellen damit infiziert (s.h. Abbildung 10).

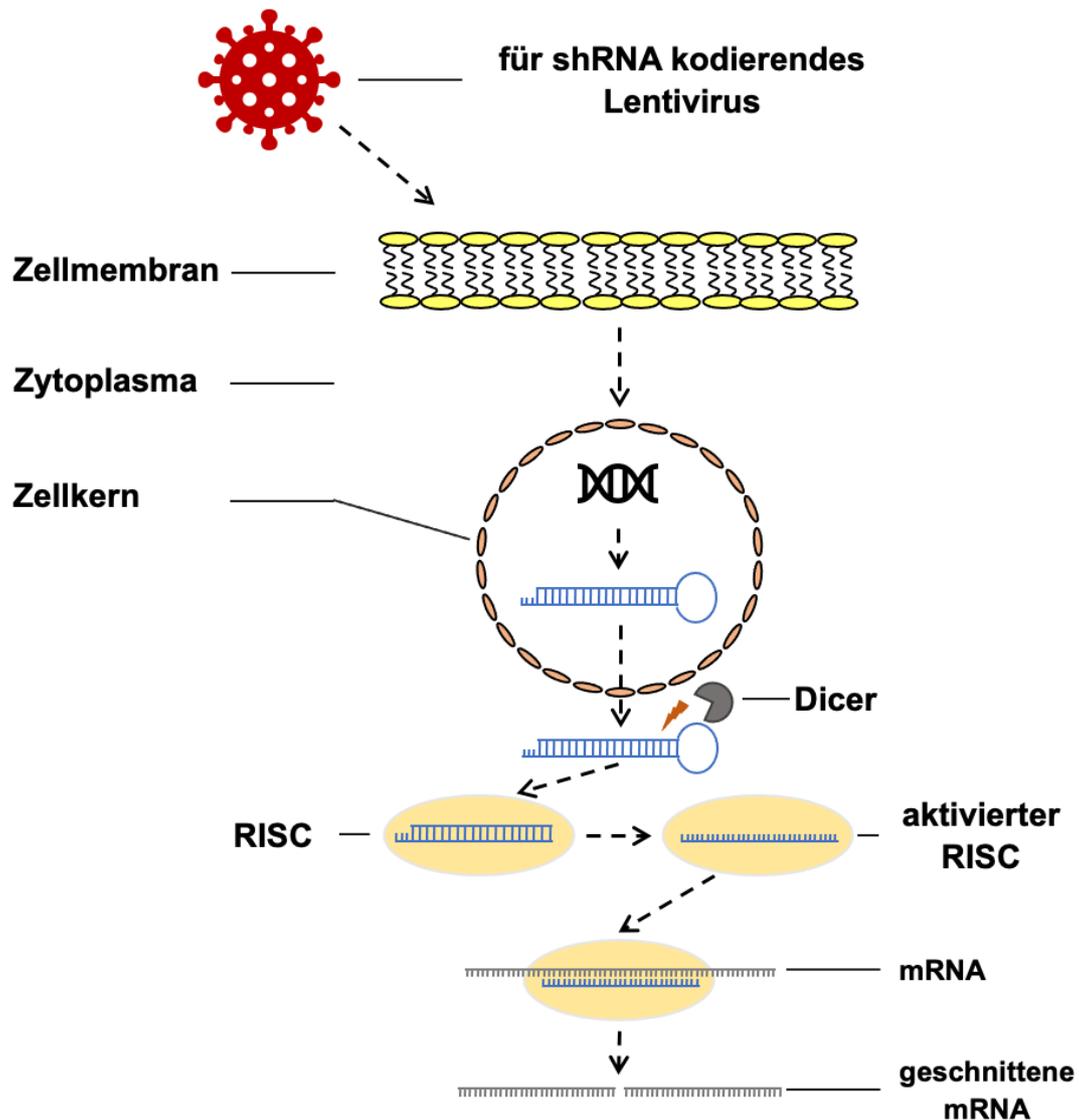


Abbildung 10: Die Wirkungsweise der small hairpin RNA in der Zelle

Das Lentivirus, welches für die shRNA kodiert, integriert nach der Infektion der Zelle die genetische Information für die shRNA in das Genom der Zelle. Durch die starken und konstitutiv aktiven Promotoren kommt es dann zu einer Expression der shRNA. Der Sense- und Antisense-Strang lagern sich zusammen und es bildet sich eine Haarnadelstruktur, da sich die Nucleotide an dieser Stelle nicht paaren können. Danach wird die dsRNA aus dem Zellkern geschleust und die Haarnadelstruktur von einem DICER abgespalten. Die dsRNA wird darauf in den „RNA induced silencing complex“ (RISC) aufgenommen. Hier lösen sich beide Stränge voneinander, wobei nur der Antisense-Strang im RISC verbleibt und dann komplementäre mRNA bindet. Kommt es zur Paarung, wird die erkannte mRNA aufgespalten und somit inaktiviert.

Nach der Infektion der Zielzelle und dem Integrieren der genetischen Information für die shRNA in das Genom wurde die shRNA exprimiert. Dabei lagerten sich der Sense- und der Antisense-Strang zusammen, wodurch sich die namensgebende Haarnadelstruktur zwischen diesen beiden Sequenzen ausbildete. Die noch unfertige shRNA wird dann aus dem Zellkern geschleust und die Haarnadelstruktur von der Ribonuklease Dicer abgespalten. In dessen Folge wurde die kurze dsRNA von einem „RNA induced silencing complex“ kurz RISC erkannt und in diesen integriert. In diesem Komplex kam es zum Aufspalten von Sense- und Antisense-Strang, wodurch nur noch ein einzelner Strang im RISC verblieb. Der nun aktive RISC-

Komplex war dadurch in der Lage, zu der in ihm enthaltenen RNA, komplementäre RNA zu binden und ein Aufspalten dieser zu bewirken. In der Folge kam es zu verringerter TRPV1-Bildung.

3.2.1.7. Stimulation und Inhibition von Säugerzelllinien

Nach der 24 stündigen Infektion der Zellen erfolgte die Stimulation bzw. Inhibition der Zellen mit den entsprechenden Pharmaka (Tabelle 14) in serumreduziertem Medium. Für die Inhibitionsversuche wurden die Zellen drei Stunden mit dem entsprechenden Inhibitor vorinkubiert.

Name	Konzentration	Lösemittel	Stimulans (S)/ Inhibitor (I)
2-APB	75 µM	DMSO	S/I
4OHT	200 nM	Ethanol	S
AMG 9810	50 µM	Ethanol	I
Capsaicin	10 µM	Ethanol	S
CNO	1 µM	Ethanol	S
NADA	10 µM	Ethanol	S
PD98059	50 µM	DMSO	I
RTX	5 nM	DMSO	S
Clotrimazol	2 µM	DMSO	-
BCTC	10 µM	DMSO	I
Progesteron	30 µM	DMSO	I
Pregnenolon	30 µM	DMSO	I
JNK-IN-8	1 µM	DMSO	I

Tabelle 14: Die verwendeten Stimulantien (S) bzw. Inhibitoren (I) mit ihren eingesetzten Konzentrationen und Lösemitteln.

Die Stimulation mit den agonistisch wirkenden Pharmaka erfolgte für 24 h. Im Falle der Versuche, in denen Inhibitoren eingesetzt wurden, fand eine Vorinkubation statt. Die Dauer der Vorinkubation ist den jeweiligen Versuchen im Ergebnisteil zu entnehmen. Folgte eine Stimulation, so blieb der Inhibitor für die Dauer der Stimulation auf den Zellen.

3.2.1.8. Reportergenanalyse

3.2.1.8.1. Gewinnung und Aufschluss der zellulären Proben

Die stimulierten bzw. inhibierten Zellen wurden nach 24 Stunden zur weiteren Analyse geerntet. Dazu wurde das Zellkulturmedium von den Schalen abgenommen und verworfen. Nach zweimaligem, vorsichtigem Waschen mit kaltem PBS (Tabelle 9) wurde zu den Zellen je 500 µl kaltes PBS pipettiert. Danach wurden die Zellen mittels Zellschaber von der Platte geschabt und mittels Pipette in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (gekühlt) überführt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 13 000 rpm (4 °C) wurde das überschüssige PBS abgenommen und verworfen. Zur weiteren Analyse konnten die Proben direkt weiterverwendet, oder bei – 20 °C konserviert werden.

Für die Analyse wurden die Proben mit Reporterlysepuffer versetzt und mehrmals mit etwas Kraft über ein feinmaschiges Metallgitter gezogen. Hierdurch wurden die Zellen mechanisch aufgeschlossen. Anschließend wurden die Proben erneut für fünf Minuten bei 13 000 rpm (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand enthielt das Lysat.

3.2.1.8.2. Luziferase-Assay

Bei einem Luziferase-Assay spaltet das Enzym Luziferase ein spezifisches Substrat und induziert dadurch die Emission von Lumineszenz. Die Intensität dieser Lumineszenz ist dabei direkt proportional zur vorhandenen Menge an Luziferase. Alle in dieser Arbeit verwendeten Reportergenkonstrukte kontrollierten die Expression der Luziferase. Die Aktivität der Luziferase, wurde mit einem Luminometer gemessen.

Zur Messung der Luziferase Aktivität wurde jeweils 5 µl des Zelllysats auf eine weiße 96 Lochplatte aufgetragen und mit jeweils 50 µl Luziferasesubstratlösung versetzt. Die Zusammensetzung der Luziferasesubstratlösung kann der Tabelle 15 entnommen werden. Für die gebrauchsfertige Lösung wurde 1 ml D-Luziferin-Natriumsalz auf 9 ml Luziferasesubstratlösung gegeben. Je nach untersuchtem Probenotyp unterschieden sich die zugegebenen Volumina der Luziferasesubstratlösung. Die Proben wurden daraufhin in einem Luminometer vermessen und die Luziferaseaktivität bestimmt.

Name	Konzentration	pH-Wert
(MgCO ₃) ₄ Mg(OH) ₂ 5 x H ₂ O	1,177 Mm	-
ATP	583 µM	-
Coenzym A (CoA)	297 µM	-
DTT	36,3 mM	-
EDTA	110 µM	-
MgSO ₄ 7xH ₂ O	2,94 mM	-
Tricine	22 mM	7,8
→ D-Luziferin Natriumsalz		

Tabelle 15: Die enthaltenen Verbindungen der Luziferasesubstratlösung mit ihren jeweiligen Konzentrationen und dem pH-Wert.

3.2.1.8.3. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure Assay (BCA)

Der Bicinchoninsäure Assay ist eine Standardmethode zur Bestimmung einer unbekanntes Proteinmenge in einer Lösung. Dabei wird Bicinchoninsäure im Verhältnis 1:50 mit Kupfersulfat gemischt, wobei eine grünliche Lösung entsteht, die in Verbindung mit Proteinen einen Komplex bildet. Diese Komplex-Bildung ist direkt proportional zur vorhandenen Proteinkonzentration und führt zu einer lila gefärbten Lösung, welche ihr Absorptionsmaximum bei 570 nm hat und somit photometrisch gemessen werden kann.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Proben auf eine transparente 96 Lochplatte pipettiert (12,5 µl) und mit jeweils 100 µl der BCA-Lösung versetzt. Um die genaue Konzentration der Proben bestimmen zu können wurde eine Verdünnungsreihe mit „Bovinen Serum Albumin“ (BSA) bekannter Konzentration erstellt. Mittels linearer Regression konnte somit Rückschluss auf die unbekanntes Konzentrationen in den Proben geschlossen werden. Der Standard wurde in gleicher Weise auf die 96 Lochplatte aufgetragen und mit BCA-Lösung versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Platte in einem Multiplaterereader vermessen. Zur weiteren Berechnung wurden die Rohdaten der Messung verwendet.

3.2.1.8.4. Relative Luziferase Aktivität

Die erhaltenen Werte der Luziferase-Messung wurden zu den jeweiligen Werten der Proteinkonzentrationsmessung ins Verhältnis gesetzt. Nach der Mittelung der Werte wurde der jeweilige Protein/Luziferin-Wert auf diesen Mittelwert normiert. Die nicht stimulierten Kontrollen wurden gleich eins gesetzt und die stimulierten Werte dazu ins Verhältnis gesetzt. Es ergab sich ein Faktor, der hier als relative Luziferase-Aktivität bezeichnet wird. Die Standardabweichungen und die Signifikanzen (zweiseitiger Student's t-test) der Proben wurde rechnerisch ermittelt. Zur Auswertung aller in dieser Arbeit dargestellten Daten, wurde Microsoft Excel verwendet.

3.3. Proteinbiochemische Methoden

3.3.1. MTT-Assay

Der MTT-Assay ist ein klassischer Test zur Bestimmung der Zellaktivität. Dabei wird das Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid) in das Nährmedium einer Zellkultur gegeben. Das MTT wird von den Zellen aufgenommen und von NAD(P)H abhängigen Oxidreduktasen zu Formazan reduziert. Formazan ist wasserunlöslich und führt zu einer violetten Färbung der Zellen (Berridge et al., 2005). Die Intensität der violetten Färbung ist proportional zur Zellaktivität und kann in einem Multiplaterereader photometrisch vermessen werden.

Zur Bestimmung der MTT-Aktivität wurden auf eine transparenten 96 Lochplatte 5000 HEK293-Zellen bzw. 10 000 INS-1 832/13-Zellen respektive, pro Loch ausgesät und mit jeweils 200 µl des entsprechenden Mediums versetzt. Nach 48-stündiger Kultivierung im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das Medium abgenommen und durch Serum-reduziertes Medium ersetzt. Nach 24 Stunden wurde das Serum-reduzierte Medium abgenommen und erneuert. Das frische Medium war mit den zu testenden Pharmaka versetzt. Nach weiteren 24 Stunden wurde zu jeder der einzelnen Proben 20 µl der MTT-Lösung (MTT-Stocklösung: 5 mg/ml) pipettiert und für zwei Stunden inkubiert. Bei stoffwechsel-aktiven Zellen konnte die Bildung der Formazan-Kristalle unter dem Mikroskop beobachtet werden. Nach der zweistündigen Inkubationsdauer wurde das Medium/MTT-Gemisch entfernt und durch 200 µl DMSO zum Lösen der Kristalle ersetzt. Nach weiteren 10 Minuten wurden die Proben bei 570 nm vermessen. Zur Korrektur des Hintergrundes wurde eine zweite Messung bei 620 nm durchgeführt. Bei der Auswertung der Daten wurde der Hintergrund von der

Messung bei 570 nm subtrahiert. Die nicht stimulierten Kontrollen wurden gleich 100 % gesetzt und die stimulierten Proben darauf bezogen. Standardabweichung und Signifikanz wurden mittels Microsoft Excel ermittelt.

3.3.2. Caspase 3/7-Assay

Der Caspase 3/7-Assay ist eine Methode zur Bestimmung von apoptotischen Prozessen *in vitro*. Dazu wird auf eine definierte Zellzahl ein Substrat gegeben, welches durch die gespaltene und somit aktive Form der Caspasen 3 und 7 umgesetzt werden kann. Die Umsetzung des Substrates führt zu einer Emission von Licht, welche in einem Luminometer gemessen werden kann. Die gemessene Menge an emittiertem Licht ist dabei proportional zur Apoptoserate der untersuchten Zellen.

Zur Bestimmung der Apoptoserate wurden die entsprechenden Zellen auf eine 35 mm Zellkulturschale ausgesät (570.000 Zellen/Zellkulturschale) und für 24 Stunden im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂) kultiviert. Danach wurde das Medium abgenommen und durch Serum-reduziertes Medium ersetzt und mit den entsprechend zu untersuchenden Pharmaka versetzt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Proben, wie in Kapitel 3.2.1.8.1 beschrieben, gewonnen. Durch die Zugabe des Caspase-Lysepuffers (Tabelle 16) wurden die Zellen für den Aufschluss vorbereitet und danach mechanisch aufgeschlossen. Die Proben wurden stets mit Eis gekühlt. Im Anschluss an den mechanischen Aufschluss wurden die Zellen für fünf Minuten bei 7000 rpm (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration mittels BCA-Assay (siehe Kapitel 3.2.1.8.3) bestimmt. Danach wurden die Proben auf 1 µg/µl mit Caspase-Lysepuffer eingestellt und dann wiederum auf 100 ng/µl mit Caspase-Proteinpuffer (Tabelle 16) verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden 10 µl auf eine weiße 96 Lochplatte pipettiert und mit 10 µl Caspase-Substratlösung der Firma Promega (Caspase-Glo® 3/7 Assay Systems) inkubiert. Nach 60 Minuten (Raumtemperatur) wurde die Platte in ein Luminometer gegeben und vermessen. Die gemessenen Werte wurden dann statistisch mit Microsoft Excel ausgewertet. Die nicht stimulierten Kontrollen wurden gleich 100 % gesetzt und die stimulierten Proben auf diese bezogen.

Puffer	Stoff	Konzentration	pH-Wert
Caspase-Lysepuffer	cOmplete™	1 x	
	MgCl ₂	10 mM	
	NaCl	150 mM	
	NP-40	0,5 %	
	Tris-HCl	10 mM	7,4
Caspase-Proteinpuffer	DTT	1 mM	
	Glycerin	5 %	
	KCl	10 mM	
	Tris-HCl	50 mM	7,4

Tabelle 16: Die Konzentrationen des Caspase-Lysepuffers und des Caspase-Proteinpuffers mit ihrer jeweiligen Zusammensetzung und pH-Wert.

3.3.3. Western Blot

3.3.3.1. Aufschluss von Zellen zur Western Blot Analyse

Die Zellen wurden zu je 1,5 Millionen Zellen pro 60 mm Zellkulturschale ausgesät und mit Zellkulturmedium versetzt. Die Zellen wurden in Serum-reduziertem Medium kultiviert und die entsprechenden Stimulantien zugegeben. Die Ernte der Zellen folgte dem in Kapitel 3.2.1.8.1 beschriebenen Prinzip.

Um zytoplasmatische Proteine nachzuweisen, wurden die Zellen mit Puffer A (Tabelle 17) versetzt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Alle fünf Minuten wurden diese dann über ein Metallgitter gezogen. Danach folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 4 °C und 13000 rpm. Der Überstand enthielt die zytoplasmatische Fraktion und konnte direkt zum Protein-Nachweis verwendet oder bis zum späteren Gebrauch bei -80 °C eingefroren werden. Die Zellkerne mit ihren enthaltenen Proteinen waren im entstandenen Pellet lokalisiert, und wurden mit Puffer C (Tabelle 17) versetzt. Danach wurden die Proben für 20 Minuten (4 °C) alle fünf Minuten mechanisch aufgeschlossen. Nach dem Aufschluss wurden die Proben bei 13000 rpm (5 min) zentrifugiert. Im Überstand befanden sich die nukleären Proteine. Zur weiteren Verwendung wurden die Konzentrationen der Proben mittels BCA (Kapitel 3.2.1.8.3) bestimmt.

Puffer	Stoff	Konzentration	pH-Wert
Puffer A	cOmplete™	1x	
	DTT	1 mM	
	EGTA	1 mM	
	Glycerol	10 %	
	HEPES-KOH	10 mM	7,9
	KCl	10 mM	
	MgCl ₂	1,5 mM	
	NP40	1 %	
Puffer C	cOmplete™	1 x	
	DTT	1 mM	
	EDTA	200 µM	
	Glycerol	10 %	
	HEPES-KOH	10 mM	7,9
	MgCl ₂	1,5 mM	
	NaCl	500 mM	
	Triton-X-100	0,5 %	

Tabelle 17: Die Zusammensetzung der Pufferlösungen A und C mit ihren jeweiligen Stoffkonzentrationen und pH-Werten.

Danach wurden die Proben zu gleichen Konzentrationen auf ein SDS-Gel aufgetragen.

3.3.3.2. SDS-Gel

Vor dem Auftragen der Proben auf das SDS-Gel wurden diese mit 6 x SDS PAGE Loading Dye verdünnt. Durch das SDS wurden die Proteine in der Probe negativ geladen und konnten entsprechend ihrem Molekulargewicht im Gel aufgetrennt werden. Der SDS PAGE besteht aus zwei Gelbereichen. Das obere Sammelgel (Tabelle 18), in dem die Proben gesammelt und auf die gleiche Laufhöhe gebracht werden und das darunterliegende Trenngel (Tabelle 18), in dem die Proteine ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt werden.

Gel	Stoff	Konzentration	pH-Wert
Sammelgel	Tris	125 mM	8,9
	SDS	0,1 %	
	Rotiphorese 30 %	3,5 %	
	→ auf 10 ml auffüllen mit H ₂ O		
	→ Zugabe von 0,1 % APS (10 %) und 1 % TEMED		
Trenngel	Tris	375 mM	8,9
	SDS	0,1 %	
	Rotiphorese 30 %	10 %	
	→ auf 10 ml auffüllen mit H ₂ O		
	→ Zugabe von 0,1 % APS (10 %) und 1 % TEMED		

Tabelle 18: Die Zusammensetzungen des Sammel- und Trenngels mit ihren entsprechenden pH-Werten.

Zum Polymerisieren des Gels wurde wie in Tabelle 18 dargestellt TEMED und APS zugegeben. Das Gel wurde in eine Apparatur eingespannt und diese mit 10 x Lämmli-puffer (Tabelle 19) aufgefüllt und ein elektrisches Feld angelegt. Die Proben wanderten nun von der Kathode zur Anode.

Puffer	Stoff	Konzentration
10 x Lämmli-puffer	Tris	248 mM
	Glycin	1,92 M
	SDS (10 %)	0,1 %

Tabelle 19: Die Zusammensetzung des 10 x Lämmli-puffers mit den dazugehörigen Konzentrationen.

3.3.3.3. Das Tank-Blot Verfahren zur Proteinauftrennung

Nachdem die Proteine in der SDS PAGE aufgetrennt wurden, wurde das Gel auf eine Nitrozellulose-Membran gegeben und von beiden Seiten mit „Whatman“-Papier umschlossen. Dieses Papier wurde zuvor in Transferpuffer (Tabelle 20) getränkt. Das entstandene „Gel-Membran-Whatman“-Paket wurde in eine Vorrichtung eingespannt und in einen ebenfalls mit Transferpuffer gefüllten Behälter geschoben und über Nacht bei 50 mA laufen gelassen. Durch die angelegte Spannung wurden die Proteine auf die Membran übertragen und dort fixiert.

Puffer	Stoff	Konzentration
Transferpuffer	Tris	2,48 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	20 %

Tabelle 20: Zusammensetzung des Transferpuffers und die dazugehörigen Konzentrationen.

Am Folgetag wurde die Membran mit destilliertem Wasser gewaschen und die Proteine mittels einer Ponceau-Lösung angefärbt. Die Ponceau-Färbung zeigte, ob das Transferieren der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran erfolgreich war. Durch Waschen mit destilliertem Wasser wurde die Ponceau-Färbung wieder entfernt. Im Anschluss wurde die Membran mittels 4 % Magermilch-Lösung in 1x TBST (Tabelle 21) für eine Stunde geblockt, um das Binden der Antikörper an die Membran zu verhindern.

Puffer	Stoff	Konzentration	pH-Wert
10X TBS	NaCl	1,5 M	
	Tris	0,1 M	8,0
	→ Auffüllen auf 1 L mit H ₂ O dd		
	→ Für 1x TBST Zugabe von 500 µl Tween 20 zu 1 L 1x TBS		

Tabelle 21: Zusammensetzung des 10x TBS-Puffers mit seinen entsprechenden Konzentrationen und dem jeweiligen pH-Wert. Zusätzlich ist die Zusammensetzung des 1x TBST angegeben.

3.3.3.4. Proteinnachweis mittels Antikörper

Nach dem Blockvorgang der Membran wurde die Blockier-Lösung mittels eines 1x TBST-Waschschriffs entfernt und der entsprechende primäre Antikörper (siehe Tabelle 2), welcher in 1x TBST verdünnt wurde (Tabelle 21), auf die Membran gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Danach wurde der primäre Antikörper entfernt und die Membran durch dreimalige Wiederholung mit 1x TBST gewaschen. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper (1:5000 in 1x TBST) hinzugegeben und für 2 ½ h inkubiert. Nach der Inkubation folgte wieder dreimaliges Waschen mit 1x TBST. Im Anschluss daran wurde die Membran mittels optischer Messverfahren betrachtet und dokumentiert. Dazu wurde entsprechend des Protokolls „SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity“-Substrate auf die Membran gegeben und dann mittels des „ChemiDoc™ XRS+ Systems“ detektiert.

3.3.4. Bestimmung der zytoplasmatischen Calcium-Ionen-Konzentration mittels Fura-2

Die Bestimmung der zytoplasmatischen Calcium-Ionen-Konzentration mittels Fura-2 wurde wie in Backes et al. (2018) beschrieben von Dr. Xin Hui, Institut für Zellbiologie, Universität des Saarlandes, durchgeführt.

3.3.5. Gewinnung von RNA und reverse Transkription

Die Methodik der RT-PCR wurde zur Untersuchung der Genexpression verwendet. Hierzu wurde aus den Zellen zunächst die RNA isoliert und danach mittels reverser Transkription (RT-PCR) in cDNA umgeschrieben und durch PCR vervielfältigt.

Zur Isolation der RNA aus den Zellen wurden diese zunächst mittels einer 0,25 % Trypsin-Lösung von der Platte abgelöst. Zur Gewinnung der RNA wurde im Anschluss das RNeasy Micro Kit der Firma Qiagen verwendet. Das zuvor gewonnene Zellpellet (Zentrifugation für fünf Minuten bei 13.000 rpm und 4 °C) wurde durch Auftragen auf eine „QIAshredder“-Säule homogenisiert. Vor dem Auftragen auf die „QIAshredder“-Säule wurde das Zellpellet mit 350 µl „RLT Puffer“ lysiert und anschließend auf die „QIAshredder“-Säule gegeben und zwei Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die weiteren Schritte folgten dem Protokoll des Herstellers zur Isolation von RNA aus Zellkultur (siehe Qiagen RNeasy Micro Kit Protokoll). Die isolierte RNA stand dann für weitere Anwendungen zur Verfügung und wurde nach der Konzentrationsbestimmung bei – 80 °C konserviert. Alle Schritte wurden (soweit nicht anders angegeben) entgegen dem Protokoll auf Eis durchgeführt und in Kühlzentrifugen bei 4 °C zentrifugiert.

3.3.5.1. Erststrang cDNA-Synthese (RT-PCR)

Die zuvor gewonnene RNA wurde mittels der RevertAid Reverse Transcriptase von ThermoFisher in cDNA umgeschrieben.

Im ersten Schritt wurde die Template-RNA (1 µg) mit Random Hexamer Primern und DEPC behandeltem Wasser versetzt (Tabelle 22) und für 2 Minuten bei 65 °C (unter Berücksichtigung GC reicher Sequenzen) vorinkubiert.

Template	Totale RNA → 1 µg
Primer	Random Hexamer Primer → 0,2 µg
Endvolumen	Auf 12,5 µl mit H ₂ O (DEPC) auffüllen

Tabelle 22: Der erste Reaktionsansatz zur Erststrang cDNA Synthese. Angegeben sind die Menge des verwendeten Random Hexamer Primers, sowie die Menge an einzusetzender Template-RNA. Der Ansatz wurde mit DEPC behandeltem Wasser auf ein Endvolumen von 12,5 µl aufgefüllt.

Nach der angegebenen Inkubationszeit wurde zu diesem Ansatz der in Tabelle 23 aufgelistete zweite Ansatz hinzugegeben, wodurch sich ein Endvolumen von 20 µl ergab.

5 x Reaction Buffer	4 µl
RiboLock RNase Inhibitor	0,5 µl
dNTP Mix (10 mM jeweils)	2 µl
RevertAid Reverse Transcriptase	1 µl
Endvolumen	20 µl

Tabelle 23: Der zweite Reaktionsansatz der Erststrang cDNA-Synthese. Zum ersten Ansatz aus Tabelle 22 wurde 5 x Reaction Buffer, RiboLock RNase Inhibitor, dNTP Mix und RevertAid Reverse Transcriptase in den angegebenen Volumina hinzugegeben. Beide Reaktionsansätze ergaben ein Endvolumen von 20 µl für eine einfache Reaktion.

Entsprechend der Herstellerangabe wurde der fertige Ansatz erst für 10 Minuten bei 25 °C inkubiert und anschließend für 60 Minuten bei 42 °C. Um die Reaktion zu beenden, folgte eine 10-minütige Inkubation bei 72 °C. Anschließend konnte die gewonnene cDNA für Folgeuntersuchungen mittels PCR verwendet werden.

3.3.6. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die DNA wurde zunächst bei 95 °C denaturiert. In der folgenden Annealing-Phase, konnten sich die Primer an ihre komplementären DNA-Sequenzen anlagern. Die Temperatur war abhängig von den verwendeten Primern und dem GC-Gehalt. Im nächsten Schritt, der Elongations-Phase, wurden die komplementären Stränge von der Taq-Polymerase synthetisiert. Je nach gewünschter Produktmenge wurden diese Schritte beliebig oft wiederholt. Die so entstandenen DNA-Fragmente konnten mittels eines Agarose-Gels aufgetrennt und nachgewiesen werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 24 dargestellt.

Zielgen	Orientierung	Primer Sequenz (5' - 3')	Fragment- größe (bp)	Annealing (°C)	Zyklenzahl
hTRPV1 #1	forward	AAG GGT GAC TCG GAG GAG	194	60	27
	reverse	CTG CGA TCA TAG AGC CTG AGG			
hTRPV1 #2	forward	CTG CCC GAC CAT CAC AGT C	132	60	27
	reverse	CTG CGA TCA TAG AGC CTG AGG			
β-Gal	forward	CAA ACC ATC GAA GTG ACC AG	389	62	35
	reverse	CCT GAC TGG CGG TTA AAT TG			
rtTA	forward	GTG AAG TGG GTC CGC GTA CAG	391	62	35
	reverse	GTA CTC GTC AAT TCC AAG GCA TCG			
REST/ Elk-1ΔC	forward	CTG CCA TTT ACT TCC CCA GTT A	272	62	35
	reverse	GAT TAC AAG GAT GAC GAT GA			
A-Fos	forward	CCA CGC TGT TTT GAC CTC CAT AG	700-800	64	35
	reverse	ATT CCA CCA CTG CTC CCA TTC			

Tabelle 24: Primersequenzen zum Nachweis spezifischer mRNAs mittels RT-PCR. Angegeben sind ihre Orientierung in 5'-3'-Richtung mit den dazugehörigen Sequenzen und die zu erwartenden Größen der Amplifikate. Zusätzlich sind die Temperaturen der Annealing Phase in °C angegeben.

Die PCR Bedingungen für eine einfache PCR-Reaktion folgten den Angaben des Herstellers der Taq Polymerase (New England Biolabs) und können der Tabelle 25 entnommen werden.

Komponente	Konzentration	Volumen
Thermopol Reaction Buffer	10 x	2,5 µl
dNTPs	10 mM	0,5 µl
Primer Forward	10 µM	0,5 µl
Primer Reverse	10 µM	0,5 µl
Template	-	1 µl
Taq Polymerase	-	0,125 µl
H ₂ O (nukleasefrei)	Auf 25 µl mit H ₂ O auffüllen	

Tabelle 25: Die Zusammensetzung des Ansatzes für eine einfache PCR-Reaktion mit ihren jeweiligen Konzentrationen und Volumina mit einem Endvolumen von 25 µl.

Der so hergestellte PCR-Reaktionsansatz wurde, wie in Tabelle 26 gezeigt, mittels eines „PCR-Cyclers“ inkubiert. Entsprechend der verwendeten Primer und Template ergaben sich unterschiedliche Anzahlen von Zyklen, welche der Tabelle 24 entnommen werden können. Die entstandenen Amplifikate wurden entweder direkt mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt oder zur weiteren Verwendung eingefroren (-80 °C).

Zyklusphase	Temperatur (°C)	Dauer (S)
Denaturierung	95 °C	30
Annealing	siehe Tabelle 24	30
Elongation	68 °C	30

Tabelle 26: Zyklenzahl und Temperatur der PCR-Reaktionen.

3.3.7. Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Zum Nachweis der mittels PCR amplifizierten DNA-Sequenzen wurde eine Gelelektrophorese mit einem Agarosegel durchgeführt. Die in dieser Arbeit nachgewiesenen Amplifikate wurden mit einem 1,5 % Agarosegel detektiert. Dabei wurde 0,9 g Biozym LE Agarose in 60 ml TAE-Puffer (Tabelle 27) gelöst. Die Lösung wurde dazu immer wieder in einer Mikrowelle aufgeköcht, bis die entstandene Lösung keine Klumpen mehr aufwies.

Substanz	pH-Wert	Konzentration
Essigsäure	-	0,114 %
TRIS	-	40 mM
EDTA	8,0	1 mM

Tabelle 27: Zusammensetzung des TAE-Puffers.

Nach 10 Minuten war die Lösung so weit abgekühlt, dass sie mit Ethidiumbromid (5 mg/ml) versetzt und zum Abkühlen in eine Gelkammer gegossen wurde. Nach dem Aushärten des Gels wurden die in PCR-Proben mit „Purple Loading Dye“ (1:5) in die Taschen des Gels pipettiert. Das ausgehärtete Gel wurde mit TAE bedeckt und eine Spannung von 70 mV angelegt. Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurde das Gel mittels des ChemiDoc™ Imagingsystems der Firma Bio-Rad UV-Licht ausgesetzt und dokumentiert. Zur Bestimmung der Größe der Amplifikate (Tabelle 24) wurde 5 µl eines Größenstandards (GeneRuler 100 bp Plus) auf das Gel aufgetragen.

3.4. Mausexperimente

3.4.1. Regularien der durchgeführten Mausexperimente

Die Mausexperimente waren durch das Landratsamt des Saarpfalz-Kreises genehmigt worden. Die Aktenzeichen der Genehmigungen können der Tabelle 28 entnommen werden. Die Zucht der Mäuse wurde in den Tierställen des Institutes für Klinisch-Experimentelle Chirurgie durchgeführt. Dabei erfolgte die Haltung der Tiere den entsprechenden EU-Regularien, welche auf dem „NIH Guide for Grants and Contracts“ (Vol. 14, No. 8, 25 Jun 1985. Special Edition: Laboratory Animal Welfare) beruhen.

Mauslinie	Aktenzeichen der Genehmigung
[tetO] ₇ REST/EIk-1ΔC	2.4.2.2/29-2015
RIP	2.4.2.2
[tetO] ₇ A-Fos	C-12.4.2.2/49-2013

Tabelle 28: Aktenzeichen der genehmigten Mauslinien.

Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen bei 20-24 °C und einer Luftfeuchtigkeit zwischen 50 und 60 % gehalten. Die sterilisierten Makrolonkäfige mit Einstreu waren dabei an ein Belüftungssystem angeschlossen und garantierten keimfreie Bedingungen. Jederzeit war der Zugang zu Wasser und Haltungsdiätfutter (Altromin, Lage) garantiert. Bei Zuchtverpaarungen kam spezielles Zuchtdiätfutter (Altromin, Lage) zum Einsatz. Ein Rhythmus von Tag/Nacht (12h / 12h) wurde eingehalten.

Entsprechend der Tierschutzrichtlinie der UdS wurden die durchgeführten Experimente von der Tierschutzbeauftragten Dr. med. vet. Monika Frings überwacht. Für die Durchführung der Tierversuche wurden die notwendigen Module 1-3 der Versuchstierkunde wahrgenommen und weiterführende Vorträge besucht.

Die für die Versuche verwendeten Tiere waren zwischen 10 und 14 Wochen alt und erhielten eine Doxycyclin (1 mg/ml)/0,8 % Sucrose-Lösung ad libidum. Die Kontrolltiere erhielten eine 0,8 % Sucrose Lösung.

3.4.2. Das bakterielle Tetracyclin-Resistenz-System

In bestimmten Bakterien existiert ein Regulationsmechanismus, welcher es ihnen ermöglicht, Resistenzen gegen Tetracyclin auszubilden. Dabei wird in den entsprechend resistenten Bakterien in Anwesenheit von Tetracyclin ein Gen exprimiert, welches den aktiven Transport des Antibiotikums aus der Zelle ermöglicht. Dieses *tetA* steht unter der Kontrolle eines Repressors, dem *tetR*. Dieser unterdrückt in Abwesenheit des Tetracyclins die Expression des *tetA*-Gens. Notwendig wird dies dadurch, dass die Produktion des Tetracyclin-Exporters einen evolutionären Wachstumsnachteil zur Folge hat, weshalb eine geregelte Expression notwendig ist. In Anwesenheit des Tetracyclins bindet dieses an das *tetR*-Protein, wodurch es zu einer Konformationsänderung des Repressors kommt und dieser nicht mehr an seine Bindestellen im Promotorbereich des *tetA*, dem sogenannten Tet-Operator (*tetO*), binden kann (Hillen und Berens, 2002).

3.4.3. Das Tet-Expressionssystem

Das bakterielle Tetracyclin-Resistenz-System war der Ausgangspunkt für ein System zur induzierbaren Regulation eukaryotischer Gene und wurde 1992 von Gossen und Bujard erstmals beschrieben (Gossen und Bujard, 1992). Es handelt sich dabei um eine abgewandelte Form des nativen bakteriellen Kontrollsystems. Dabei wurde das Tet-Repressor-Molekül mit der transkriptionellen Aktivierungsdomäne des VP16-Transaktivators

des Herpes-Simplex-Virus fusioniert, wodurch das Fusionsprotein tTA entstand. Dieses war in der Lage, spezifisch an *tetO*-Sequenzen zu binden. Durch die Gabe von Tetracyclin oder seines Derivates Doxycyclin wurde die Bindung des Transaktivators tTA an seine Zielsequenz verhindert und die Expression des Zielgens konnte nicht stattfinden (Gossen und Bujard, 1992). Dieses System wurde als Tet-Off-System beschrieben.

3.4.3.1. Das reverse Tet-Expressions-System (Tet-On System)

Bei der Betrachtung entwicklungsbiologischer Prozesse kann es sinnvoll sein, dass eine Änderung der Genexpression durch die Gabe von Doxycyclin induziert werden kann. Dieses System ist als Tet-On-System bekannt. Um die Genexpression durch Gabe von Doxycyclin zu steuern, wurde das tTA-Fusionsprotein so mutiert, dass es erst dann zu einem Anschalten der Genexpression von Zielgenen kam, wenn Doxycyclin appliziert wurde (Gossen et al., 1995). Das so entstandene reverse tTA wurde als rtTA bezeichnet (Abbildung 11). Um eine verstärkte Expression zu erreichen, waren der TATA Box des Zielgens sieben *tetO*-Kopien vorangeschaltet.

Das Tet-On-System fand, bei der in dieser Arbeit dargestellten Tierversuche, seine Anwendung.

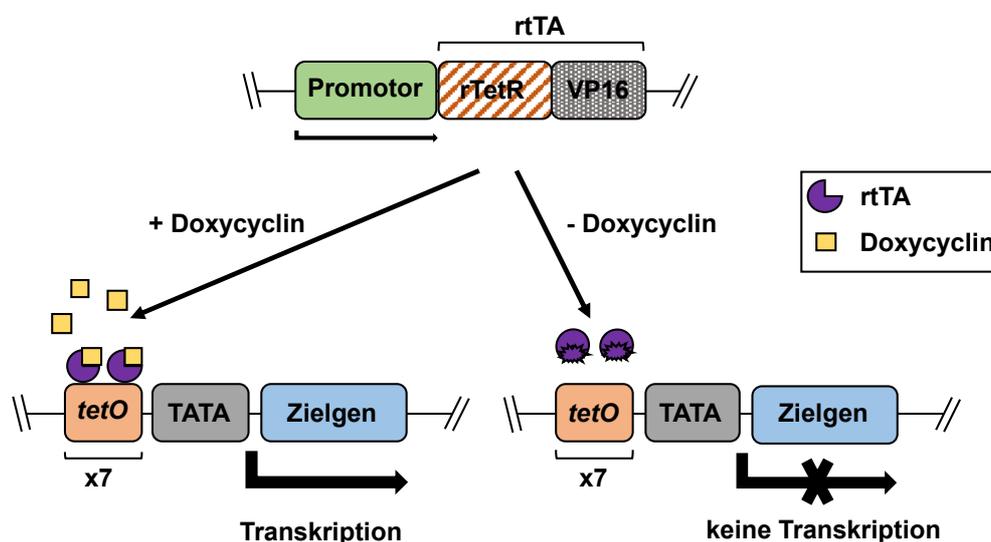


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Tet-On Systems zur gezielten Induktion der Genexpression.

Der reverse Tet-Repressor (rTetR) ist mit der Transaktivator-Domäne des VP16-Proteins des Herpes simplex Virus fusioniert. Das rtTA-Protein kann nur bei Anwesenheit von Doxycyclin an die Tet Operatoren (*tetO*) binden und die Expression des Zielgens induzieren (linker Teil). Fehlt Doxycyclin, so kann rtTA nicht an die Tet-Sequenz binden (rechter Teil). Diese Abbildung wurde verändert nach Gossen et al., 1995.

3.4.4. Transgene Mäuse

3.4.4.1. Transgene $[tetO]_7$ REST/Elk-1 Δ C-Mäuse

Die Generierung der $[tetO]_7$ REST/Elk-1 Δ C-Mäuse wurde von Rössler et al. (2016) beschrieben. In Abbildung 12 wird die Transkriptionseinheit beschrieben, welche in das Genom der Mäuse integriert worden war. Sowohl das Transgen REST/Elk-1 Δ C als auch die Kodierregion der β -Galactosidase standen unter der Kontrolle des bidirektionalen $[tetO]_7$ Promotors. Das Binden des reversen Transaktivators rtTA aktivierte den Promotor (siehe 3.4.3.1), wodurch es zur gleichzeitigen Expression beider Transgene kam. Der Nachweis einer aktiven Expression von REST/Elk-1 Δ C konnte somit indirekt über den Nachweis der Expression der β -Galaktosidase mittels PCR erfolgen. Die Expression der β -Galaktosidase wurde zusätzlich im Western Blot und histochemisch nachgewiesen. An Elk-1 regulierten Genen konnte das REST/Elk-1 Δ C-Protein die Elk-1-Bindestellen blockieren. Die TCF-Proteine Elk-1, SAP-1 und SAP-2 sind stark homolog, wodurch das REST/Elk-1 Δ C-Protein die transkriptionelle Aktivität von allen drei TCFs unterbinden kann.

Somit konnten diese Mäuse für die Betrachtung von Fragestellungen herangezogen werden, in denen die Rolle von TCF's auf die Transkription untersucht werden sollte.

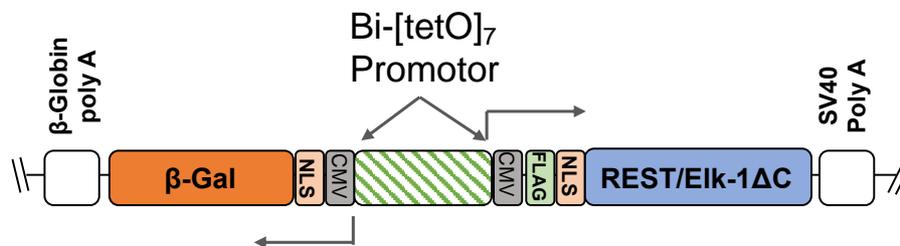


Abbildung 12: Schematischer Aufbau der Transkriptionseinheit des REST/Elk-1 Δ C-Transgens.

Der Aufbau der REST/Elk-1 Δ C-Transkriptionseinheit, mit ihrem bidirektionalen Promotor (Bi-[tetO]₇). Die CMV-Elemente waren Minimalpromotoren und dienten als Startpunkt der Transkription. Beide Gene verfügten über ein „nuclear localisation signal“ (NLS). Dem REST/Elk-1 Δ C-Gen war zusätzlich ein FLAG Tag zum besseren Nachweis, mittels Western Blot, vorangestellt. Zur Transkriptionstermination befand sich hinter dem β -Galaktose kodierenden Gen ein Poly A Schwanz des β -Globins. Hinter REST/Elk-1 Δ C war ein Poly A Schwanz des Simian-Virus 40 (SV40) geschaltet. Die Abbildung wurde verändert nach Rössler et al. 2016.

3.4.4.2. Transgene $[tetO]_7$ A-Fos-Mäuse

Die $[tetO]_7$ A-Fos-Mäuse wurden freundlicherweise von Charles Vinson vom National Cancer Institute in Bethesda, zur Verfügung gestellt. Die A-Fos-Kodierregion stand bei diesen Mäusen

unter der Kontrolle von 7 tetO-Kopien oberhalb eines Minimalpromotors. Eine Aktivierung der Expression, war nur bei gleichzeitiger Expression des rtTA-Proteins und der Gabe von Doxycyclin möglich (siehe 3.4.3.1). Hinter der A-Fos-Kodierregion wurde der Poly A-Schwanz des Simian-Virus 40 (SV40) kloniert (siehe Abbildung 13) (Gerdes et al., 2006).



Abbildung 13: Schematischer Aufbau der A-Fos-Kodierregion.

Das *A-Fos* Gen stand unter der Kontrolle von 7 *tet* Operatoren (*tetO*), welche das gezielte Anschalten der Expression über Tetracyclin ermöglichten. Das Transgen war mit einem Hämagglutinin Marker (HA) versehen, um einen Nachweis mittels Western Blot zu ermöglichen. Hinter das *A-Fos* Gen war ein Poly A Schwanz des Simian-Virus 40 (SV40) zur Expressions-Termination geschaltet.

3.4.5. Generierung doppelt transgener Mäuse

Damit die Transgene der transgenen [tetO]₇ REST/Elk-1ΔC- und [tetO]₇ A-Fos-Mäuse gezielt in den β-Zellen des Pankreas exprimiert werden konnten, wurden die Mäuse mit einem zweiten transgenen Mausstamm verpaart. Hierzu diente die RIP-rtTA-Mauslinie, die freundlicherweise von Herrn Prof. Hussain der Johns Hopkins University in Baltimore zur Verfügung gestellt wurde. Diese rtTA-Mäuse exprimierten das „reverse tetracyclin transactivator“ (*rtTA*) ausschließlich in den β-Zellen des Pankreas, da sie unter der 9,5 kb 5' großen regulatorischen Region des Insulin Promotors II der Ratte standen (Abbildung 14) (Milo-Landesman et al., 2001).



Abbildung 14: Schematische Darstellung des RIP-rtTA-Transgens.

Das „reverse tetracyclin transactivator“ (*rtTA*) Transgen stand unter der Kontrolle des 9,5 kb großen Abschnittes des Insulin II Promotors der Ratte. Das *rtTA*-Transgen setzte sich aus dem *rTetR*-Gen und dem Herpes simplex Transaktivator *VP16* zusammen. Der Startpunkt und die Transkriptionsrichtung sind durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Durch die exklusive Expression des *RIP-rtTA* in den β-Zellen des Pankreas war garantiert, dass die Expression des gewünschten Transgens ausschließlich in den β-Zellen des Pankreas erfolgte. Die transgenen Nachkommen wurden mittels PCR auf die Expression des

entsprechenden Transgens überprüft und entsprechend für die Fragestellung der Forschungsarbeit ausgewählt.

3.4.6. Genotypisierung transgener Mäuse

Um das Vorhandensein des entsprechenden Transgens in den generierten Mauslinien nachweisen zu können, wurden den drei Wochen alten Tieren eine Biopsie an den Ohren entnommen. Die Gewebeprobe wurde für die Genotypisierung mittels PCR vorbereitet. Dazu wurde, zu jeweils einer Gewebeprobe, 200 µl Chelex Lysepuffer (siehe Tabelle 29) und Proteinase K (0,5 mg/ml) gegeben und über Nacht bei 55 °C inkubiert. Darauf folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 13.000 rpm mit anschließendem zehnmütigen Kochschritt bei 96 °C. Am Ende wurde der Ansatz erneut bei 13.000 rpm zentrifugiert und stand für die Genotypisierung mittels PCR zur Verfügung. Das hier angegebene Protokoll wurde verändert nach (Rössler et al., 2016). Die lysierten Gewebeprobe konnten nun direkt in einer PCR analysiert werden, oder für den späteren Gebrauch bei -20 °C eingefroren werden.

Puffer	Stoff	Konzentration
Chelex Lysepuffer	Chelex 100	5 %
	NaCl	100 mM
	Sodium Lauroyl Sarcosine	0,5 %

Tabelle 29: Die Zusammensetzung des Chelex Lysepuffers, der zur Lyse der Mausohr-Biopsien verwendet wurde.

3.4.6.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR) der Gewebeprobe

Im Anschluss an die Lyse der Gewebeprobe erfolgte der Transgennachweis mittels PCR. Der Ablauf der PCR sowie die Primer können Kapitel 3.3.6 entnommen werden. Abweichend zu dem dort angegebenen Protokoll wurden je 2 µl der aufgeschlossenen Gewebeprobe in die PCR eingesetzt.

3.4.7. Operative Gewinnung und Isolierung von pankreatischen Inseln aus Mäusen

Zur Präparation pankreatischer Inseln aus den transgenen Mauslinien wurden die Mäuse mit Isofluran (100 % Forene[®] v/v) betäubt und mittels zervikaler Dislokation getötet. Nach dem Töten wurden die Tiere auf einer sauberen Unterlage, in Rückenlage, an den Extremitäten fixiert und unter einem Binokular mit ausreichender Beleuchtung positioniert. Um zu verhindern, dass sich bei dem Aufschneiden der Bauchdecke Fellreste auf die inneren Organe legten, wurde das Fell im Bauchbereich mit 70 % Ethanol befeuchtet. Nach dem Aufschneiden des Abdomens wurden die Organe mit einer 0,9 % NaCl-Lösung befeuchtet, um ein Austrocknen zu verhindern. Mittels eines befeuchteten Wattestäbchens wurde der Gallengang freigelegt und mit zwei Pinzetten und einem dünnen Faden nahe an der Leber fest abgebunden. Ein weiterer Faden wurde nahe dem Duodenum um den Gallengang gelegt, jedoch nicht zugebunden. Mit einer feinen Schere wurde der Gang vorsichtig, in zum Gang paralleler Haltung, angeschnitten. Dabei war wichtig, dass der Gang beim Schneiden nicht durchtrennt wurde. Danach wurde eine elastische Polyethylen-Kanüle durch den noch offenen Fadenbogen geführt und durch die Schnittöffnung in den Gallengang eingeführt. Nach dem Schließen des Knotens um die eingeführte Kanüle wurde eine Einmalspritze mit 2 ml einer PBS-Lösung, welche 1 mg/ml Kollagenase P und Neutralrot (0,1 mg/ml) enthielt, aufgezogen. Das hier beschriebene Protokoll wurde nach Gotoh et al., (1987) für den experimentellen Ablauf angepasst. Diese Lösung wurde dann vorsichtig injiziert. Dies führte zu einem Aufblähen des Pankreas und einer rötlichen Färbung. Nach erfolgreicher Injektion wurde das Pankreas mittels Pinzette und Schere vorsichtig von Darm und Milz entfernt und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Das entnommene Pankreas wurde darauf für ca. 4 Minuten in einem 37 °C warmen Wasserbad unter moderatem Schütteln inkubiert und währenddessen durch die Kollagenase P verdaut. Um den Degradations-Prozess zu verlangsamen, wurde die Probe in einem Eisbad gekühlt. Durch mehrfache Zugabe von kalter PBS-Lösung wurde die Suspension gewaschen und anschließend sedimentiert. Die entstandene untere Phase enthielt die sich sedimentierenden Inselzellen des Pankreas. Diese Phase wurde mittels einer Pipette entnommen und auf eine durchsichtige Nockenschale aufgebracht. Unter einem Mikroskop konnte daraufhin mittels einer Handpipette die sich klar rund und rötlich abzeichnenden Inselzellen aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsröhrchen überführt werden. Beim Aufnehmen der Zellen wurde darauf geachtet, keine unerwünschten Azinuszellen, welche die Proben verunreinigen würden, mit aufzunehmen. Der sich sammelnde Flüssigkeits-Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die Probe zur weiteren Verwendung bei - 80 °C konserviert.

3.4.8. Intraperitonealer Glukosetolleranztest

Bei diesem Test wurde die Veränderung des Blutzuckerspiegels von Versuchsmäusen in einer zeitlichen Abhängigkeit nach einer intraperitonealen Glukose-Injektion bestimmt. Dazu bekamen die Versuchsmäuse nach der Geburt Doxyzyklin (1mg / ml) / 0,8 % Sucrose über 8-12 Wochen über das Trinkwasser verabreicht. Die Kontrollmäuse erhielten nur Trinkwasser mit 0,8 % Sucrose. Zur Bestimmung des Glukosespiegels wurden die Tiere zunächst für 6 h nüchtern gesetzt. Der Zugang zu frischem Trinkwasser war jederzeit gewährleistet. Das Körpergewicht der Versuchstiere wurde mittels einer Waage bestimmt (erste Nachkommastelle). Abhängig von ihrem Körpergewicht bekamen die Tiere nach ihrer Nüchternungs-Phase 2 mg / g Glukose intraperitoneal injiziert. Nach der Injektion erfolgte die Messung der Glukosekonzentration im Blut mittels eines handelsüblichen Blutzuckermessgerätes (siehe 3.1.4) und den entsprechenden Teststreifen. Die Entnahme des Blutes erfolgte mittels einer sterilen Lanzette aus der Schwanzvene zu den Zeitpunkten: 0, 15, 30, 60, 90 und 120 Minuten.

3.4.9. Histologie

3.4.9.1. Apoptose-Nachweis mittels Antikörperfärbung von Gewebsschnitten

Um den Nachweis der Caspase-3-Aktivität im Gewebskontext pankreatischer β -Zellen zu ermöglichen, wurde das Pankreas als Ganzes aus den entsprechenden Versuchstieren entnommen. Durch Gabe in Paraformaldehyd für 24 h wurde das Organ fixiert und in Paraffin immobilisiert. Mittels eines Mikrotoms (Leica SM2000R) wurden 5 μ m starke Schnitte des Kopf-, Mittel- und Schwanzstückes angefertigt und im Anschluss daran deparaffinisiert. Es wurde jeder sechste Schnitt verwendet, um zu verhindern, dass es zu einer irrtümlichen mehrfachen Auswertung der gleichen Inseln kam. Die Schnitte wurden im Anschluss auf Objektträger (76 x 26 mm, geputzt und gebrauchsfertig, Menzel GmbH & Co. KG., Braunschweig) ausgebracht. Das Paraffin wurde mittels Xylene von den Schnitten gewaschen und diese in einer sich abschwächenden Alkoholreihe rehydriert. Um die Gewebsstrukturen im Schnitt sichtbar zu machen, wurden die Schnitte einer Hämatoxylin/Eosin-Färbung unterzogen. Der Hämatoxylin-Farbstoff wurde über Folgereaktionen zu Hämalaun, welches im sauren Milieu die Zellkerne blau färbte. Die Verwendung von Eosin bewirkte ein rotes Anfärben von Zytoplasma und Kollagenfasern. Zur Verhinderung einer endogenen Peroxidase-Aktivität

wurden die Schnitte für 10 Minuten mit Wasserstoffperoxid (3 %) behandelt. Damit die Schnitte, nach der vorangegangenen Prozedur wieder zur Antigenpräsentation in der Lage waren, wurden diese in Citrat-Puffer (pH 6,0) für 10 Minuten erhitzt (Müller et al., 2012).

Der Nachweis der Caspase-3-Aktivität in den Schnitten erfolgte durch die Verwendung eines Antikörpers, der gegen das Epitop der gespaltenen Caspase-3 (cleaved caspase-3) und damit der aktiven Form der Caspase-3 (siehe Tabelle 2) gerichtet war. Dabei wurde der verwendete Antikörper in einer 1:400 Verdünnung eingesetzt und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Durch Zugabe des Substrates erfolgte der Nachweis der aktiven Caspase. Die Dokumentation erfolgte mittels eines Mikroskops (BZ-8000, Keyence, Neu-Isenburg).

Das Anfertigen der Schnitte sowie die Färbungen wurden freundlicherweise von Frau Janine Becker (Experimentelle Chirurgie) durchgeführt.

3.4.9.2. Morphometrie von β -Zellen des Pankreas

Zur Bestimmung der Fläche von β -Zellen des Pankreas wurde zunächst das exokrine Pankreas aus den Versuchsmäusen entnommen und anschließend in 4 % Formaldehyd fixiert (24 h). Nach anschließender Fixation in Paraffin wurden mittels eines Mikrotoms (Leica SM2000R) Schnitte des Kopf-, Mittel- und Schwanzstücks des Pankreas angefertigt (5 μ M, 400 Serienschnitte). Von diesen Schnitten wurde jeder sechste Schnitt ausgewertet, um eine Mehrfach-Interpretation ausschließen zu können. Die Schnitte wurden auf Objektträgern (76 x 26 mm, geputzt und gebrauchsfertig, Menzel GmbH & Co. KG., Braunschweig) immobilisiert und dann mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung angefärbt. Im Nachfolgenden wurden die gefärbten Schnitte dann unter einem BZ-8000 Mikroskop (Keyence, Neu-Isenburg) betrachtet und die Innenfläche (mm²) der Inseln, mittels der integrierten Software ermittelt.

Das Anfertigen der Schnitte sowie die Färbung wurde freundlicherweise von Frau Janine Becker (Experimentelle Chirurgie) durchgeführt.

3.5. Statistik und Abbildungen

Die in dieser Arbeit dargestellten Abbildungen wurden in Microsoft PowerPoint erstellt. Microsoft Excel diente zur Auswertung der statistischen Signifikanz mittels des zweiseitigen, gepaarten Student's t-test. Eine Signifikanz der Versuche wurde angegeben, wenn *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$ und ***= $p < 0,001$.

Die Balkendiagramme wurden mit ihrer Standardabweichung dargestellt. Die Punktdiagramme des IPGTT wurden mit ihrem jeweiligen Standardfehler abgebildet.

Zur Darstellung der durch Calcium-Imaging ermittelten Daten, durch Dr. Xin Hui, diente IgorPro (Wavemetrics, Lake Oswego, USA). Die letztendliche statistische Auswertung erfolgte mittels der Prism 6 Software der Firma GraphPad Software Inc. (Florida,USA).

4. Ergebnisse

4.1. Pharmakologie und Signaltransduktion des „Transient receptor potential vanilloid 1“(TRPV1)-Kanals

Der erste Teil meiner Dissertation behandelt die Pharmakologie des TRPV1-Kanals sowie die Signalkaskade, die nach Stimulation dieses Kanals initiiert wird. In meiner Masterarbeit konnte ich die Bedeutung des TRPV1-Kanals und seines prominenten Agonisten Capsaicin in der Regulation der Genexpression zeigen. Diese Untersuchungen wurden in der hier vorliegenden Arbeit fortgeführt und erweitert.

4.1.1. Die H2C1-Zelllinie exprimiert den TRPV1-Kanal

Zur Untersuchung des TRPV1-Kanals verwendete ich H2C1-Zellen. Dabei handelte es sich um HEK293-Zellen, die den humanen TRPV1-Kanal stabil exprimierten und bereits in zahlreichen wissenschaftlichen Arbeiten verwendet wurden.

Die Expression des menschlichen TRPV1-Kanals in den H2C1-Zellen wurde durch RT-PCR-Analyse bestätigt. Aus den kultivierten H2C1-Zellen wurde die RNA isoliert und diese darauf mittels reverser Transkription in ihre cDNA umgeschrieben. Im Anschluss wurde die cDNA mittels PCR vervielfältigt. Die verwendete Primer-Kombination für den Nachweis des humanen TRPV1 (hTRPV1) kann Tabelle 24 entnommen werden. Durch Auftrag auf ein Agarosegel wurden die PCR-Proben aufgetrennt und anschließend dokumentiert. Dabei zeigte sich ein 193 bp großes Produkt für die Proben aus den H2C1-Zellen (Abbildung 15). Dieses Produkt entsprach der erwarteten Fragmentgröße. Die HEK293/T17-Zelllinie exprimierten nachweislich kein hTRPV1.

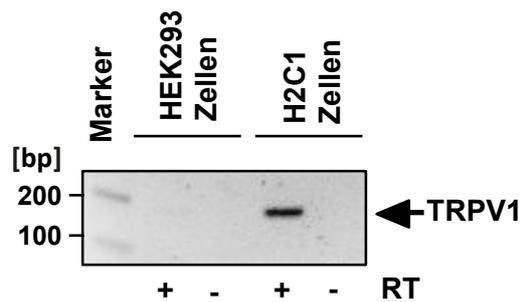


Abbildung 15: Die H2C1-Zelllinie exprimiert den menschlichen TRPV1-Kanal.

Aus H2C1- und HEK293-Zellen wurde RNA präpariert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Das Produkt der PCR-Amplifikation hat eine Größe von 193 bp und ist ausschließlich in den TRPV1 exprimierenden H2C1-Zellen nachweisbar. Der Marker ist im linken Teil der Abbildung mit seinen entsprechenden Größen in bp gezeigt. Die mit – gekennzeichneten Bereiche entsprechen den PCR-Reaktionen, bei denen keine reverse Transkriptase (RT) zugegeben wurde. Sie dienten als Kontrolle.

4.1.2. Zeitabhängige Induzierbarkeit der AP-1 Aktivität durch Stimulation des TRPV1-Kanals mit Capsaicin

In meiner Masterarbeit konnte ich bereits zeigen, dass die Stimulation der TRPV1-exprimierenden H2C1-Zellen mit Capsaicin zur Aktivierung des AP-1 Transkriptionsfaktors führte (Backes, 2014). Zum Nachweis der AP-1 Aktivität verwendete ich ein Reporterogen, welches ich über lentiviralen Gentransfer in das Chromatin der H2C1-Zellen inseriert hatte. Damit wurde sichergestellt, dass das Reporterogen dieselbe nukleosomale Struktur besaß wie alle anderen Gene in der Zelle. Das Reporterogen (siehe Abbildung 16 A) kodierte für das Luziferasegen, welches unter der Kontrolle des Collagenase-Promotors (Coll.luc) stand. Der Collagenase-Promotor enthält ein TRE-Element, an das AP-1 binden kann (Angel et al., 1987; Steinmüller et al., 2001).

Im hier vorliegenden Versuch wurde untersucht, wie nach Stimulation des TRPV1-Kanals die AP-1 Aktivität zeitabhängig zunimmt.

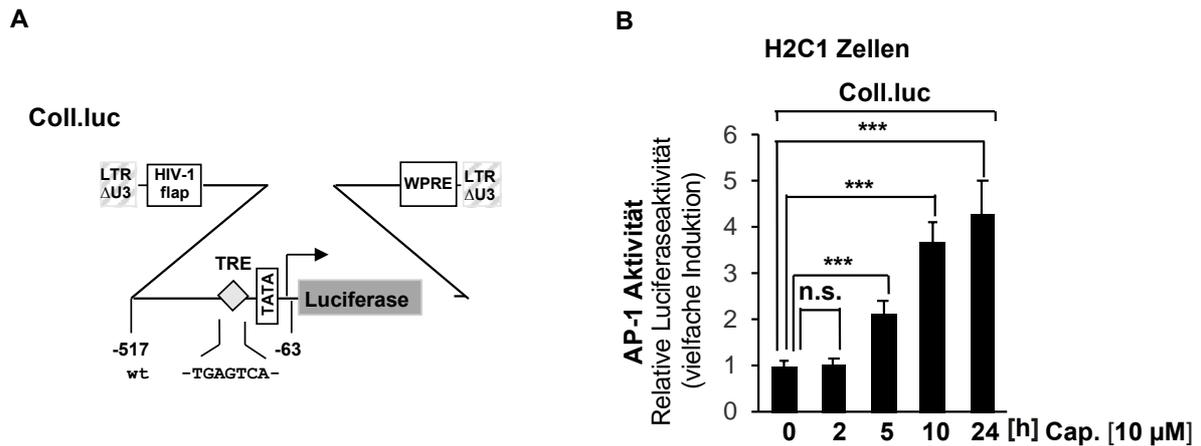


Abbildung 16: Die TRPV1-Stimulation aktiviert den Transkriptionsfaktor AP-1.

A) Das integrierte Provirus, welches für das Reportergen Coll.luc kodiert. Dabei stand das Luciferasegen unter der Kontrolle des Collagenase-Promotors, der ein „TPA-response element“ (TRE) besaß, an welches der Transkriptionsfaktor AP-1 binden konnte. Die U3-Region des „Long Terminal Repeats“ war entfernt worden. Das HIV-1 flap Element und das „Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element“ (WPRE) sind entsprechend in der Abbildung aufgeführt. **B)** Reporteranalyse von H2C1-Zellen, die mit Viren infiziert wurden, die für das Collagenase-Reportergen (Coll.luc) kodierten. Nach der 24-stündigen Infektion erfolgte eine Reduktion des Serums für weitere 24 h. Die Zellen wurden darauf mit 10 μM Capsaicin (Cap.) zu den Zeitpunkten 0, 2, 5, 10 und 24 Stunden (h) stimuliert. Das Ernten der Zellen erfolgte zu den jeweiligen Zeitpunkten. Danach wurden die Zellen auf ihre Luziferaseaktivität hin in einem Luminometer gemessen und die Proteinkonzentration mittels BCA-Assay bestimmt. Die Werte der Luziferase-Messung wurden auf die entsprechende Proteinkonzentration normiert und der mit Cap. stimulierte Probenanteil auf die Kontrolle (0 h) bezogen. Dieser Wert ist in der Abbildung als relative Luziferaseaktivität wiedergegeben. Der Versuch wurde für jede Bedingung in einem vierfachen Ansatz durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt. Das gesamte Experiment wurde dreimal ($n=3$) wiederholt. Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz wurden die Daten einem Student's t-test unterzogen (n.s. = nicht signifikant; *** = $P < 0,001$). Die Standardabweichung ist zu den einzelnen Bedingungen angegeben.

Hierzu wurden H2C1-Zellen mit Lentiviren infiziert, die für das Collagenase-Reportergen Coll.luc kodierten. Die so infizierten Zellen wurden mit Capsaicin stimuliert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet (Abbildung 16 B). Capsaicin bewirkte einen zeitabhängigen Anstieg in der Aktivität des AP-1 Transkriptionsfaktors. Bereits nach fünfstündiger Stimulation kam es zu einem signifikanten Anstieg der AP-1-Aktivität. Die Aktivität hatte sich hier mehr als verdoppelt. Auch nach 24 h war eine signifikant hohe AP-1-Aktivität messbar.

4.1.3. Die TRPV1-Liganden Resiniferatoxin (RTX) und N-Arachidonoyldopamin (NADA)

Neben Capsaicin sind zahlreiche weitere Verbindungen beschrieben worden, die in der Lage sind, den TRPV1-Kanal zu aktivieren.

4.1.3.1. Die Stimulation von TRPV1 durch Resiniferatoxin (RTX) erhöht die Aktivität des AP-1 Transkriptionsfaktor-Komplexes

Zu diesen Verbindungen gehört das hochwirksame Gift der Pflanze *Euphorbia resinifera*, Resiniferatoxin (RTX) (Abbildung 17 A). Um zu überprüfen, ob RTX ebenso wie Capsaicin in der Lage ist eine Aktivierung von AP-1 zu induzieren, wurden H2C1- und HEK293/T17-Zellen, analysiert, in deren Chromatin die Information für das Collagenase-Reportergen integriert worden war.

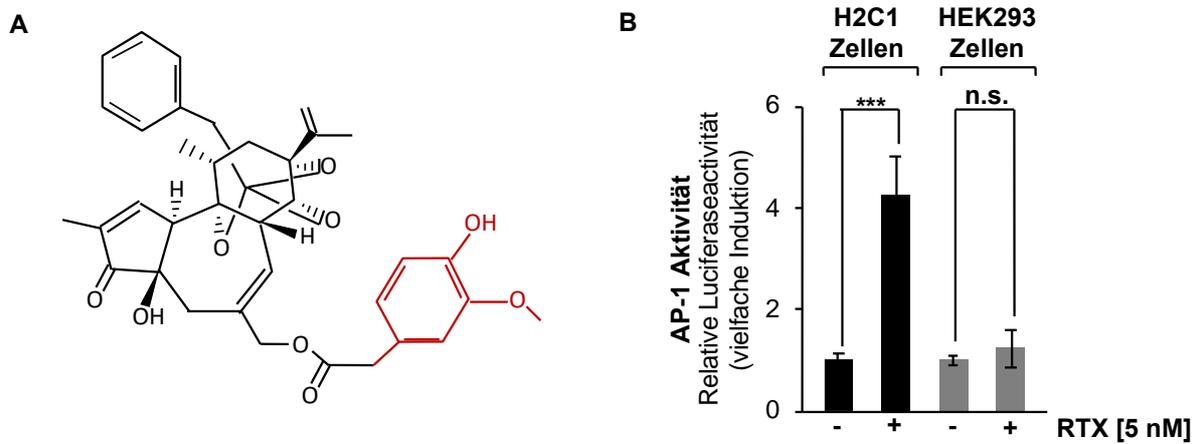


Abbildung 17: Der TRPV1-Ligand Resiniferatoxin aktiviert den AP-1-Transkriptionsfaktor.

A) Die Strukturformel des hochwirksamen TRPV1-Aktivators Resiniferatoxin (RTX), der Pflanze *Euphorbia resinifera*. Sie besitzt ebenso wie Capsaicin eine Vanillyl-Gruppe (rot) wodurch sie zu den Vanilloiden gezählt wird. **B)** Reporteranalyse nach der Stimulation von H2C1- und HEK293/T17-Zellen mit RTX. Die Zellen wurden mit Lentiviren infiziert (24 h) die für das Reportergen Coll.luc kodierten (s.h. Abbildung 16 A). Darauf wurden diese Zellen für weitere 24 h mit Serum-reduziertem Medium inkubiert und danach für 24 h mit RTX (5 nM) stimuliert. Nach der Stimulation wurden die Zellen geerntet und die Luciferaseaktivität, sowie die Proteinkonzentration bestimmt. Zur Auswertung wurden die Luciferase-Werte auf die jeweilige Proteinkonzentration bezogen. Die stimulierte Probe wurde dabei auf ihre Kontrolle normiert und ist in der Abbildung als relative Luciferaseaktivität wiedergegeben. Der Versuch wurde zu jeder Bedingung als vierfach Ansatz durchgeführt und gemittelt. Zusätzlich wurde der ganze Versuch dreimal wiederholt (n=3), um ihn mittels Student's t-test einer statistischen Signifikanz zu unterziehen. Als Signifikant *** wurden die Ergebnisse gewertet, wenn *** = $P < 0,001$; n.s.= nicht signifikant. Die Standardabweichung zu den einzelnen Bedingungen ist angegeben.

Abbildung 17 B zeigt die Ergebnisse der Reporteranalyse. Die Stimulation der TRPV1-exprimierenden H2C1-Zelllinie mit RTX führte bei einer verwendeten RTX-Konzentration von 5 nM zu einem hohen und signifikanten Anstieg in der AP-1-Aktivität. Die Inkubation der HEK293/T17-Zellen mit RTX führte zu keiner signifikanten Aktivierung von AP-1.

4.1.3.2. Die Stimulation von TRPV1 durch N-Arachidonoyldopamin (NADA) aktiviert AP-1

Im Gegensatz zu den exogenen Agonisten Capsaicin und RTX ist N-Arachidonoyldopamin (NADA) als endogener Aktivator des TRPV1-Kanals beschrieben worden (Huang et al., 2002). Aus diesem Grund untersuchte ich, ob auch NADA in der Lage war eine gesteigerte Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1, über TRPV1, zu induzieren. Abbildung 18 A zeigt die chemische Struktur des Endocannabinoids NADA.

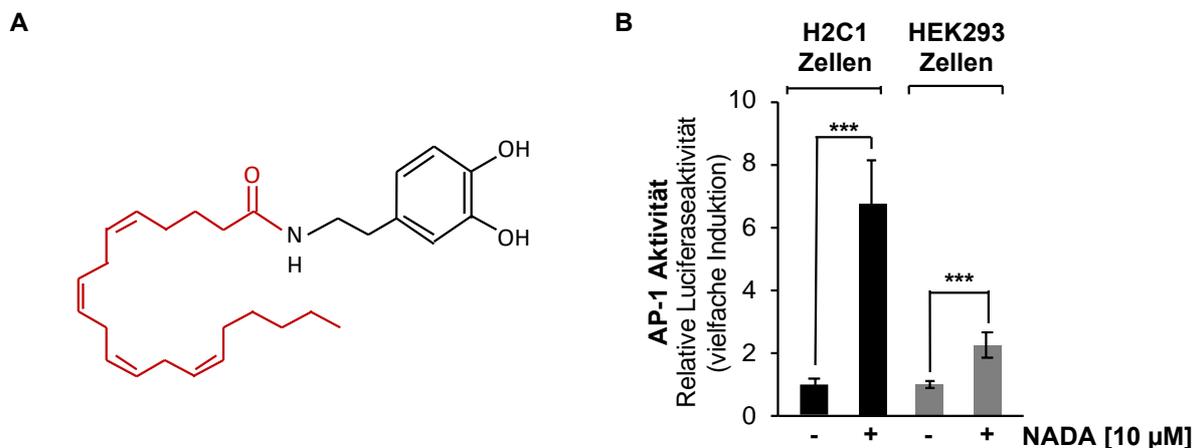


Abbildung 18: Chemische Struktur des N-Arachidonoyldopamin und seine Aktivierung des AP-1 Transkriptionsfaktors.

A) Chemische Struktur des N-Arachidonoyldopamin (NADA). Es weist in seiner Struktur, abweichend von Capsaicin und RTX, keine Vanillyl-Gruppe auf, sondern eine Arachidonsäure (rot), und ist damit kein Vanilloid. **B)** H2C1- und HEK293/T17-Zellen, die ein integriertes Coll.luc Reporter gen besaßen, wurden mit 10 µM NADA für 24 h stimuliert. Die Auswertung erfolgte wie in der Legende zu Abbildung 17 beschrieben. Das Experiment entspricht einem n= 3. Als signifikant *** wurden die Ergebnisse gewertet, wenn $P < 0,001$. Die Standardabweichungen sind angegeben.

Ich untersuchte sowohl H2C1- als auch HEK293/T17-Zellen, die ein in das Chromatin integriertes Reporter gen enthielten (Abbildung 18 B). Die so veränderten Zellen wurden für 24 Stunden mit NADA (10 µM) stimuliert. Die Ergebnisse zeigen, dass die Stimulation der H2C1-Zellen eine starke und signifikante Erhöhung der AP-1-Aktivität bewirkte. In der HEK293-Zelllinie, die als Kontrolle diente, war ebenfalls ein signifikanter, wenn auch wesentlich geringerer Anstieg in der AP-1-Aktivität messbar. Die Aktivierung von AP-1 durch NADA erfolgte somit TRPV1-abhängig als auch TRPV1-unabhängig.

4.1.4. Die Rolle des TRPV1-Kanals und G_αq-gekoppelter Rezeptoren in der Capsaicin, NADA und RTX induzierten Aktivierung des AP-1 Transkriptionsfaktors

4.1.4.1. Der TRPV1-Kanal ist essenziell für die Induktion der AP-1 Aktivität nach Stimulation der H2C1-Zellen mit Capsaicin, RTX oder NADA

Die vergleichenden Experimente zwischen den TRPV1-exprimierenden H2C1-Zellen mit den HEK293/T17-Zellen zeigten bereits die Bedeutung des TRPV1-Kanals in der Aktivierung von AP-1. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch die Expression einer „small hairpin“ (sh) RNA. Dazu exprimierte ich durch lentivirale Infektion eine TRPV1-spezifische-shRNA (shTRPV1) in H2C1-Zellen. Aus den geernteten Zellen wurde die RNA präpariert und mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben und danach in einem Agarosegel aufgetrennt (Abbildung 19 A).

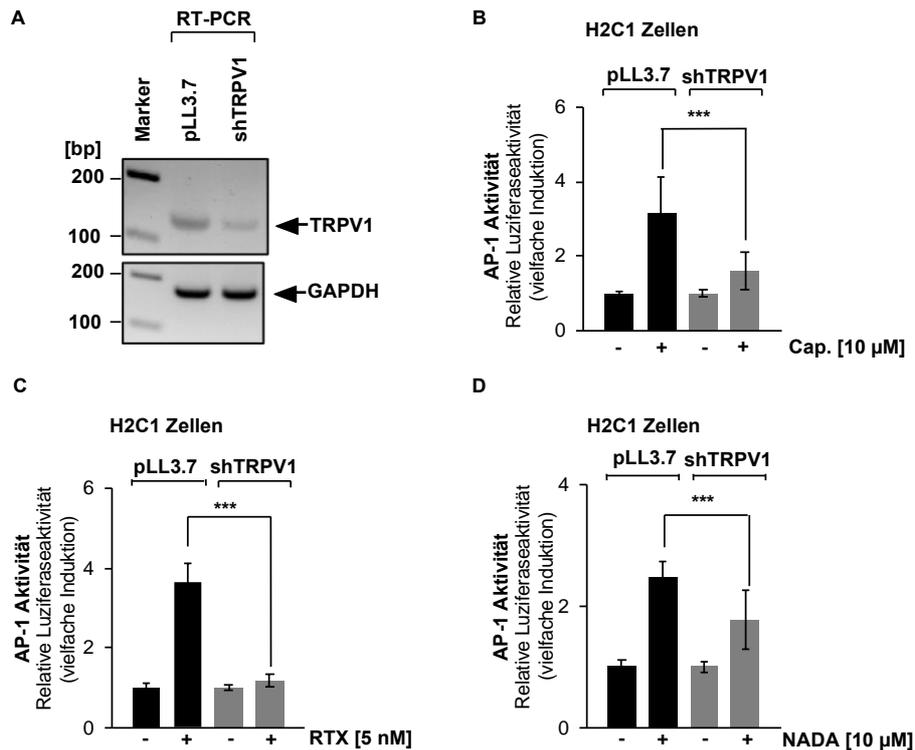


Abbildung 19: Der TRPV1-Kanal vermittelt die Capsaicin-, RTX- oder NADA-induzierte Aktivierung des AP-1 Transkriptionsfaktors.

A) Die Expression einer TRPV1-spezifischen shRNA (shTRPV1) führt zu einer geringeren Konzentration an TRPV1 mRNA in H2C1-Zellen. H2C1-Zellen wurden mit Viren infiziert, die mit dem Transfektor pLL3.7 (Kontrolle) oder dem Transfektor pLL3.7-shTRPV1, generiert wurden. Nach der Infektion erfolgte eine 48 h Serum-Reduktion bei 37 °C. Danach wurden die Proben geerntet und die RNA aus den Extrakten präpariert. Die RNA wurde darauf mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben und via RT-PCR vervielfältigt. Das PCR-Fragment wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt. Zu sehen sind die 194 bp großen PCR-Fragmente. GAPDH diente als Ladekontrolle. Der Marker wurde mit seinen entsprechenden Größen in bp angegeben. Das hier gezeigte Experiment entspricht einer Versuchsreihe und wurde mit demselben Ergebnis insgesamt dreimal durchgeführt. **B, C** und **D)** Die Expression einer TRPV1-spezifischen shRNA reduziert die AP-1 Aktivierung nach Stimulation von H2C1-Zellen mit Cap (10 µM) (**B**), RTX (5 nM) (**C**) oder NADA (10 µM) (**D**). Die Versuche wurden wie in Abbildung 17 beschrieben durchgeführt. Zusätzlich zur Expression des Coll.luc Reportergens wurden die Zellen mit Viren infiziert, die entweder mit dem Transfektor pLL3.7 (Kontrolle) oder dem Transfektor pLL3.7-shTRPV1 (shTRPV1) generiert wurden. Der Versuch wurde dreimal wiederholt (n=3). Eine *** Signifikanz wurde angegeben, wenn $P < 0,001$ war. Die Standardabweichung ist der Abbildung zu entnehmen.

Die Expression der TRPV1-spezifischen shRNA führte zu einer deutlich reduzierten Konzentration an TRPV1 mRNA, im Vergleich zu Kontrolle. Somit war die verwendete shRNA in der Lage die Expression des TRPV1-Kanals herabzusetzen.

Im nächsten Versuch wurde die Wirkung der shTRPV1 auf die Aktivierung von AP-1 nach Stimulation der Zellen mit Capsaicin, RTX oder NADA untersucht. Nach lentiviraler Infektion waren die H2C1-Zellen in der Lage, sowohl das Coll.luc Reportergen, als auch die TRPV1-spezifische shRNA zu exprimieren. Zur Expressionsanalyse wurden die Zellen entweder mit Capsaicin (10 µM) (Abbildung 19 B), RTX (5 nM) (Abbildung 19 C) oder NADA (10 µM) (Abbildung 19 D) stimuliert und danach geerntet. Durch die Expression der TRPV1-spezifischen shRNA kam es zu einer signifikanten Reduktion der AP-1-Aktivität nach

Stimulation mit Capsaicin, RTX oder NADA. Der TRPV1-Kanal war somit unabdingbar für die Aktivierung von AP-1 nach Stimulation durch Capsaicin, RTX oder NADA.

4.1.4.2. Die Aktivierung von AP-1 durch Capsaicin oder NADA ist unabhängig von $G_{\alpha q}$ -gekoppelten Rezeptoren

Innerhalb einer Zelle gibt es eine Vielzahl unterschiedlichster Rezeptoren, die Einfluss auf die Genexpression nehmen können. So wird AP-1 auch durch die Stimulation von $G_{\alpha q}$ -gekoppelten Rezeptoren aktiviert. Zudem wurde beschrieben, dass $G_{\alpha q}$ -gekoppelte Rezeptoren zu einer Sensitivierung des TRPV1-Kanals führen können (Salzer et al., 2019). Aus diesem Grund überprüfte ich, ob die erhöhte AP-1 Aktivität nach Stimulation von H2C1-Zellen mit Capsaicin über $G_{\alpha q}$ -gekoppelte Rezeptoren gesteuert wurde. Dazu exprimierte ich das inhibitorisch auf $G_{\alpha q}$ wirkende Protein RGS2 („regulator of G-Protein signaling 2“) in H2C1-Zellen. Als GTPase-aktivierendes Protein ist es in der Lage die Signalkaskaden von $G_{\alpha q}$ -gekoppelten Rezeptoren zu inhibieren (Park-Windhol et al., 2012). Gleichzeitig integrierte ich mittels Lentiviren das Reportergen Coll.luc in die H2C1-Zellen. Nach der Infektion wurden die Zellen für 24 h mit Capsaicin (Abbildung 20 A) oder NADA (Abbildung 20 B) stimuliert und einer Reporter-gen-Analyse unterzogen.

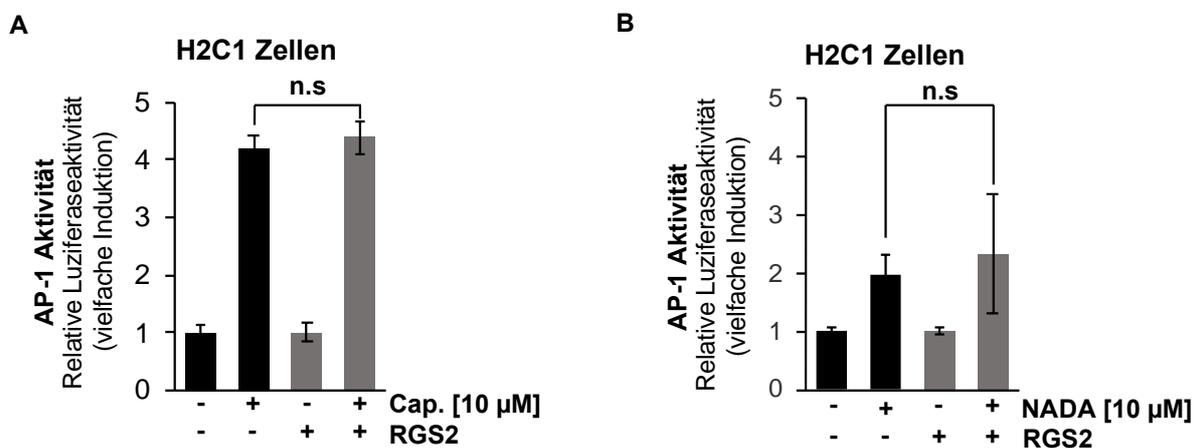


Abbildung 20: Die Überexpression von RGS2 hat keinen Effekt auf die AP-1 Aktivität nach Stimulation von H2C1-Zellen mit Capsaicin oder NADA.

H2C1-Zellen, die das Coll.luc Reportergen enthielten, wurden mit Lentiviren infiziert, die für den Inhibitor des $G_{\alpha q}$ (RGS2) kodierten. Als Kontrolle wurden die Zellen mit einem β -Gal kodierenden Lentivirus infiziert. Stimuliert wurden die Zellen mit **A**) 10 μ M Capsaicin (Cap.) oder **B**) mit 10 μ M NADA. Der Versuch wurde, wie in der Legende zu Abbildung 17 beschrieben, durchgeführt. Die Versuche wurden dreimal wiederholt ($n=3$) und mittels Student's t-test auf statistische Signifikanz untersucht ($n.s.$ = nicht signifikant). Die Standardabweichungen sind angegeben.

Die Messergebnisse zeigen, dass die Überexpression des RGS2-Proteins die Capsaicin- oder NADA- induzierte Aktivierung von AP-1 nicht beeinträchtigte. $G_{\alpha q}$ -gekoppelte Rezeptoren waren somit nicht an der Aktivierung von AP-1 nach Stimulation von H2C1-Zellen mit Capsaicin oder NADA beteiligt.

4.1.5. Die TRPV1-vermittelte Signaltransduktion

4.1.5.1. Die gesteigerte Aktivierung des AP-1 Transkriptionsfaktors nach Stimulation von TRPV1-Kanälen durch Capsaicin, RTX oder NADA ist abhängig vom Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle

Sowohl für Capsaicin als auch für RTX und NADA wurde beschrieben, dass sie ein Öffnen des TRPV1-Kanals bewirken. Dadurch kommt es zu einem Ca^{2+} -Einstrom in das Zytoplasma (Winter et al., 1990; Acs et al., 1996; Caterina et al., 1997; Huang et al., 2002).

Im Folgenden wurde daher untersucht, ob ein Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} durch den TRPV1-Kanal in das Zytoplasma notwendig ist, um AP-1 zu aktivieren. Zunächst wurde dazu in Zusammenarbeit mit Dr. Xin Hui (Zellbiologie, Universität des Saarlandes) untersucht, ob Capsaicin, RTX oder NADA in der Lage waren, in der H2C1-Zelllinie die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration zu erhöhen. Dazu wurden H2C1-Zellen und HEK293/T17-Zellen (Kontrolle) mit Capsaicin, RTX oder NADA stimuliert und der Konzentrations-Anstieg von Calcium-Ionen im Zytoplasma mit Fura-2 gemessen.

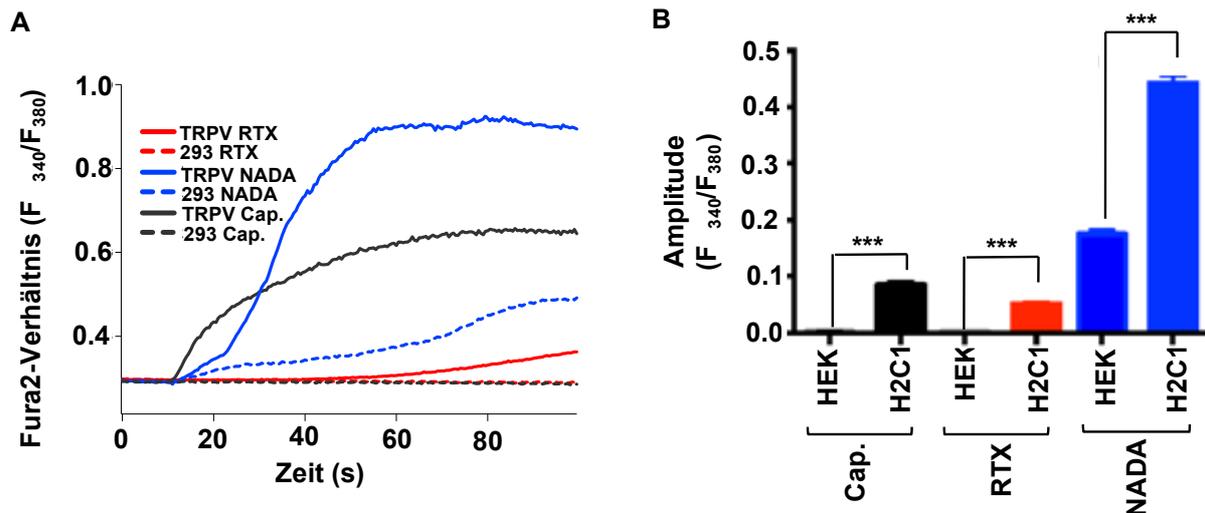


Abbildung 21: Capsaicin, RTX oder NADA induzieren einen TRPV1-abhängigen Ca²⁺-Einstrom in H2C1-Zellen.

A) Fura-2 Messung in H2C1-(TRPV) und HEK293/T17 (293) -Zellen nach der Stimulation mit Capsaicin (10 µM), RTX (5 nM) oder NADA (10 µM). Dargestellt ist das $F_{\Delta 340}/F_{380}$ Verhältnis als Liniendiagramm in Abhängigkeit von der Zeit (s). **B)** Quantifizierung der ermittelten Fura2-Verhältnisse als Balkendiagramm von n=170-770 Zellen. Die Daten wurden mittels Student's t-test auf ihre Signifikanz überprüft (**=P<0,001).

Abbildung 21 A zeigt den Ca²⁺-Anstieg im Zytoplasma über die Zeit als Fura-2-Fluoreszenz-Differenz. Dabei lässt sich erkennen, dass die Stimulation mit Capsaicin, RTX oder NADA in H2C1-Zellen zu einem starken Anstieg der intrazellulären Calcium-Ionen-Konzentration führte. Capsaicin und RTX waren nicht in der Lage in HEK293/T17-Zellen eine Erhöhung der zytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration zu induzieren. Nur die Stimulation mit NADA konnte einen Anstieg der Calcium-Ionen im Zytoplasma der HEK293/T17-Kontrollzellen bewirken. Abbildung 21 B zeigt die Quantifizierung der in Abbildung 21 A ermittelten Fura2-Verhältnisse. Das nächste Experiment übertrug diese Beobachtung auf die TRPV1-induzierte Aktivierung von AP-1. Dazu wurden H2C1-Zellen mit Lentiviren, die für das Coll.luc Reporter gen kodierten, infiziert. Ein Teil der Zellen wurde mit serum-reduzierten Medium versetzt und die Zellen mit Capsaicin, RTX oder NADA stimuliert. In einem parallelen Experiment wurden die H2C1-Zellen mit serum-reduziertem Medium versetzt, das kein Calcium enthielt. Auch diese Zellen wurden mit Capsaicin, RTX oder NADA stimuliert (Abbildung 22).

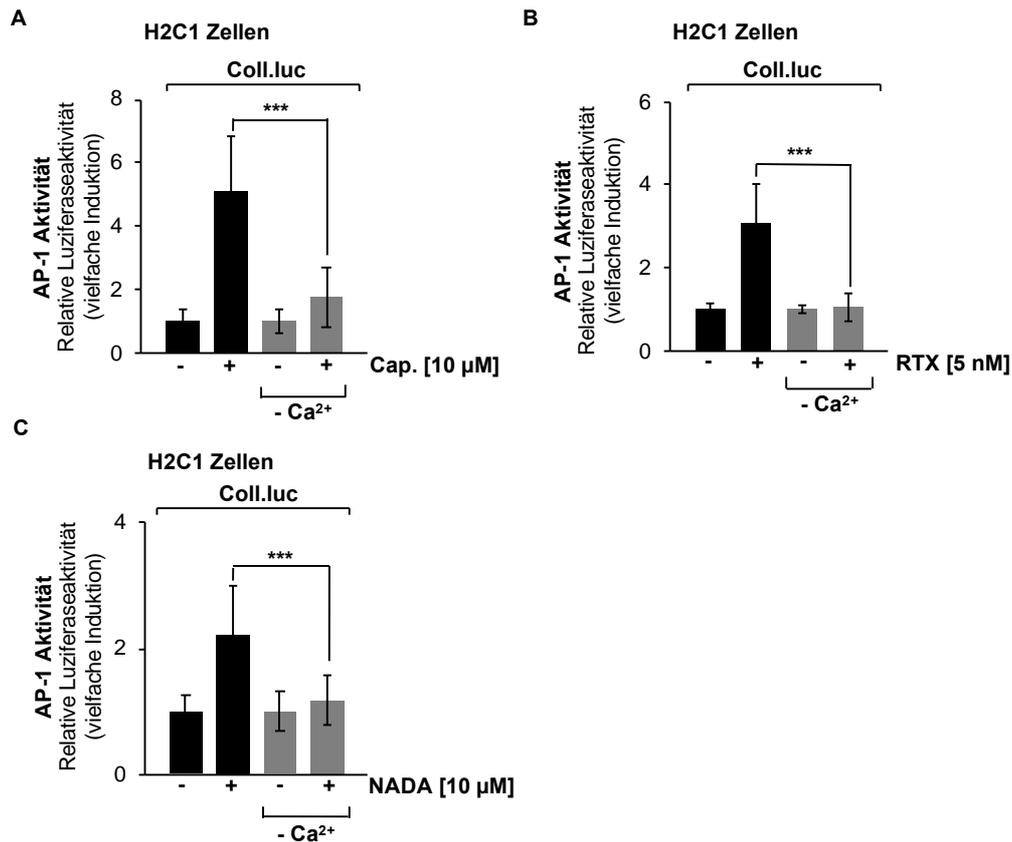


Abbildung 22: Der Einstrom von Ca²⁺ in das Zytoplasma ist ein essenzielles Bindeglied zwischen der Stimulation des TRPV1-Kanals mit Capsaicin, RTX oder NADA und der Aktivierung von AP-1.

H2C1-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die für das Reportergen Coll.luc kodierten. Die infizierten Zellen wurden für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert und danach für weitere 24 Stunden und 37 °C in serum-reduziertem Medium (CaCl₂ [1,8 mM]) bzw. in serum-reduziertem Medium ohne Calcium (- Ca²⁺) inkubiert. Danach wurde der Versuch wie in Abbildung 17 beschrieben durchgeführt und ausgewertet. Die Stimulation erfolgte mit **A**) Cap. (10 µM), **B**) RTX (5 nM) oder **C**) NADA (10 µM). Der Versuch wurde dreimal wiederholt (n=3) und mittels Student's t-test einer statistischen Signifikanz unterzogen (***) = P < 0,001). Die Standardabweichung ist angegeben.

Die Verwendung von Ca²⁺- freiem Medium führte, wie in Abbildung 22 gezeigt wird, zu einer signifikant geringeren Aktivierung des AP-1 Transkriptionsfaktors nach Stimulation mit Capsaicin (Abbildung 22 A), RTX (Abbildung 22 B) oder NADA (Abbildung 22 C), im Vergleich zur Kontrolle, die in ihrem Medium Calcium-Ionen (1,8 mM) enthielten. Die veränderte Transkription nach Stimulation mit Capsaicin, RTX oder NADA war somit abhängig vom extrazellulären Ca²⁺-Einstrom.

4.1.5.2. Der ERK1/2-Signalweg verbindet die Stimulation des TRPV1-Kanals mit der gesteigerten AP-1 Aktivität in Capsaicin stimulierten H2C1-Zellen

In meiner Masterarbeit konnte ich zeigen, dass die Überexpression der MAP-Kinase-Phosphatase 1 (MKP-1) zu einer signifikant geringeren Aktivierung von AP-1 nach Stimulation von H2C1-Zellen mit Capsaicin führte (Backes, 2014). MKP-1 dephosphoryliert und inhibiert die Aktivität der MAP-Kinasen ERK1/2, JNK und p38 (Shapiro und Ahn, 1998). Lesch et al. (2017) konnten zeigen, dass die Stimulation von TRPM3-Kanälen zu einer Aktivierung von AP-1 über den ERK1/2-Signalweg führte. Daher lag es nahe, die Rolle von ERK1/2 im TRPV1-Kontext zu untersuchen. Dazu wurden H2C1-Zellen mit Capsaicin unterschiedlich lange stimuliert. Die Kernextrakte der Zellen wurden isoliert, die Proteine auf einem SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Zur Detektion der phosphorylierten Form von ERK1/2 verwendete ich Antikörper, die gegen die phosphorylierte Form von ERK1/2 (P-ERK1/2) gerichtet waren. Abbildung 23 zeigt den Western Blot der so behandelten H2C1-Zellen. Als Kontrolle dienten Antikörper, die sowohl die nicht-phosphorylierte als auch die phosphorylierte Form von ERK1/2 erkannten.

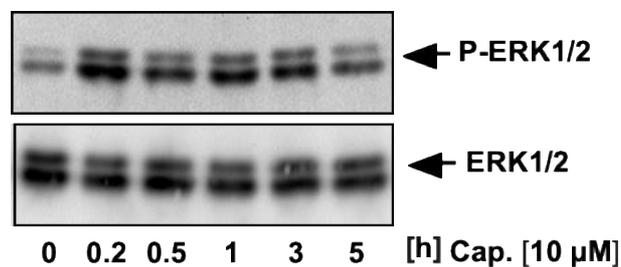


Abbildung 23: Capsaicin induziert eine zeitabhängige Phosphorylierung der Proteinkinase ERK1/2 in H2C1-Zellen.

Western Blot-Analyse von Kernproteinen aus H2C1-Zellen. H2C1-Zellen wurden 24 h in serum-reduziertem Medium (0,05 % FCS) inkubiert. Darauf wurden die Zellen mit Capsaicin (10 µM) stimuliert, zu den entsprechenden Zeitpunkten (0, 0.2, 0.5, 1, 3 und 5 Stunden [h]) geerntet und die Kernextrakte gewonnen. Der Nachweis von P-ERK1/2 (obere Abbildung) erfolgte mit gegen P-ERK1/2 gerichteten Antikörpern. Als Kontrolle wurde das gesamte ERK1/2-Protein (untere Abbildung) analysiert.

Bereits 15 Minuten nach der Stimulation mit Capsaicin (0.2 h) war ein starker Anstieg der Immunreaktionen von P-ERK1/2 nachweisbar und blieb bis zu drei Stunden nach der Stimulation relativ konstant. Die Konzentration an dem gesamten ERK1/2 blieb über den Zeitverlauf konstant.

4.1.5.3. c-Jun ist Teil des AP-1-Komplexes nach Stimulation von H2C1-Zellen mit Capsaicin

Nach der Aktivierung (Phosphorylierung) transloziert die Proteinkinase ERK1/2 in den Zellkern und kann dort genregulatorische Proteine phosphorylieren (Chen et al., 1992). c-Jun ist beispielsweise ein Substratprotein von ERK1/2. In vielen AP-1-Komplexen konnte c-Jun identifiziert werden (Chiu et al., 1988). In meiner Masterarbeit konnte ich bereits nachweisen, dass c-Jun an der Aktivierung von AP-1 nach Stimulation des TRPV1-Kanals beteiligt ist. Zur Präzisierung dieser Daten wurde die Expression von c-Jun in Capsaicin-stimulierten H2C1-Zellen mittels Western Blot gemessen (Abbildung 24). Als Kontrolle wurde die Expression von HDAC1 bestimmt.

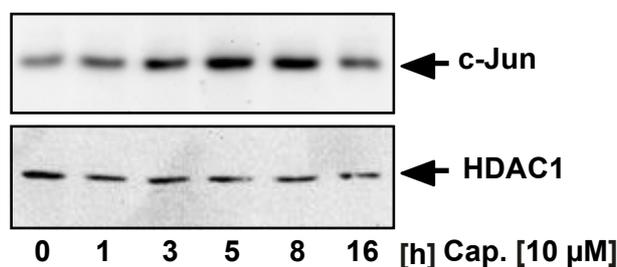


Abbildung 24: Die Expression von c-Jun wird durch die Stimulation von TRPV1 mit Capsaicin gesteigert.

Western Blot-Analyse von Kernproteinen aus H2C1-Zellen. H2C1-Zellen wurden für 24 h in DMEM-Medium kultiviert und darauf mit serum-reduziertem Medium (0,05 % FCS) für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Capsaicin (10 µM) stimuliert und zu den entsprechenden Zeitpunkten (0, 1, 3, 5, 8 und 16 Stunden [h]) geerntet und die Kernextrakte gewonnen. Der Nachweis von c-Jun (obere Abbildung) erfolgte mit spezifisch gegen c-Jun gerichteten Antikörpern. Als Ladekontrolle ist die Immunreaktion von HDAC1 (untere Abbildung) mit angegeben.

Abbildung 24 zeigt die zeitabhängige Zunahme des c-Jun-Transkriptionsfaktors in Capsaicin stimulierten H2C1-Zellen. Dabei war bereits nach einer Stunde ein Anstieg in der Konzentration des c-Jun-Proteins zu beobachten. Nach fünf Stunden war die maximale c-Jun-Proteinkonzentration erreicht, die bis zur achten Stunde nach der Stimulation mit Capsaicin anhielt und nach 16 Stunden wieder absank.

4.1.5.4. c-Fos ist Teil des induzierten AP-1-Komplexes in mit Capsaicin stimulierten H2C1-Zellen

Die Zusammensetzung des AP-1 Transkriptionsfaktors ist Stimulus-abhängig und kann sich aus den Transkriptionsfaktoren der Jun-, Fos- und ATF-Proteine zusammensetzen

(Steinmüller et al., 2001). c-Jun wurde als erster Dimerisierungspartner des c-Fos-Proteins beschrieben (Chiu et al., 1988).

Um zu überprüfen, ob *c-Fos* nach der Stimulation von H2C1-Zellen mit Capsaicin verstärkt exprimiert wird, wurde zunächst untersucht, ob es zu einer erhöhten *c-Fos* Promotor-Aktivität kommt. Dazu wurden H2C1-Zellen mit Lentiviren infiziert, die für das Luziferasegen (Abbildung 25 A) unter der Kontrolle des murinen *c-Fos* Promotors (*mc-Fos.luc*) kodierten. Die Zellen wurden darauf mit Capsaicin stimuliert, die Luziferaseaktivität bestimmt und ausgewertet (siehe Abbildung 25 B).

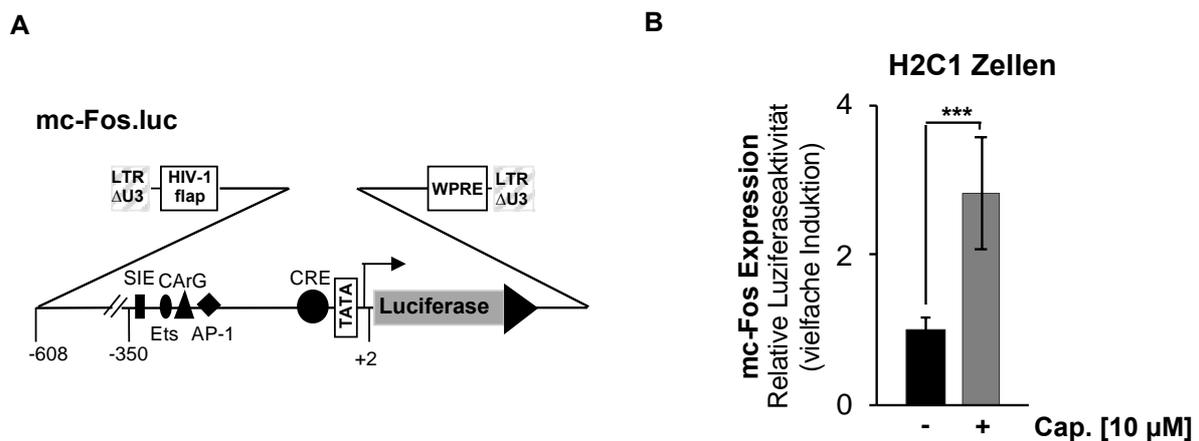


Abbildung 25: Capsaicin induziert über die Stimulation des TRPV1-Kanals eine erhöhte *c-Fos* Promotoraktivität.

A) Das integrierte Provirus, welches für das Reportergen *mc-Fos.luc* kodiert. Das Luziferasegen stand unter der Kontrolle des murinen *c-Fos* Promotors. In der Promotorregion befanden sich Transkriptionsfaktorbindestellen, wie das „cAMP response element“ (CRE), eine AP-1 Bindestelle sowie eine CArG-Box. **B)** Die Stimulation des TRPV1-Kanals erhöht die *c-Fos* Promotoraktivität. H2C1-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, welche die genetische Information für das *c-Fos*-Promotor/Luziferase-Reportergen enthielt. Die infizierten Zellen wurden wie in Abbildung 17 beschrieben behandelt und analysiert. Stimuliert wurden die Zellen mit 10 μ M Capsaicin. Der Versuch wurde zu jeder Bedingung als vierfach-Ansatz durchgeführt und gemittelt. Zusätzlich wurde der ganze Versuch dreimal wiederholt ($n=3$), und mittels Student's t-test einer statistischen Signifikanz unterzogen (***) = $P < 0,001$).

Es kam zu einer signifikanten Steigerung der Transkription des Luziferasegens, welches unter der transkriptionellen Kontrolle des murinen *c-Fos* Promotors stand, nachdem die H2C1-Zellen mit Capsaicin stimuliert wurden. Somit wurde durch Capsaicin eine erhöhte Aktivität am *c-Fos* Promotor induziert.

Nachdem gezeigt wurde, dass Capsaicin die *c-Fos* Promotoraktivität signifikant erhöht, wurde untersucht, ob sich dieser Effekt auch auf Proteinebene, mittels Western Blot, nachweisen ließ. Dazu wurden H2C1-Zellen mit 10 μ M Capsaicin inkubiert, die Kernextrakte isoliert und die Kernproteine via Western Blot analysiert. Der Nachweis von *c-Fos* in den Extrakten erfolgte mit spezifischen Antikörpern, die gegen *c-Fos* gerichtet waren (Abbildung 26).

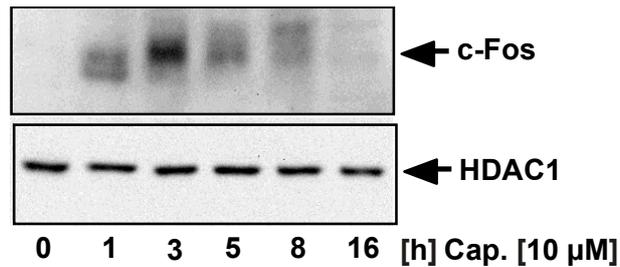


Abbildung 26: Capsaicin induziert über die Stimulation des TRPV1-Kanals eine zeitabhängige Zunahme der c-Fos Konzentration.

Der Western Blot zum Nachweis des c-Fos Proteins erfolgte wie in Abbildung 24 beschrieben. Der Nachweis von c-Fos (oberer Bildabschnitt) erfolgte mit gegen c-Fos gerichteten Antikörpern. Zusätzlich ist als Ladekontrolle HDAC1 (unterer Bildabschnitt) gezeigt.

Zum Zeitpunkt Null war keine Expression von c-Fos nachweisbar. Eine Stunde nach Stimulation der H2C1-Zellen mit Capsaicin konnte die Expression von c-Fos detektiert werden. Die maximale Konzentration an c-Fos war nach dreistündiger Inkubation mit Capsaicin erreicht und normalisierte sich daraufhin über die Zeitpunkte 5, 8 und 16 Stunden wieder. Die Stimulation von H2C1-Zellen mit Capsaicin führt somit zu einer zeitabhängigen Steigerung der Konzentration des c-Fos Transkriptionsfaktors.

4.1.6. Die gesteigerte Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 ist nicht die Folge einer verringerten Zellviabilität, oxidativem Stress oder der Induktion von Apoptose

Für den TRPV1-Kanal wurde beschrieben, dass die Stimulation mit Capsaicin zum Zelltod über Apoptose führen kann (Caterina et al., 1997; Shirakawa et al., 2008). Auch der Transkriptionsfaktor AP-1 kann in Zusammenhang mit der Induktion apoptotischer Prozesse stehen (Shaulian und Karin, 2001).

4.1.6.1. Die Aktivierung von AP-1 durch die Stimulation von TRPV1 führt nicht zu einer verringerten Zellviabilität

Um auszuschließen, dass die in Backes (2014) beschriebene Aktivierung des AP-1 Transkriptionsfaktors durch die Stimulation des TRPV1-Kanals mit Capsaicin auf veränderter Zellviabilität beruhte, wurde ein Zellviabilitäts-Assay durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen mit dem Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) inkubiert. Entsprechend der Konzentration und Aktivität der Dehydrogenasen in den Zellen konnten

diese das MTT zu dem violetten, wasserunlöslichen Farbstoff Formazan abbauen. Das gebildete Formazan konnte dann in DMSO gelöst und analysiert werden. Dabei ist die gebildete Menge an Formazan direkt proportional zur Dehydrogenase-Aktivität der Zellen.

Die Inkubation der H2C1-Zellen mit 10 μM Capsaicin bewirkte dabei keine signifikante Änderung in der Zellviabilität (Abbildung 27 A). Als Kontrolle wurden H2C1-Zellen mit 100 μM Arsenit behandelt. In diesem Ansatz kam es zu einer Reduktion der Zellviabilität (Abbildung 27 B).

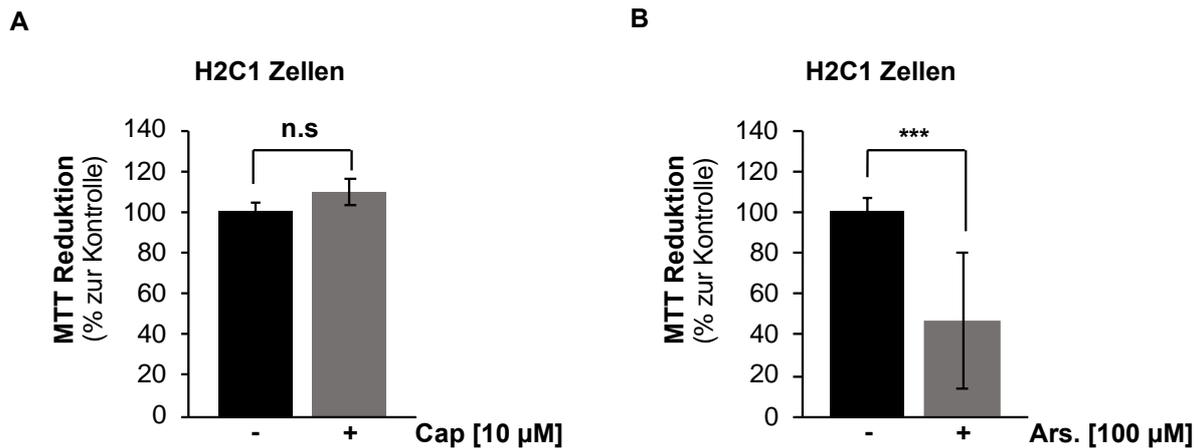


Abbildung 27: Eine Konzentration von 10 μM Capsaicin hat keinen Einfluss auf die Zellviabilität der H2C1-Zellen

5000 H2C1-Zellen wurden pro Loch auf einer 96 Lochplatte ausgesät und für 24 Stunden mit DMEM inkubiert. Danach wurden die Zellen für weitere 24 Stunden entweder mit **A)** Capsaicin (10 μM) bzw. **B)** Arsenit (100 μM) inkubiert. Die jeweiligen Proben sind prozentual zu ihren Kontrollen (Lösungsmittel) dargestellt. Die Kontrolle wurde auf 100 % normiert. Der Versuch wurde dreimal (n=3) wiederholt und zur Kontrolle der Signifikanz einem Student's t-test unterzogen (n.s = nicht signifikant; *** = P < 0,001).

4.1.6.2. Die Aktivierung des AP-1 Transkriptionsfaktors durch die Stimulation des TRPV1-Kanals mit Capsaicin, NADA oder RTX führt zu keiner erhöhten Caspase 3/7-Aktivität

Um auszuschließen, dass die Aktivierung von AP-1 auf apoptotischen Prozessen beruhte, wurde die Induktion des programmierten Zelltods mittels der Schlüsselmediatoren der Apoptose (Caspase 3 und Caspase 7) näher untersucht.

H2C1-Zellen wurden dazu entweder mit 10 μM Capsaicin (Abbildung 28 A), 5 nM RTX (Abbildung 28 B) oder 10 μM NADA (Abbildung 28 C) stimuliert und die Caspase 3/7-Aktivität bestimmt. Eine Inkubation der H2C1-Zellen mit Capsaicin, RTX oder NADA führte dabei zu keinem nachweisbaren Anstieg in der Aktivität der Caspasen 3 und 7.

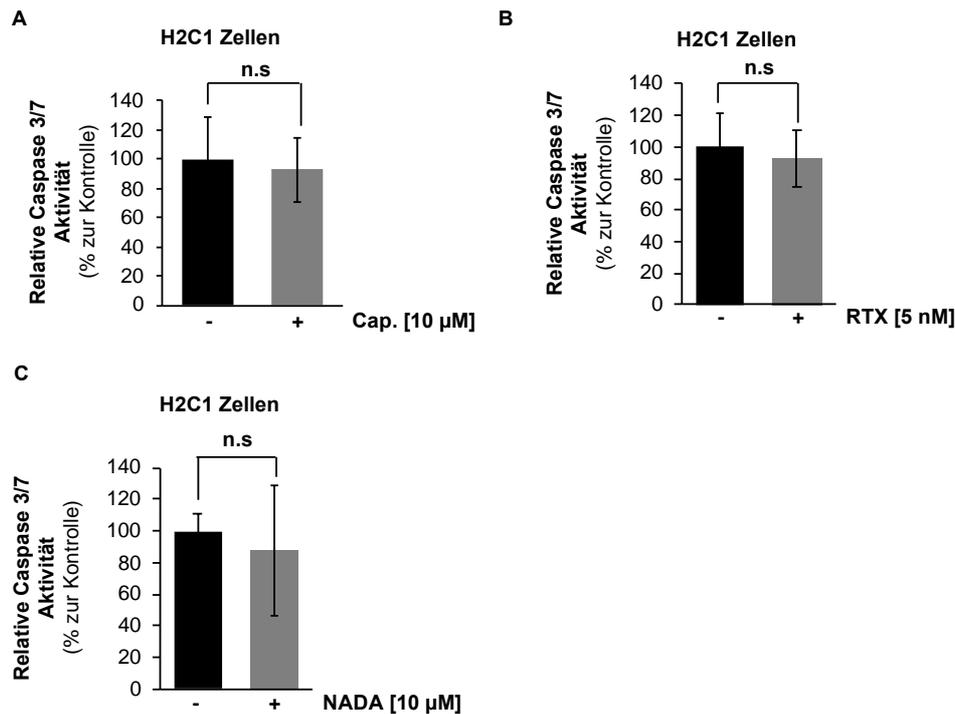


Abbildung 28: Die TRPV1-Agonisten Capsaicin, RTX oder NADA bewirken keine Aktivierung der Caspasen 3 und 7 in H2C1-Zellen.

H2C1-Zellen wurden mit den TRPV1-Agonisten, **A**) Capsaicin (Cap.) (10 µM), **B**) RTX (5 nM) oder **C**) NADA (10 µM) für 24 h inkubiert. Nach dem Ernten wurde die Caspase 3/7-Aktivität mittels des Caspase-Glo® 3/7 Assay System (Promega, Walldorf) in einem Luminometer bestimmt. Der Versuch wurde dreimal wiederholt (n=3), wobei jeder Einzelversuch aus jeweils einem vierfachen Ansatz bestand, der bei der Auswertung gemittelt wurde. Die Ergebnisse sind prozentual dargestellt und die Kontrolle entspricht 100 %. Der stimulierte Ansatz wurde prozentual auf die Kontrolle (Lösungsmittel) bezogen. Die Versuche (n=3) wurden zur Analyse der statistischen Signifikanz einem Student's t-test unterzogen (n.s.= nicht signifikant).

4.1.6.3. Die Aktivierung von AP-1 ist nicht die Folge von chemisch induziertem oder oxidativem Stress

Für die Behandlung von Krebszellen mit Capsaicin wurde beschrieben, dass es zur Induktion der Apoptose über die Induktion reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) kommen kann (Lee et al., 2004). Auf Basis dessen wurde im folgenden Versuch untersucht, ob ROS bei der Aktivierung des AP-1 Transkriptionsfaktors eine Rolle spielen. Ein wichtiger Mediator im Kampf gegen oxidativen Stress ist der bZIP Transkriptionsfaktor Nrf2. Dieser bindet an spezielle Motive innerhalb der Promotor-Region von Zielgenen, dem sogenannten „Stress Response Element“ (StRE). Das *Hmox1*-Gen, welches für die Hämoxigenase 1 (HO-1) kodiert, enthält StRE-Motive in seiner Promotorregion (Alam et al., 1999; Chan und Kan, 1999; Piantadosi et al., 2011). Die Verwendung eines Reportergens, welches in seiner Promotorregion diese Sequenzmotive aufweist, eignet sich somit zum gezielten Nachweis von oxidativem Stress.

Daher integrierte ich in das Chromatin von H2C1-Zellen, nach lentiviralem Gentransfer, das Reporter-gen StRE.luc (siehe Abbildung 29 A). Im Bereich des minimalen HO-1 Promotors waren drei Motive des StRE lokalisiert, an die Nrf2 binden konnte. Das Luziferasegen stand unter der Kontrolle dieser regulatorischen Einheit.

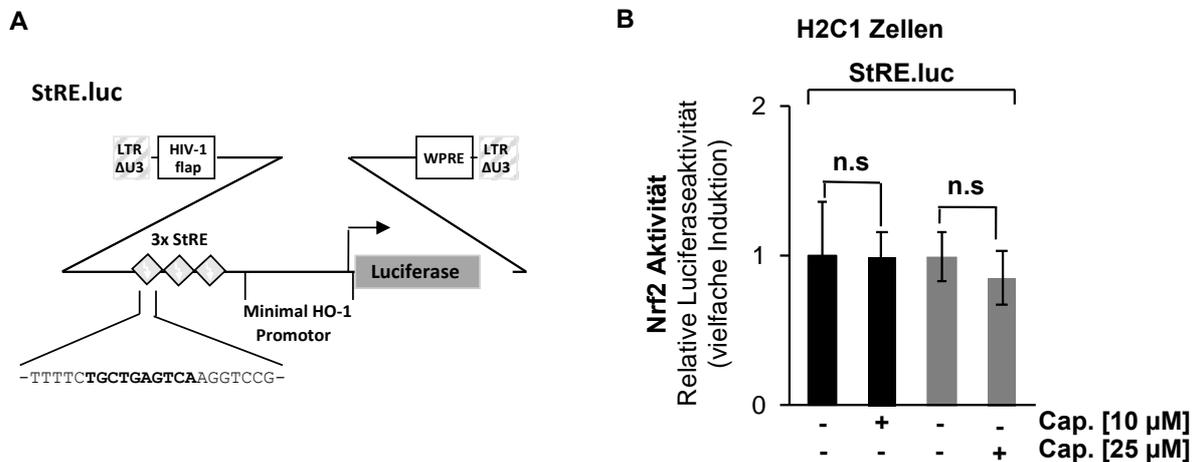


Abbildung 29: Die Stimulation von H2C1-Zellen mit Capsaicin induziert keine erhöhte Nrf2-Aktivität.

A) Das Provirus welches für das StRE.luc-Reporter-gen kodierte. Das Luziferasegen stand unter der Kontrolle eines minimalen HO-1 Promotors aus drei StRE-Wiederholungen. **B)** H2C1-Zellen, wurden mit Lentiviren infiziert, die für das Reporter-gen StRE.luc kodierte. Die Zellen wurden wie in Abbildung 17 beschrieben behandelt und analysiert. Stimuliert wurden diese mit 10 μM bzw. 25 μM Capsaicin. Der Versuch wurde zu jeder Bedingung als vierfach-Ansatz durchgeführt und gemittelt. Zusätzlich wurde der ganze Versuch dreimal wiederholt (n=3), um ihn mittels Student's t-test einer statistischen Signifikanz zu unterziehen (n.s.= nicht signifikant).

Die infizierten H2C1-Zellen wurden für 24 h Stunden mit 10 μM bzw. 25 μM Capsaicin stimuliert und darauf für die Analyse geerntet. Abbildung 29 B zeigt, dass sowohl eine Applikation von 10 μM, als auch von 25 μM zu keinem signifikanten Anstieg in der Transkription des StRE-Reporter-gens führten.

4.1.7. Pharmakologische Untersuchung des TRPV1-Kanals

Für TRPV1 wurden zahlreiche Verbindungen beschrieben, die einen aktivierenden oder inhibierenden Effekt auf TRPV1 ausüben können. Standardmäßig wurde zur Bestimmung eines aktivierten TRPV-Kanals die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach der Stimulation herangezogen (Caterina et al., 1997; Huang et al., 2002; Dhaka et al., 2009; Fenwick et al., 2017). Diese Messungen erlauben jedoch keine Aussage darüber, ob die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, zu einer Signalkaskade in der Zelle führt. Beispielsweise wurde von Lesch et al., (2014) gezeigt, dass die Stimulation von TRPM3-Kanälen mit Nifedipin zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, nicht aber der Aktivierung einer Signalkaskade, führte. In den folgenden Experimenten wurde die AP-1-

Aktivität als Messgröße verwendet. Eine Erhöhung der AP-1-Aktivität, nach Stimulation von TRPV1, ist nur bei einer Signalkaskade möglich bei der das Signal über das Zytoplasma in den Zellkern gelangt ist.

4.1.7.1. Der TRPV1-Antagonist AMG9810 verhindert die Aktivierung des AP-1 Transkriptionsfaktors nach Stimulation von TRPV1 mit Capsaicin

Zu den am meisten verwendeten Antagonisten des TRPV1-Kanals zählt der TRPV1-Inhibitor AMG9810 (Steiner et al., 2007; Bourinet et al., 2014; Vandewauw et al., 2018). Um seine Wirkung auf die TRPV1-vermittelte Aktivierung des AP-1 Transkriptionsfaktors zu testen, wurde das Coll.luc Reportergen in das Chromatin von H2C1-Zellen integriert. Vor der Stimulation mit Capsaicin wurden die Zellen mit AMG9810 (siehe Strukturformel in Abbildung 30 A) vorinkubiert.

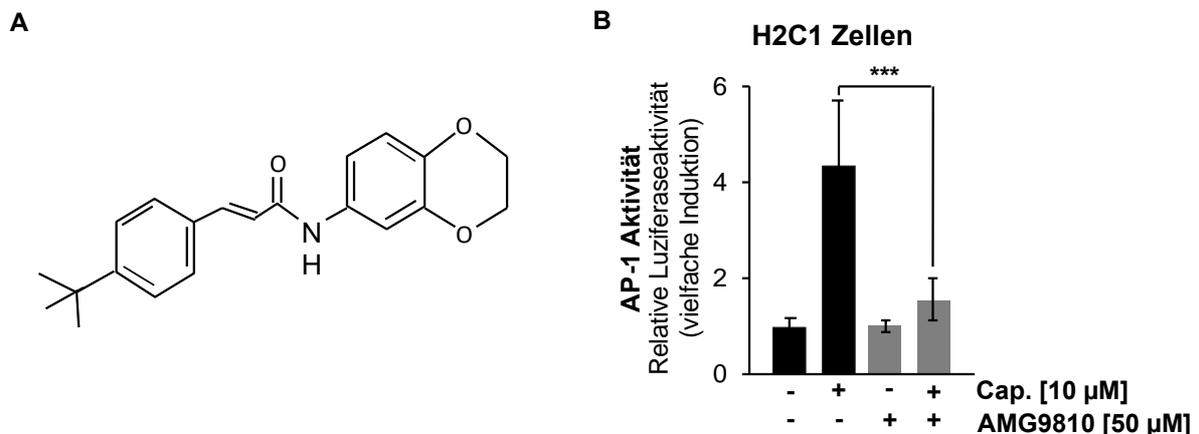


Abbildung 30: Der TRPV1-Inhibitor AMG9810 reduziert die TRPV1-vermittelte Aktivierung des AP-1 Transkriptionsfaktors nach Stimulation mit Capsaicin.

A) Strukturformel des TRPV1-Antagonisten AMG9810. **B)** H2C1-Zellen die mit Lentiviren infiziert wurden, die für das Coll.luc Reportergen kodierten. Der weitere Versuchsablauf und die Auswertung erfolgten wie in Abbildung 17 beschrieben. Die Dauer der Vorinkubation mit AMG9810 betrug fünf Stunden. Parallel zur Stimulation mit Capsaicin wurden die Zellen weiter mit AMG9810 inkubiert. Die statistische Auswertung mittels Student's t-test ergab *** ($P < 0,001$).

Die Verwendung des TRPV1-Antagonisten AMG9810 führte zu einer um 64 % geringeren Aktivierung der AP-1-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle, die nicht mit AMG9810 behandelt wurde (Abbildung 30 B).

4.1.7.2. Der MAP-Kinase-Kinase-Inhibitor PD98059 reduziert die AP-1 Aktivität nach Stimulation von H2C1-Zellen mit Capsaicin

Auf pharmakologischer Ebene wurde untersucht, ob die Aktivierung von ERK1/2 von zentraler Bedeutung für die gesteigerte AP-1-Aktivität nach Stimulation von TRPV1 mit Capsaicin war. Dazu verwendete ich den spezifischen Inhibitor, der MEK-ERK-Signalkaskade, PD98059 (Wang et al., 2017). Dieser verhindert die Phosphorylierung der MAP-Kinase-Kinase (MAPKK) MEK1 (Dudley et al., 1995). H2C1-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die das Coll.luc Reporter gen enthielten. Vor der Stimulation mit Capsaicin wurden die Zellen mit PD98059 (Abbildung 31 A) vorinkubiert und danach mit Capsaicin in Anwesenheit des Inhibitors stimuliert (Abbildung 31 B).

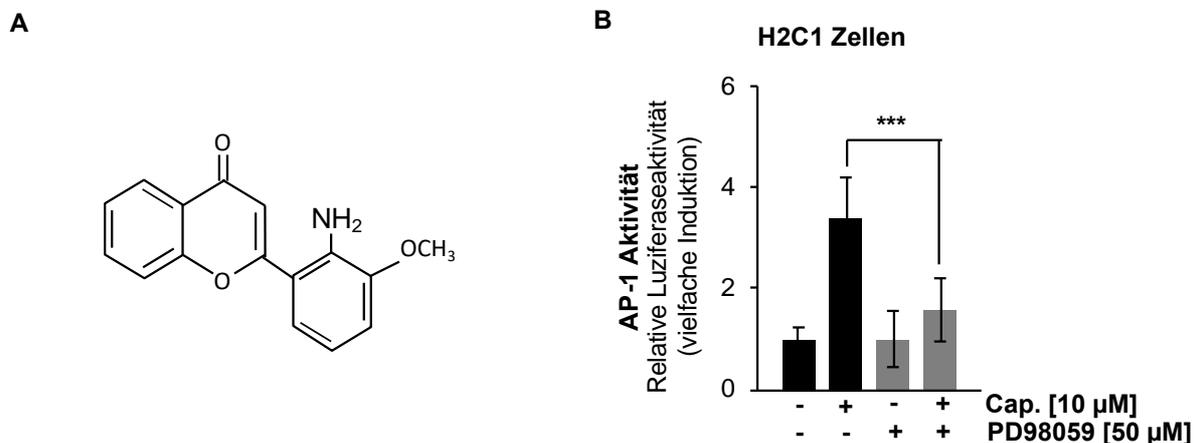


Abbildung 31: Die Inkubation der PD98059 reduziert die Aktivierung von AP-1 nach Stimulation mit Capsaicin.

A) Strukturformel des MAP-Kinase-Kinase-Inhibitors PD98059. **B)** In H2C1-Zellen wurde durch lentiviralen Gentransfer das Coll.luc-Reportergen in das Chromatin integriert. Die Zellen wurden wie in Abbildung 17 behandelt und nach dem gleichen Verfahren analysiert und ausgewertet. Der MAPKK-Inhibitor PD98059 wurde abweichend von der beschriebenen Prozedur fünf Stunden vor der 24 h Stimulation mit Capsaicin (10 µM) auf die Zellen gegeben. Der Versuch wurde dreimal wiederholt (n=3), und danach die statistische Signifikanz *** mittels Student's t-test festgestellt (***) = $P < 0,001$).

Durch die Inkubation der H2C1-Zellen mit PD98059 kam es zu einer signifikant geringeren Aktivierung (53% geringer im Vergleich zur Capsaicin stimulierten Kontrolle) von AP-1. Die Phosphorylierung von ERK1/2 durch MAPKKs wie MEK1 ist folglich ein zentraler Schritt in der Aktivierung von AP-1 nach Stimulation von TRPV1 durch Capsaicin.

4.1.7.3. 2-Aminoethoxydiphenyl-Borat (2-APB) kann AP-1 aktivieren oder nach Stimulation mit Capsaicin inhibieren

2-Aminoethoxydiphenyl-Borat (2-APB) ist als Inhibitor von TRP-Kanälen wie beispielsweise dem TRPC5-Kanal beschrieben worden (Xu et al., 2005). Für andere TRP-Kanäle, wie TRPV1 ist 2-APB hingegen als Aktivator beschrieben (Hu et al., 2004). Aufgrund dieser ambivalenten Datenlage wurde die Wirkung von 2-APB auf den TRPV1-Kanal und die AP-1-Aktivität, nach Stimulation mit Capsaicin, untersucht. Zunächst wurde die direkte Wirkung von 2-APB, in H2C1-Zellen, auf das mittels Lentiviren eingebrachte Coll.luc-Reportergen untersucht (Abbildung 32 A). Dazu wurden diese H2C1-Zellen mit 2-APB oder mit Capsaicin inkubiert und die Wirkung auf die AP-1-Aktivität gemessen (Abbildung 32 B).

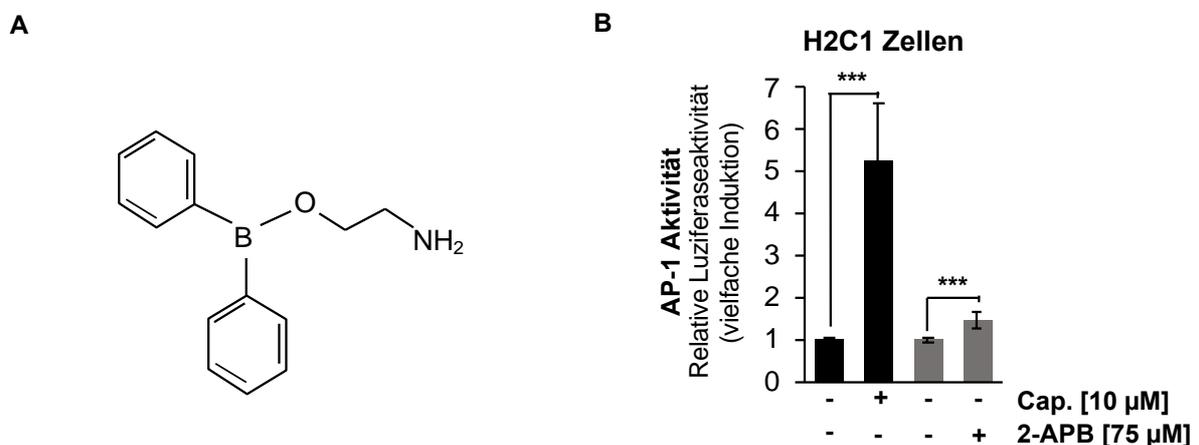


Abbildung 32: 2-APB aktiviert den Transkriptionsfaktor AP-1.

A) Strukturformel von 2-APB. **B)** H2C1-Zellen, wurden mit Lentiviren infiziert, die für das Reportergen Coll.luc kodierten. Die Analyse und Inkubation des Versuches erfolgten wie in Abbildung 17 beschrieben. Capsaicin (Cap.) wurde dabei in einer Konzentration von 10 µM und 2-APB mit 75 µM eingesetzt. Der ganze Versuch wurde dreimal wiederholt (n=3), um ihn mittels Student's t-test einer statistischen Signifikanz zu unterziehen (***) = $P < 0,001$.

Die Analyse der Daten ergab, dass 2-APB in der Lage war, AP-1 in H2C1-Zellen zu aktivieren. Im Vergleich mit Capsaicin war die Aktivierung jedoch weit weniger stark.

Da 2-APB auch als TRPV1-Inhibitor beschrieben wurde, wurde untersucht, ob 2-APB auch einen inhibitorischen Effekt auf die durch TRPV1 vermittelte AP-1-Aktivierung hat. Dazu wurden H2C1-Zellen mit Lentiviren infiziert, welche für das Coll.luc Reportergen kodierten. Diese Zellen wurden anschließend mit 2-APB vorinkubiert und daraufhin mit Capsaicin stimuliert (Abbildung 33).

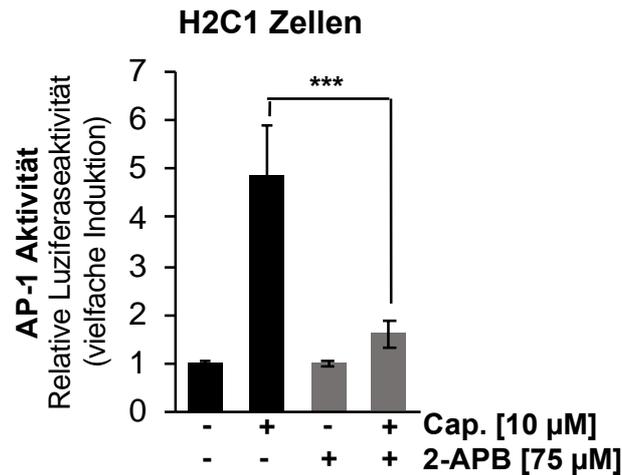


Abbildung 33: 2-APB hat einen inhibitorischen Effekt auf die AP-1-Aktivität in Capsaicin-stimulierten H2C1-Zellen.

In das Chromatin von H2C1-Zellen wurde durch lentiviralen Gentransfer das Reporterogen Coll.luc integriert. Der Versuch wurde wie in Abbildung 17 beschreiben durchgeführt und ausgewertet. 2-APB (75 µM) wurde drei Stunden vor der Inkubation mit 10 µM Capsaicin (Cap.) auf die Zellen gegeben. Die Stimulation erfolgte in den entsprechenden Versuchen zusammen mit 2-APB. Die Darstellung entspricht einem n=3 und wurde mittels Student's t-test auf statistische Signifikanz untersucht (***) = $P < 0,001$).

Die Inkubation der H2C1-Zellen mit 2-APB, führte zu einer signifikant geringeren Induktion der AP-1-Aktivität nach Stimulation mit Capsaicin. Somit wurde gezeigt, dass 2-APB in H2C1-Zellen den Transkriptionsfaktor AP-1 sowohl induzieren als auch seine Aktivierung durch Capsaicin inhibieren konnte.

4.1.7.4. Clotrimazol hat keinen Effekt auf die Aktivierung des AP-1 Transkriptionsfaktors in Capsaicin-stimulierten H2C1-Zellen

Clotrimazol wurde als Aktivator des TRPV1-Kanals und als Inhibitor des TRPM8-Kanals beschrieben (Meseguer et al., 2008). Ob Clotrimazol auch auf den TRPV1-Kanal inhibitorisch wirken kann, ist bisher nicht bekannt. Um dies zu überprüfen, wurden H2C1-Zellen mit Lentiviren infiziert, die für das Coll.luc Reporterogen kodierten. Die Zellen wurden mit Clotrimazol (Clo.) vorinkubiert und danach mit Capsaicin für 24 h stimuliert (Abbildung 34).



Abbildung 34: Clotrimazol hat keinen inhibitorischen Effekt auf die AP-1-Aktivität nach Stimulation von TRPV1 mit Capsaicin.

A) Strukturformel von Clotrimazol. **B)** Das Reportergen Coll.luc wurde in H2C1-Zellen mittels Lentiviren eingebracht. Ablauf und Auswertung entsprachen der in Abbildung 17 gezeigten Vorgehensweise. Die Zellen wurden vor der 24 h Inkubation mit Capsaicin mit 2 µM Clotrimazol (Clo.) vorbehandelt. Die Stimulation erfolgte in den entsprechenden Versuchen zusammen mit Clotrimazol. Das Experiment wurde dreimal wiederholt (n=3) und mittels Student's t-test auf seine Signifikanz überprüft (n.s = nicht signifikant).

Die gleichzeitige Inkubation von H2C1-Zellen mit Clotrimazol und Capsaicin zeigte, dass es zu keiner Inhibition der AP-1-Aktivität kam. Clotrimazol wirkt somit für die Aktivierung von AP-1 über den TRPV1-Kanal nicht als Inhibitor.

4.1.7.5. Der TRPV1-Antagonist BCTC führt zu einer geringeren Induktion der AP-1-Aktivität nach Stimulation von H2C1-Zellen mit Capsaicin

BCTC (Abbildung 35 A) ist als potenter und selektiver Antagonist des TRPV1-Kanals beschrieben worden (Valenzano et al., 2003). Methodisch wurde dabei die inhibitorische Wirkung von BCTC auf den TRPV1-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom in das Zytoplasma der Zelle untersucht. Diese Messmethode ermöglichte aber keinen Rückschluss auf die Aktivierung des AP-1-Komplexes. Deshalb wurde untersucht, ob die Stimulation von AP-1 nach Aktivierung des TRPV1-Kanals mit Capsaicin durch BCTC inhibiert werden konnte. Dazu wurde das Coll.luc Reportergen in H2C1-Zellen integriert. Diese Zellen wurden daraufhin mit BCTC vorinkubiert und danach mit Capsaicin stimuliert (Abbildung 35 B).

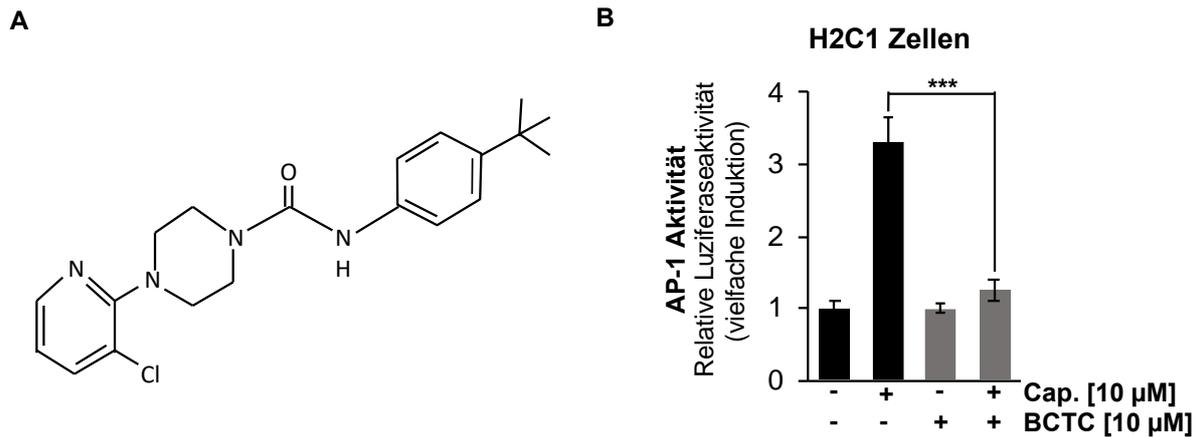


Abbildung 35: BCTC verhindert die Aktivierung von AP-1, in Capsaicin-stimulierten H2C1-Zellen, fast vollständig.

A) Strukturformel des TRPV1-Antagonisten BCTC. **B)** Mittels lentiviralem Gentransfer wurde das Reportergen Coll.luc in das Chromatin von H2C1-Zellen integriert. Infektion, Stimulation und Auswertung erfolgten wie in Abbildung 17 beschrieben. Abweichend von diesem Protokoll wurden die Zellen für drei Stunden mit BCTC (10 µM) vorbehandelt und danach für 24 h mit Capsaicin (10 µM) und unter weiterer Verwendung von BCTC (10 µM) stimuliert. Der gezeigte Versuch entspricht einer dreifachen Wiederholung (n=3). Die Signifikanz wurde mittels Student's t-test bestimmt (***) = $P < 0,001$.

Die Inkubation der Zellen mit BCTC verhinderte fast vollständig die Aktivierung des AP-1 Transkriptionsfaktors nach Stimulation des TRPV1-Kanals mit Capsaicin. Somit hatte BCTC nicht nur den bereits beschriebenen inhibitorischen Effekt auf den Ca^{2+} -Einstrom in das Zytoplasma, sondern auch auf die Aktivierung von AP-1.

4.1.7.6. Das Sexualhormon Progesteron hat einen inhibitorischen Effekt auf die AP-1-Aktivität nach Stimulation von H2C1-Zellen mit Capsaicin

Für den TRPV1-Kanal wurden nur wenige endogene regulatorische Verbindungen beschrieben. Progesteron hat starke inhibitorische Effekte auf die Aktivität der TRP-Kanäle TRPC5, TRPC6 und TRPM3 (Majeed et al., 2011, 2012; Miehe et al., 2012; Lesch et al., 2014). Im Folgenden wurde untersucht, ob Progesteron (Abbildung 36 A) einen vergleichbaren Einfluss auf die Aktivität des TRPV1-Kanals und damit der AP-1-Aktivierung hat. H2C1-Zellen, die die genetische Information für das Coll.luc Reportergen enthielten, wurden mit Progesteron vorinkubiert und anschließend mit Capsaicin stimuliert (Abbildung 36 B).

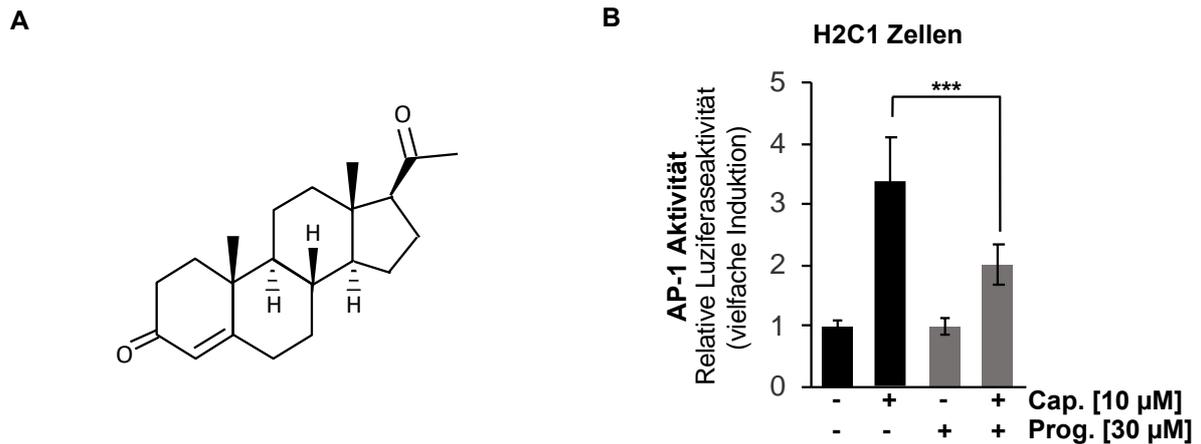


Abbildung 36: Progesteron hat einen inhibitorischen Effekt auf die Aktivität von AP-1 in Capsaicin stimulierten H2C1-Zellen.

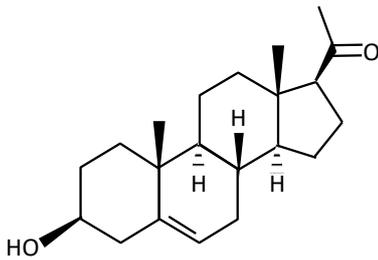
A) Chemische Struktur des Sexualhormons Progesteron. **B)** H2C1-Zellen, die das Reporterogen Coll.luc enthielten wurden wie in Abbildung 17 beschrieben behandelt und analysiert. Neben der Stimulation mit Capsaicin (10 µM) wurden die Zellen für drei Stunden mit Progesteron (30 µM) (Prog.) vorinkubiert. Die Stimulation mit Capsaicin erfolgte zusammen mit Progesteron. Nach dreimaligem Wiederholen des Versuchs (n=3) wurde die Signifikanz mittels Student's t-test bestimmt (***) = $P < 0,001$.

Die gleichzeitige Inkubation von H2C1-Zellen mit Progesteron und Capsaicin führte zu einer signifikant verringerten Aktivität des AP-1 Transkriptionsfaktors. Somit konnte auch für Progesteron ein inhibitorischer Effekt auf die TRPV1 vermittelte AP-1-Aktivierung nachgewiesen werden.

4.1.7.7. Pregnenolon wirkt inhibitorisch auf die AP-1-Aktivität, nach der Stimulation von TRPV1 mit Capsaicin

Ein Einfluss von Pregnenolon (Preg.) (Abbildung 37 A) auf den TRPV1-Kanal wurde bisher nicht beschrieben. H2C1-Zellen wurden vor der Stimulation mit Capsaicin mit Pregnenolon vorinkubiert (Abbildung 37 B). Die Zellen enthielten nach lentiviralem Gentransfer die genetische Information für das Coll.luc Reporterogen.

A



B

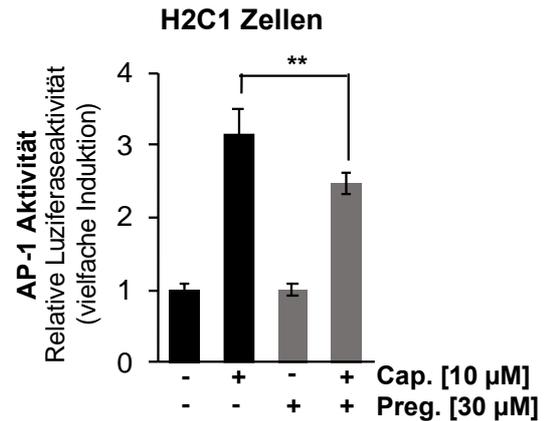


Abbildung 37: Pregnenolon hat einen schwachen inhibitorischen Effekt auf die Aktivierbarkeit von AP-1, in Capsaicin stimulierten H2C1-Zellen.

A) Strukturformel des Neurosteroids Pregnenolon. **B)** Die H2C1-Zellen, in die zuvor über lentivirale Infektion die genetische Information für das Reportergen Coll.luc eingebracht wurde, wurden wie in Abbildung 17 beschrieben behandelt und analysiert. Das Neurosteroid Pregnenolon (Preg.) (30 µM) wurde drei Stunden vor der Stimulation mit Capsaicin auf die Zellen gegeben und blieb auch während der 24 h Stimulation mit Capsaicin (10 µM) auf den Zellen. Der gezeigte Versuch wurde dreimal wiederholt (n=3), und mittels Student's t-test einer statistischen Signifikanz unterzogen ($P < 0,01 = **$).

Der Einsatz von Pregnenolon in H2C1-Zellen, welche mit Capsaicin stimuliert wurden, ergab einen signifikanten, wenn auch schwachen, inhibitorischen Effekt auf die AP-1-Aktivität. Pregnenolon könnte somit eine endogene Rolle bei der Regulation des TRPV1-Kanals spielen.

4.2. Stimulus-responsive Transkriptionsfaktoren in Insulinomazellen und pankreatischen β -Zellen

Im zweiten Teil dieser Arbeit stehen die Stimulus-responsiven Transkriptionsfaktoren im Zentrum der Untersuchung. Die Transkriptionsfaktoren AP-1 und Elk-1 werden nach der Stimulation von pankreatischen β -Zellen mit Glukose aktiviert (Bernal-Mizrachi et al., 2001; Müller et al. 2010). Welche Rolle diese Proteine in den β -Zellen spielen war jedoch nicht bekannt. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurden neue transgene Mauslinien generiert.

4.2.1. Der Transkriptionsfaktor AP-1 und seine Bedeutung in der Regulation der Glukosehomöostase

Untersuchungen von Susini et al. (1998) zeigten, dass eine Stimulation von Insulinoma-Zellen (INS-1) mit Glukose zu einer Expression von c-Jun und c-Fos führte. Der Transkriptionsfaktor-Komplex AP-1 wurde in vielen Fällen als Heterodimer aus c-Jun und c-Fos beschrieben (Lee et al., 2012). Dabei zeigte sich, dass die Zusammensetzung von AP-1 aus Jun- und Fos-Proteinen stabiler als andere Kombinationsmöglichkeiten ist (Alonso et al., 2018). Aufgrund dessen wurde zur Untersuchung der Rolle von AP-1 in β -Zellen die dominant negative Mutante A-Fos verwendet. Die Mutante setzt sich aus dem Leucinzipper von c-Fos und einer sauren Domäne, welche die basische Domäne austauscht, zusammen. Damit zwingt A-Fos die Dimerisierungsproteine in einen inaktiven Komplex, eine Transaktivierung bleibt somit aus (Abbildung 38) (Olive et al., 1997).

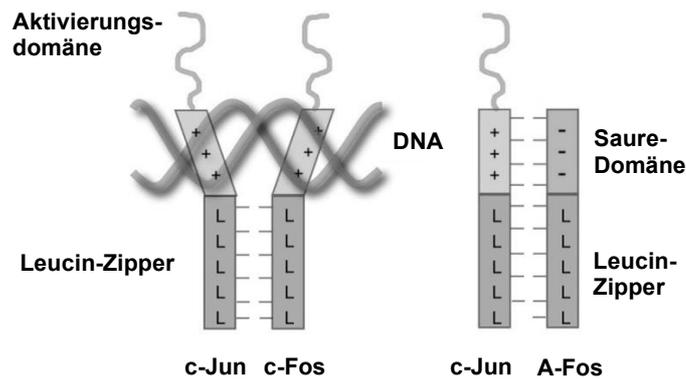


Abbildung 38: Das Dimerisieren von A-Fos mit c-Jun verhindert die DNA-Bindung.

Das c-Fos Protein bildet zusammen mit c-Jun den Transkriptionsfaktorkomplex AP-1. Die Dimerisierung erfolgt über die Leucin-Zipper-Domäne. Sind beide Proteine zusammengelagert, so stoßen sich die basischen DNA-Bindedomänen aufgrund ihrer positiven Ladung gegenseitig ab und bilden eine DNA-Bindefurche mit Aktivierungsdomäne (linker Bildabschnitt). Bei der dominant negativen Mutante A-Fos ist die basische Domäne durch eine saure-Domäne ersetzt und die Aktivierungsdomäne entfernt worden. Bildet A-Fos mit c-Jun einen Komplex, lagern sich nicht nur die Leucin-Zipper Domänen aneinander, sondern auch die basische und saure Domäne. Es kommt nicht zur Ausbildung einer DNA-Bindefurche und eine Transaktivierung bleibt aus (rechter Bildabschnitt). Abbildung entnommen und verändert nach Backes et al. (2021).

4.2.1.1. Die Expression von A-Fos in INS-1 832/13-Zellen verhindert die Aktivierung des AP-1 Transkriptionsfaktors über $Ca_v1.2$

Glukose induziert die Aktivierung von „L-Type Calcium Channels“ in den β -Zellen des Pankreas (Müller et al., 2010). Ein wichtiger Vertreter ist der Calcium-Ionen-Kanal $Ca_v1.2$ (Schulla et al., 2003). Nach der Depolarisation der β -Zelle kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären Calcium-Ionen-Konzentration, in deren Konsequenz die Insulin-Sekretion angeschaltet wird (Boyd, 1992). Der $Ca_v1.2$ -Kanal nimmt dabei eine zentrale Rolle ein (Nitert et al., 2008). Für Diabetes Typ 2 konnte gezeigt werden, dass die Regulation über $Ca_v1.2$ -Kanäle gestört ist (Tuluc et al., 2021). Experimentell kann man die Depolarisation der Zellen auch durch die Gabe von Kaliumchlorid (KCl) induzieren (Brüning et al., 2017). Der „L-Type Calcium Channel“ kann auch pharmakologisch durch die Verbindung FPL64176 aktiviert werden (Müller et al., 2011; Langfermann et al., 2018; Thiel et al., 2019). Langfermann et al., (2018) und Müller et al., (2011) konnten zeigen, dass die Stimulation von INS-1 832/13 Insulinoma-Zellen mit KCl/FPL64176 zu einer Induktion des AP-1 Transkriptionsfaktors führt. Für die Bearbeitung von β -Zell-assoziierten Fragestellungen werden häufig Insulinoma-Zellen, wie die Zelllinie INS-1 832/13 herangezogen (Hohmeier et al., 2000; Hectors et al., 2013). Sie ermöglichen einfachere und schnellere Ergebnisse im Vergleich zu aufwändigeren Mausmodellen. Im folgenden Versuch wurde in diesem Modellsystem untersucht, ob und welchen Effekt die Expression von A-Fos auf die Aktivierung von AP-1 haben konnte.

Dazu wurden INS-1 832/13-Zellen mit Lentiviren infiziert, die für A-Fos kodierten. Diese Zellen wurden dann mit KCl/FPL stimuliert und die Luziferaseaktivität bestimmt (siehe Abbildung 39).

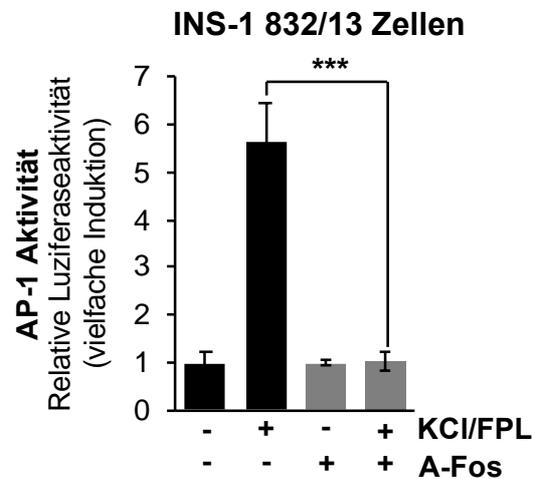


Abbildung 39: Die dominant negative Mutante A-Fos verhindert die Aktivierung von AP-1 nach Stimulation von Cav1.2-Ca²⁺-Kanälen.

INS-1 832/13-Zellen wurden mit Lentiviren, die für das Reporterogen Coll.luc kodierten infiziert. Die gleichen Zellen wurden mit Viren infiziert, die für die dominant-negative Mutante A-Fos kodierten. Die weitere Inkubation der Zellen sowie die Analyse erfolgte wie in Abbildung 17 beschrieben. Stimuliert wurden die Zellen mit KCl (55 mM) und FPL64176 (2,5 μ M) für 24 h. Der Versuch wurde als vierfach-Ansatz durchgeführt und insgesamt dreimal wiederholt (n=3). Die Standardabweichung ist an den einzelnen Balken angegeben, sowie die durch Student's t-test ermittelte Signifikanz: *** = P<0,001. Abbildung entnommen und verändert nach (Backes et al., 2021).

Die Stimulation der INS-1 832/13-Zellen mit den „L-Type Calcium Channel“ Aktivatoren KCl und FPL64176 führte zu einem starken Anstieg in der AP-1-Aktivität. Diese Aktivität konnte fast vollständig durch die Expression von A-Fos unterbunden werden.

4.2.1.2. Die dominant negative Mutante A-Fos hat keinen Einfluss auf die Caspase 3/7-Aktivität in KCl/FPL stimulierten INS-1 832/13-Zellen

In einem weiteren Experiment sollte zunächst geklärt werden, ob es zur Induktion apoptotischer Prozesse über die Expression von A-Fos kam. Von Bedeutung war diese Betrachtung, da in Hepatozyten nachgewiesen werden konnte, dass eine Hemmung von AP-1 zu Apoptose führen kann (Eferl et al., 2003). Zudem ist ein wichtiger Schritt in der Entstehung von Diabetes die Induktion apoptotischer Prozesse (Tomita, 2016). Zur Klärung wurde in INS-1 832/13-Zellen A-Fos exprimiert und die Zellen mit KCl/FPL64176 stimuliert (Abbildung 40).

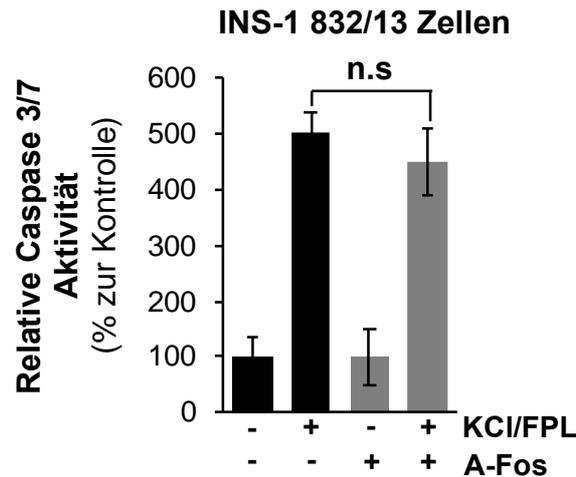


Abbildung 40: Die Expression der dominant negativen Mutante A-Fos induziert keine gesteigerte Caspase 3/7-Aktivität in INS-1 832/13-Zellen.

Die Caspase Aktivität von KCl/FPL64176-stimulierten INS-1 832/13-Zellen wurde gemessen. Die Zellen exprimierten entweder beta-Galaktosidase (Kontrolle) oder A-Fos. Die Bestimmung und Analyse der Caspase 3/7 Aktivität erfolgte wie in Abbildung 28 beschrieben. Die Standardabweichung ist an den einzelnen Balken angegeben, sowie die durch Student's t-test ermittelte Signifikanz: n.s = nicht signifikant.

Durch die Stimulation von INS-1 832/13-Zellen mit KCl und FPL kam es zu einer ca. fünffachen Erhöhung der Caspase 3/7-Aktivität im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle. Im gleichen Versuchsansatz führte die Expression von A-Fos zu keiner Änderung der Caspase 3/7-Aktivität und war somit nicht in der Lage apoptotische Prozesse zu induzieren.

4.2.1.3. Die Stimulation von INS-1 832/13-Zellen mit KCl und FPL64176 führt zu einer verstärkten Aktivierung des c-Jun Promotors

Die Expression von A-Fos hatte aufgezeigt, dass der Transkriptionsfaktor-Komplex AP-1 eine wichtige Rolle in der $Ca_v1.2$ vermittelten Signalkaskade spielt. Um zu überprüfen, ob es durch die Stimulation von INS-1 832/13-Zellen mit KCl und FPL64176 zu einer erhöhten *c-Jun*-Expression kommt, wurde in Zusammenarbeit mit Daniel Langfermann das Reporter-gen *c-Jun.luc* verwendet. *c-Jun.luc* kodiert für ein Luziferasegen unter der Kontrolle des *c-Jun*-Promotors, der zwei „TPA response elements“ (TRE)“ enthält (siehe Abbildung 41). Das TRE wurde als AP-1-Bindestelle in der Promotorregion des *c-Jun*-Gens beschrieben (Angel et al., 1988).

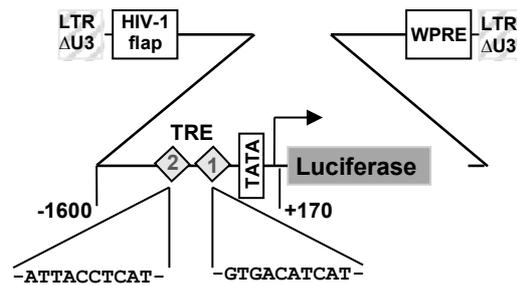
c-Jun.luc

Abbildung 41: Das Reporter gen c-Jun.luc.

Das Provirus enthält das Reporter gen c-Jun.luc. Das Luciferasegen steht unter der Kontrolle des c-Jun-Promotors der zwei „TPA response elements“ (TRE) besitzt, an welche der Transkriptionsfaktor AP-1 binden kann.

INS-1-Zellen wurden mit einem Lentivirus infiziert, der das Jun.luc Reporter gen enthielt. Abbildung 42 zeigt, dass eine Stimulation der Zellen mit KCl und FPL64176 zu einer Steigerung der Reporter genaktivität führte.

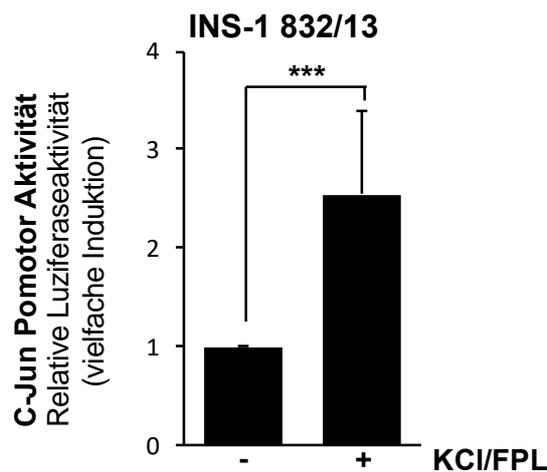


Abbildung 42: Die Stimulation der INS-1 832/13-Zellen mit KCl und FPL64176 aktiviert die Transkription des c-Jun-Promotorgens.

INS-1 832/13-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die für das c-Jun.luc Reporter gen kodierten. Nach der Infektion wurden die Zellen mit KCl (55 mM) und FPL64176 (2,5 μ M) stimuliert. Nach der Stimulation wurden die Zellen geerntet, die Proteinkonzentration bestimmt und die Luciferasewerte auf diese normiert. Die erhaltenen Werte wurden auf ihre Kontrollen bezogen und als relative Luciferaseaktivität in der Abbildung dargestellt. Durch einen Student's t-test wurde die Signifikanz ermittelt: *** = $P < 0,001$.

4.2.1.4. Die Expression der dominant negativen Mutante c-Jun Δ N unterdrückt die Aktivierung von AP-1 in INS-1 832/13-Zellen nach Stimulation des Ca_v1.2-Kanals

Um zu zeigen, ob c-Jun Teil des AP-1-Komplexes ist, wurde eine dominant negative Mutante von c-Jun in INS-1 832/13-Zellen exprimiert. Die Mutante c-Jun Δ N setzt sich aus der bZIP-Dimerisierungs- und DNA-Bindungs-Domäne zusammen (siehe Abbildung 43 A). Ihr fehlt die Transaktivierungsdomäne. Somit kann c-Jun Δ N zwar einen Komplex mit einem Dimerisierungspartner bilden und an die DNA binden, eine Transaktivierung bleibt jedoch aus.

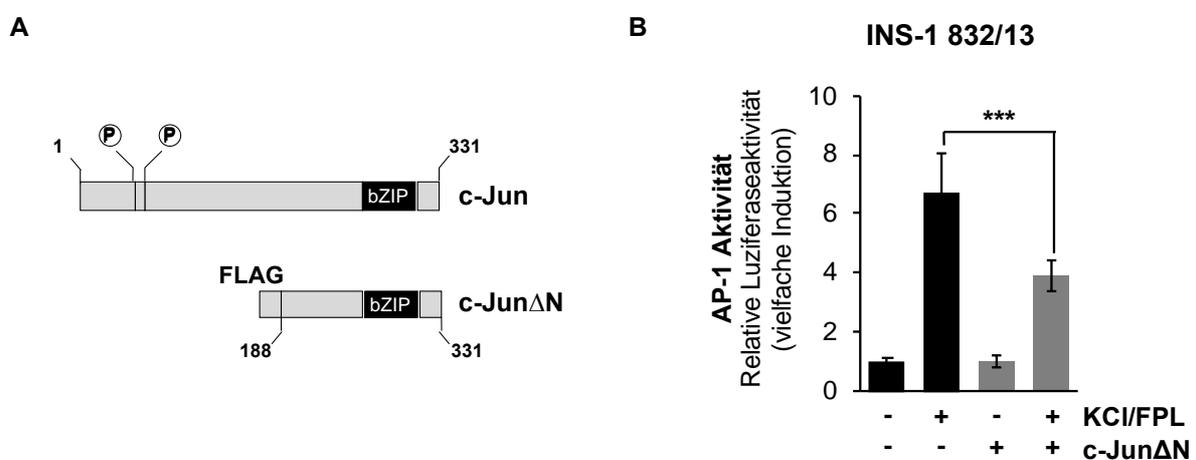


Abbildung 43: Die dominant negative Mutante c-Jun Δ N unterdrückt die Aktivierung von AP-1 in INS-1 832/13-Zellen nach der Stimulation mit KCl/FPL64176.

A) Die dominant negative Mutante c-Jun Δ N setzt sich aus der Aminosäuresequenz 188-331 zusammen. Diese beinhaltet die bZIP Dimerisierungs- und DNA-Bindungsdomäne. Eine Transaktivierung ist durch die Deletion der Transaktivierungs-Domäne nicht möglich. **B)** Zur Expression von c-Jun Δ N in INS-1 832/13-Zellen wurden diese mit Lentiviren infiziert, die für die Mutante c-Jun Δ N kodierten. Gleichzeitig waren die Zellen, nach lentiviralem Gentransfer, in der Lage das Coll.luc Reporter gen zu exprimieren. Die weitere Inkubation, Stimulation und Analyse der Zellen erfolgten wie in Abbildung 17 beschrieben. Die Stimulation der Zellen wurde mit KCl (55 mM) und FPL64176 (2,5 μ M) für 24 h durchgeführt. Mittels Student's t-test wurde die Signifikanz ermittelt: *** = $P < 0,001$.

Die gleichzeitige Expression von c-Jun Δ N und Coll.luc in INS-1-Zellen zeigte nach der Stimulation mit KCl und FPL64176, dass es zu einer 42 % geringeren Aktivierungsrate von AP-1 kam (Abbildung 43 B). Somit war nachgewiesen, dass c-Jun Teil des AP-1-Komplexes ist.

4.2.1.5. Die pharmakologische Inhibition der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) führt zu einer geringeren AP-1-Aktivierung nach Stimulation der INS-1 832/13-Zellen mit KCl/FPL64176

Für c-Jun ist bekannt, dass es ein sehr gutes Substrat für die „c-Jun-N-terminale Kinase“ (JNK) ist (Lopez-Bergami et al., 2007). Die Kinase JNK nimmt eine wichtige Rolle in der Regulation von β -Zellen des Pankreas ein. So führt eine Stimulation von höheren Glukosekonzentrationen in den β -Zellen zur Induktion apoptotischer Prozesse (Donath et al., 1999). Ähnliche Beobachtungen wurden unter Einwirkung von Zytokinen, wie IL-1 gemacht (Ammendrup et al., 2000). Eine Hemmung von JNK verhindert die Induktion dieser Apoptose-Prozesse (Ferdaoussi et al., 2008; Maedler et al., 2008). Im Kontrast dazu steht, dass das gezielte Aktivieren von JNK nicht ausreichend ist um in β -Zellen Apoptose zu induzieren (Lanuzas-Masdeu et al., 2013).

Um die mögliche Beteiligung von JNK an der AP-1-Aktivierung nach Stimulation mit KCl und FPL64176 in INS-1 832/13-Zellen zu untersuchen, wurde der spezifische JNK Inhibitor JNK-IN-8 verwendet. Dieser verhindert die Phosphorylierung des JNK Zielproteins c-Jun durch JNK (Zhang et al., 2012). INS-1 832/13-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die für das Reporterogen Coll.luc kodierten. Nach der Infektion wurden die gleichen Zellen mit JNK-IN-8 vorinkubiert und darauf mit KCl und FPL64176 stimuliert (Abbildung 44).

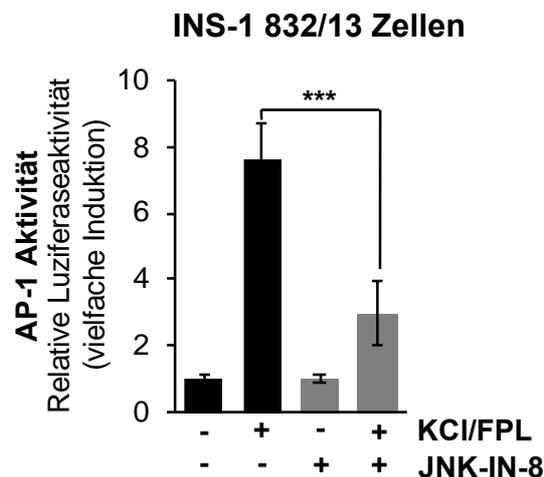


Abbildung 44: Die Inkubation der INS-1 832/13-Zellen mit dem JNK-Inhibitor JNK-IN-8 führt zu einer verringerten Aktivierung von AP-1 nach der Stimulation der Zellen mit KCl und FPL64176.

INS-1 832/13-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die für das Reporterogen Coll.luc kodierten. Der JNK Inhibitor JNK-IN-8 (1 μ M) wurde drei Stunden vor der Inkubation mit KCl (55 mM) und FPL64176 (2,5 μ M) auf die Zellen gegeben. Die Stimulationszeit betrug 24 h. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde ein Student's t-test durchgeführt: *** = $p < 0,001$.

Der JNK Inhibitor JNK-IN-8 war in der Lage, die Aktivierung des AP-1 Transkriptionsfaktors nach der Stimulation mit KCl/FPL64176 um 61 % zu reduzieren. Dieses Resultat zeigte, dass die Aktivierung von JNK notwendig ist, um nach der Stimulation des Ca_v1.2-Kanals den Transkriptionsfaktor AP-1 zu aktivieren.

4.2.2. Die transgene Maus [tetO]₇ A-Fos

Zur Klärung der Frage, welche Rolle AP-1 in pankreatischen β -Zellen spielt, wurden zusammen mit Daniel Langfermann und Andrea Lesch transgene Mäuse verwendet, die die dominant negative Mutante A-Fos exprimierten (Gerdes et al., 2006) (siehe Abbildung 38). Die transgene Mauslinie war so konzipiert, dass A-Fos nicht konstitutiv, sondern induzierbar in pankreatischen β -Zellen exprimiert werden konnte. Die Kodierregion von A-Fos wurde dazu unter die Kontrolle von sieben Kopien des tet-Operators gestellt (siehe Abbildung 13). An diese Sequenzen konnte der reverse Tetracyclin-Transaktivator rtTA binden und die Transkription des A-Fos-kodierenden Transgens induzieren.

4.2.2.1. Generierung der doppelt transgenen Mauslinie RIP-rtTA/[tetO]₇ A-Fos

Um A-Fos in den β -Zellen des Pankreas zu exprimieren, wurde die [tetO]₇ A-Fos Mauslinie mit der RIP-rtTA-Linie (Milo-Landesman et al., 2001) gekreuzt (siehe Kreuzungsschema in Abbildung 45).

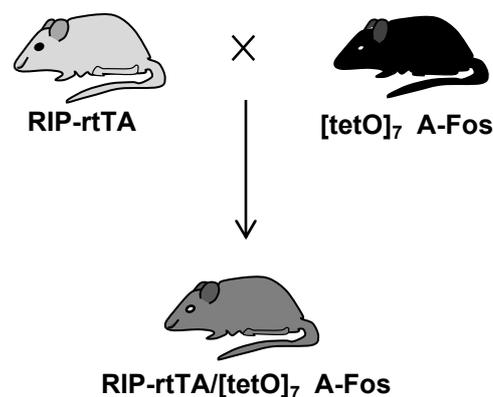


Abbildung 45: Generierung der doppelt transgenen Mauslinie RIP-rtTA/[tetO]₇ A-Fos.

Die beiden Mauslinien RIP-rtTA und [tetO]₇ A-Fos wurden miteinander zu der doppelt transgenen Mauslinie RIP-rtTA/[tetO]₇ A-Fos verpaart. Entnommen aus (Backes et al., 2021).

So entstand eine doppelt transgene Mauslinie, in der durch die Gabe von Doxycyclin in das Trinkwasser eine gezielte Expression von A-Fos in den β -Zellen des Pankreas der Mäuse ermöglicht wurde.

4.2.2.2. Die Expression der dominant negativen Mutante A-Fos in β -Zellen des Pankreas führt zu einer signifikanten Reduktion der Glukosetoleranz

Die β -Zellen des Pankreas übernehmen mit der stimulus-induzierten Sekretion von Insulin eine wichtige Funktion in der Regulation der Glukosehomöostase. Mir stellte sich unter Berücksichtigung der vorangegangenen Zellkultur Resultate die Frage, ob die Inhibition von AP-1 in transgenen Mäusen, einen Einfluss auf die Glukosehomöostase hat. Zur Klärung dessen wurden Glukosetoleranztests mit doppelt transgenen RIP-rtTA/[tetO]₇ A-Fos-Mäusen durchgeführt. In diesen transgenen Mäusen konnte doxycyclin-abhängig die Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 gehemmt werden.

Nach einer 8-12 wöchigen Gabe von Doxycyclin über das Trinkwasser wurden die RIP-rtTA/[tetO]₇ A-Fos-Mäuse für 6 Stunden nüchtern gesetzt (normales Trinkwasser war verfügbar). Danach wurden den Versuchsmäusen 2 g Glukose pro Kilogramm Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Es folgte die Entnahme einer geringen Menge Blut über die Kaudalvene zur Bestimmung der Blutglukosekonzentration zu verschiedenen Zeitpunkten (Abbildung 46).

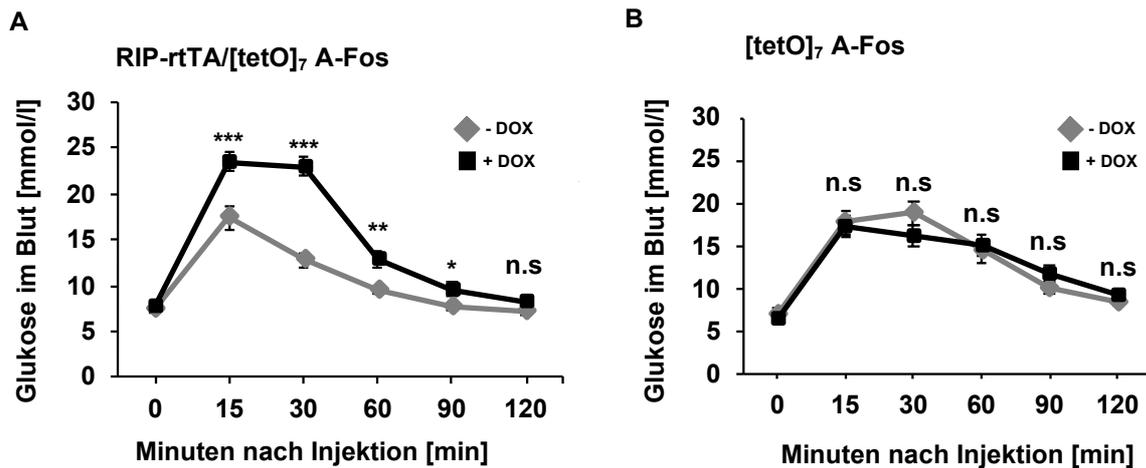


Abbildung 46: Expression von A-Fos in pankreatischen β -Zellen induziert Glukoseintoleranz.

Glukosetoleranztest: Es wurden die Glukose Konzentrationen im Blut der doppelt transgenen Mäuse RIP-rtTA/[tetO]₇ A-Fos (**A**) oder der homozygoten [tetO]₇ A-Fos Kontrolltiere (**B**), zu den Zeitpunkten 0 (Messwert vor der Glukose Applikation (2 g/kg Körpergewicht)), 15, 30, 60, 90 und 120 Minuten [min] gemessen. Die Kontrolltiere (- DOX, grau) wurden den mit Doxycyclin (+ DOX, schwarz) behandelten Tieren gegenübergestellt. Die Glukosekonzentration im Blut wurde in mmol/l angegeben. Die Standardfehler sind zu den angegebenen Zeitpunkten dargestellt, sowie die durch Student's t-test ermittelten Signifikanzen: ***= P<0,001, **= P<0,01, *= P<0,05, n.s= nicht signifikant. Für die doppelt transgenen Mäuse entsprach die Testkohorte einem n= 16. Die homozygoten A-Fos Mäuse umfassten n=17 Tiere.

Ein signifikanter Anstieg der Glukosekonzentration im Blut der Versuchstiere war durch die Expression von A-Fos zu beobachten (Abbildung 46 A). Die Konzentration der Glukose im Blut blieb auch 90 Minuten nach der Glukose-Injektion signifikant erhöht. Dies führte zu dem Schluss, dass die Hemmung der AP-1-Aktivität in den β -Zellen des Pankreas eine gestörte Glukosehomöostase induzierte. Im Vergleich dazu kam es unter den gleichen Versuchsbedingungen in den Kontrolltieren zu keiner signifikanten Änderung des Glukosespiegels (Abbildung 46 B). Die quantitative Erfassung der Ergebnisse aus dem Intraperitonealen Glukosetoleranztest (IPGTT) lieferte die Betrachtung der Fläche unter der Kurve (AUC). Dazu wurde die gesamte Fläche für den Zeitraum 0-60 und 60-120 Minuten genommen und die mit Doxycyclin behandelten Tiere ihren nicht behandelten Kontrolltieren gegenübergestellt. Die Ergebnisse können der Abbildung 47 entnommen werden.

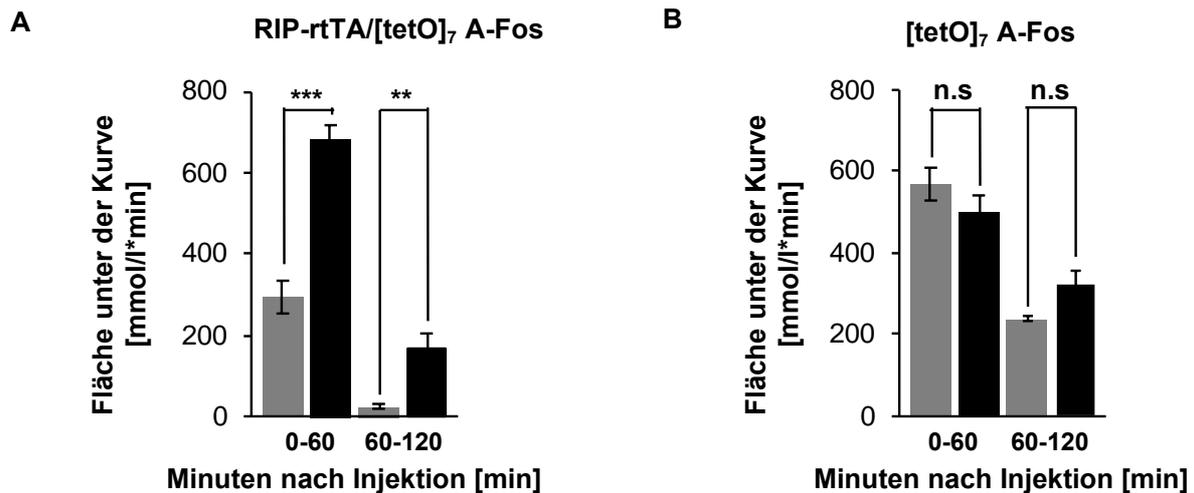


Abbildung 47: Die Quantifizierung des IPGTT verdeutlicht die entkoppelte Glukosehomöostase in den RIP-rtTA/[tetO]₇ A-Fos-Mäusen nach Expression von A-Fos.

Intraperitonealer Glukosetoleranz-Test (IPGTT), dargestellt als „area under the curve“ (AUC) in mmol/l*min. **A)** Fläche unter der Kurve zu den Zeitpunkten 0-60 min und 60-120 min der doppelt transgenen Mäuse (RIP-rtTA/[tetO]₇ A-Fos). Der graue Balken repräsentiert die Kontrolltiere, der schwarze Balken die mit Doxycyclin behandelten Tiere. **B)** Fläche unter der Kurve der homozygoten [tetO]₇ A-Fos Kontrolltiere zu den Zeitpunkten 0-60 min und 60-120 min. Der Messwert 0 entspricht dem Zeitpunkt vor der Glukose Applikation (2 g/kg Körpergewicht). Es wurden die mit Sucrose im Trinkwasser behandelten Kontrolltiere (- DOX, grauer Balken) den mit Doxycyclin (+ DOX, schwarzer Balken) behandelten Tieren gegenübergestellt. Die Standardabweichung ist an den einzelnen Balken angegeben, sowie die durch Student's t-test ermittelten Signifikanzen: *** = p<0,001, ** = p<0,01, n.s = nicht signifikant. Die Anzahl der Tiere entspricht denen aus Abbildung 46.

Die so ermittelten AUC-Werte veranschaulichen die signifikante Zunahme des Glukosespiegels der mit Doxycyclin behandelten doppelt transgenen Mäuse. In beiden Zeiträumen (0-60 und 60-120 Minuten) war die Zunahme der Konzentration an Glukose im Blut der mit Doxycyclin behandelten doppelt transgenen Mäuse signifikant erhöht (Abbildung 47 A). In keinem der beiden Zeiträume kam es zu einer signifikanten Änderung der Glukosekonzentration in den homozygoten Kontrolltieren (Abbildung 47 B).

4.2.2.3. Die Expression von A-Fos führt nicht zu kleineren β -Zellen

Müller et al. (2012) zeigten, dass die Expression einer dominant negativen Mutante des Transkriptionsfaktor Egr-1 (early growth response protein 1) in pankreatischen β -Zellen transgener Mäuse zu einer verringerten β -Zellmasse führt. Auf Grundlage dieser Daten wurde der Effekt der A-Fos Expression auf die Größe der β -Zellen in doppelt transgenen A-Fos Mäusen untersucht. Dazu wurden die Pankreata der entsprechenden Versuchs- und Kontrolltiere operativ entfernt und in Paraffin eingebettet. Die Microtomschnitte wurden mit H&E-Reagenzien gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte unter dem Mikroskop betrachtet und mittels einer Software die Fläche der Inseln im Pankreas-Gewebe bestimmt und

verglichen. Abbildung 48 A zeigt beispielhaft die analysierten Schnitte der doppelt transgenen A-Fos-Mäuse und der Kontrolltiere.

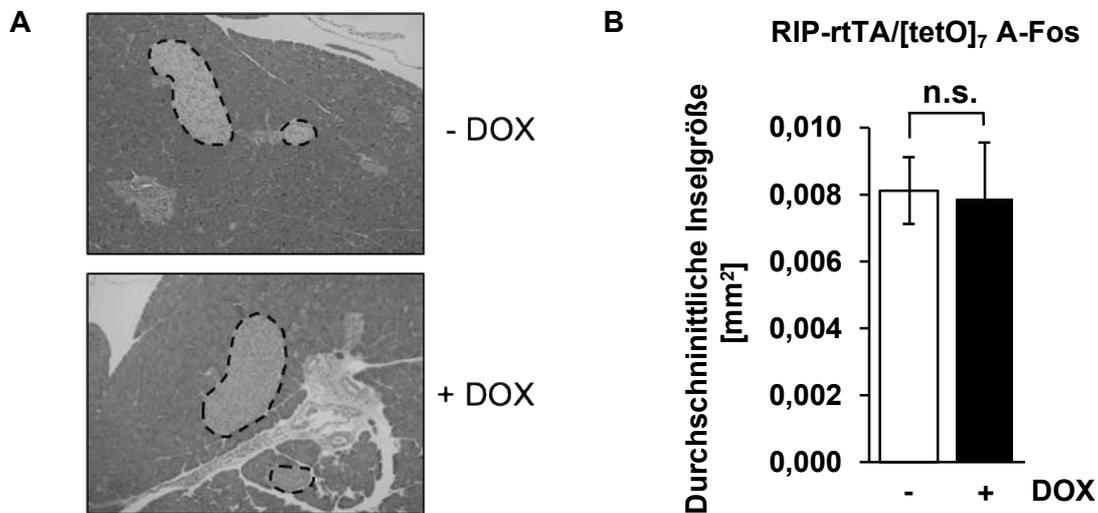


Abbildung 48: Die Expression von [tetO]₇ A-Fos im Pankreas von Mäusen führt zu keiner veränderten Inselgröße.

A) Beispielhafte Darstellung der H&E-gefärbten Pankreas-Schnitte für ein mit Sucrose behandeltes Kontrolltier (- DOX) und ein mit Doxycyclin behandeltes RIP-rtTA/[tetO]₇ A-Fos-Tier (+ DOX). **B)** Morphometrische Analyse von RIP-rtTA/[tetO]₇ A-Fos-Mäusen, die mit Doxycyclin (+ DOX) oder als Kontrolle mit Sucrose (- DOX) im Trinkwasser behandelt wurden. Die Pankreata wurden operativ aus den Mäusen gewonnen und in Paraffin eingebettet. Nur jeder 6. Schnitt (5 µm) von Kopf-, Mittel- und Schwanzstück des Pankreas wurde für die Auswertung verwendet. Bei den Kontrolltieren wurden 451 Inseln und bei den mit Doxycyclin behandelten Tieren 481 Inseln ausgewertet. Die Größe der Inseln ist in mm² angegeben. Zu jeder Bedingung wurden für die Morphometrie drei Tiere herangezogen (n=3). Durch Anwendung des Student's t-test wurde die Signifikanz zwischen den beiden Gruppen bestimmt (n.s. = nicht signifikant). Abbildung entnommen und verändert nach (Backes et al. 2021).

Abbildung 48 B zeigt die durchschnittlichen Inselgrößen der mit Doxycyclin behandelten Tiere im Vergleich zu ihren unbehandelten Kontrolltieren. Im Gegensatz zu den von Müller et al. (2012) gezeigten Ergebnissen kam es in den RIP-rtTA/[tetO]₇ A-Fos-Mäusen zu keiner Änderung der Größe der Inseln. Somit ist eine veränderte β-Zellgröße nicht ursächlich für den beobachteten diabetischen Phänotyp aus der Glukosetoleranz-Messung.

4.2.3. Der „ternary complex factor“ Elk-1 und seine Rolle in pankreatischen β-Zellen

Der Transkriptionsfaktor Elk-1 gehört zu den „ternary complex factors“ (TCF's) und bindet dabei an einen „Serum Response Factor“ (SRF)-Dimer. Neben Elk-1 wurden Sap-1 und Sap-2 als TCF's beschrieben. Für Elk-1 ist bekannt, dass es den AP-1 Transkriptionsfaktor reguliert, indem es Einfluss auf die Expression von *c-fos* nimmt (Karin, 1995; Rubil et al., 2016). Weiter reguliert Elk-1 die Expression des Egr-1-Gens über multiple „serum-response

elements“ (SRE) im Egr-1 Promotor (Clarkson et al., 1999; Mayer et al., 2008, 2011; Müller et al., 2012). In MIN6-Insulinoma-Zellen wurde gezeigt, dass eine Stimulation der Zellen mit Glukose und EGF (epidermal growth factor) eine Aktivierung von Elk-1 über den ERK1/2-Signalweg induziert (Bernal-Mizrachi et al., 2001). In dieser Arbeit sollte die funktionelle Rolle von Elk-1 in pankreatischen β -Zellen aufgeklärt werden.

4.2.3.1. Generierung der doppelt transgenen Mauslinie RIP-rtTA/[tetO]₇-REST/Elk-1 Δ C

Die Untersuchung zur Rolle der TCFs *in vivo* stellte sich als schwierig heraus, da die TCFs untereinander kompensatorisch wirken können (Cesari et al., 2004; Costello et al., 2004). Ein Knockout von zwei bis drei TCFs führt zu unfruchtbaren Tieren (Costello et al., 2010). Aufgrund dieser Problematik wurde hier in Zusammenarbeit mit Daniel Langfermann und Andrea Lesch eine andere Herangehensweise gewählt. Hierzu wurde eine dominant negative Mutante von Elk-1, induzierbar, in pankreatischen β -Zellen exprimiert. Diese dominant negative Mutante blockiert die biologische Aktivität von Elk-1, Sap-1 und Sap-2. Von Rössler et al. (2016) wurde eine Mauslinie mit der Bezeichnung [tetO]₇-REST/Elk-1 Δ C beschrieben. Diese Mauslinie enthält die genetische Information für die Expression der dominant negativen Mutante des Elk-1-Proteins (Abbildung 49 A). Elk-1 besitzt eine DNA-Bindungsdomäne, eine SRF-Bindungsdomäne und eine Transaktivierungsdomäne. Die REST/Elk-1 Δ C Mutante ist ein Fusionsprotein aus der SRF- und DNA- Bindungsdomäne von Elk-1 mit der N-terminalen Repressionsdomäne des transkriptionellen Repressors REST. Wie in Abbildung 49 B zu sehen, ist die Elk-1 Mutante in der Lage, an der DNA-Bindestelle (Ets-Domäne) sowie an das SRF-Dimer zu binden. Da bei der Elk-1-Mutante die Aktivierungsdomäne deletiert wurde, kann es nicht zur Transkriptions-Induktion kommen. Durch die Expression der REST-Repressordomäne kommt es zur Rekrutierung von Histondeacetylasen zu den Transkriptionseinheiten, an welche REST/Elk-1 Δ C gebunden ist.

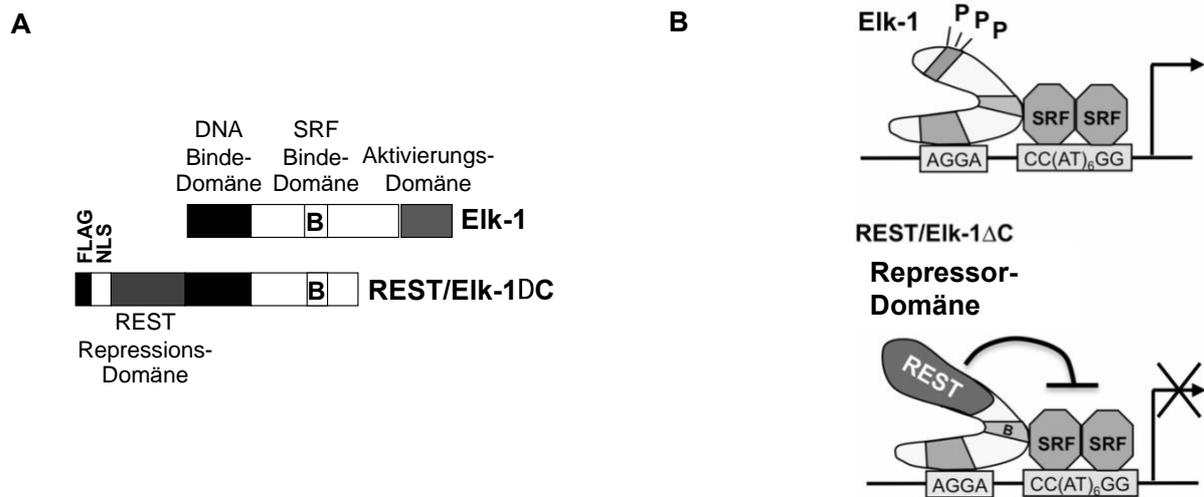


Abbildung 49: Modularer Aufbau und Wirkungsweise von Elk-1 sowie seiner dominant negativen Mutante REST/EIk-1ΔC.

A) Modulare Struktur des Elk-1 Proteins und der Mutante REST/EIk-1ΔC. Elk-1 besitzt eine DNA-Bindungsdomäne, eine SRF-Bindungsdomäne und eine Aktivierungsdomäne. Bei der dominant negativen Mutante REST/EIk-1ΔC wurde die Aktivierungsdomäne deletiert. An die DNA-Bindungsdomäne wurde ein „Nuclear Localisation Signal“ (NLS), ein FLAG-Tag und die N-terminale Repressordomäne von REST angeschlossen. **B)** Wirkmechanismus von Elk-1 sowie der dominant negativen Mutante von Elk-1 (REST/EIk-1ΔC). Diese kann an ihre DNA-Bindestelle mit der Sequenz AGGA (Ets) sowie dem Dimer des „Serum Response Factors“ (SRF) binden. Das SRF-Dimer bindet an seine Erkennungssequenz CC(AT)₆GG der sogenannten CArG-Box. Im oberen Teil der Abbildung ist Elk-1 dargestellt, das an seine DNA-Erkennungssequenz sowie an das SRF-Dimer bindet und die Expression eines entsprechenden Zielgens aktiviert. Im unteren Teil der Abbildung ist die dominant negative Mutante REST/EIk-1ΔC dargestellt. Diese ist in der Lage, wie Elk-1, an die DNA sowie das SRF-Dimer zu binden, es fehlt jedoch die Aktivierungsdomäne. Zusätzlich verstärkt die Repressordomäne REST den inhibitorischen Effekt.

Um zu gewährleisten, dass die Expression nur in den β -Zellen des Pankreas stattfand, wurden die transgenen [tetO]₇-REST/EIk-1ΔC-Mäuse mit einer zweiten transgenen Mauslinie, den RIP-rtTA-Mäusen (Milo-Landesman et al., 2001) verpaart, um doppelt transgene Mäuse zu generieren (siehe Kreuzungsschema in Abbildung 50). In diesen Mäusen konnte die Elk-1 Mutante induzierbar in pankreatischen β -Zellen exprimiert werden.

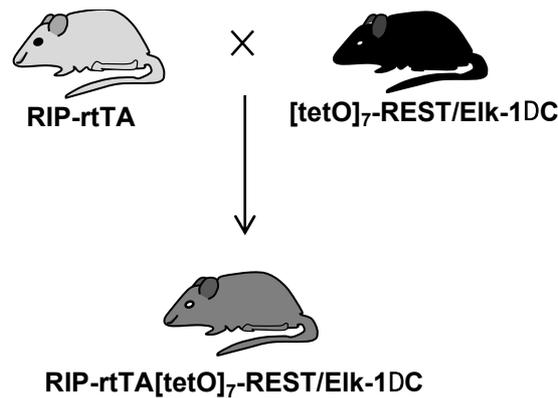


Abbildung 50: Kreuzungsschema der doppelt transgenen RIP-rtTA[tetO]₇-REST/Elk-1ΔC-Mauslinie.

Die beiden Mauslinien RIP-rtTA und [tetO]₇-REST/ELK-1ΔC wurden zusammen verpaart, um die Mauslinie RIP-rtTA[tetO]₇-REST/Elk-1ΔC zu generieren. Bei dieser Mauslinie stand die Expression der dominant negativen Mutante REST/ELK-1ΔC unter der Kontrolle des Insulinpromotors II der Ratte. Die Gabe von Doxycyclin im Trinkwasser führte zur gezielten Expression der Mutante in pankreatischen β-Zellen der Versuchstiere.

Die Expression der Mutante war durch die Verwendung des Tet-Systems und die Gabe von Doxycyclin (DOX) gezielt steuerbar und lieferte somit die Möglichkeit gezielt die Funktion von Elk-1 in β-Zellen aufzuklären.

4.2.3.2. Die Expression der dominant negativen Mutante REST/Elk-1ΔC in β-Zellen führt zu einer signifikanten Reduktion der Glukosetoleranz

Von Müller et al., (2012) wurde gezeigt, dass die Expression einer dominant negativen Egr-1-Mutante in den β-Zellen des Pankreas von Versuchsmäusen zur Ausbildung einer Glukoseintoleranz führte. Die Expression von Egr-1 wird über Elk-1 reguliert, weshalb ich von der Hypothese ausging, dass Elk-1 ebenso eine Funktion in der Regulation der Glukosehomöostase zukommt. Aus diesem Grund wurde mit den doppelt transgenen RIP-rtTA[tetO]₇-REST/Elk-1ΔC-Mäusen ein Intraperitonealer Glukosetoleranztest durchgeführt. Dazu wurden die Mäuse nach der Geburt mit Doxycyclin im Trinkwasser versorgt. Die Kontrolltiere bekamen sucrose-haltiges Wasser. Nach 8-12 Wochen wurden die Tiere für 6 Stunden nüchtern gesetzt. Danach wurde den Tieren 2 g Glukose pro kg Körpergewicht intraperitoneal appliziert und zu verschiedenen Zeitpunkten Blut aus der Kaudalvene entnommen und die Glukosekonzentration bestimmt (Abbildung 51).

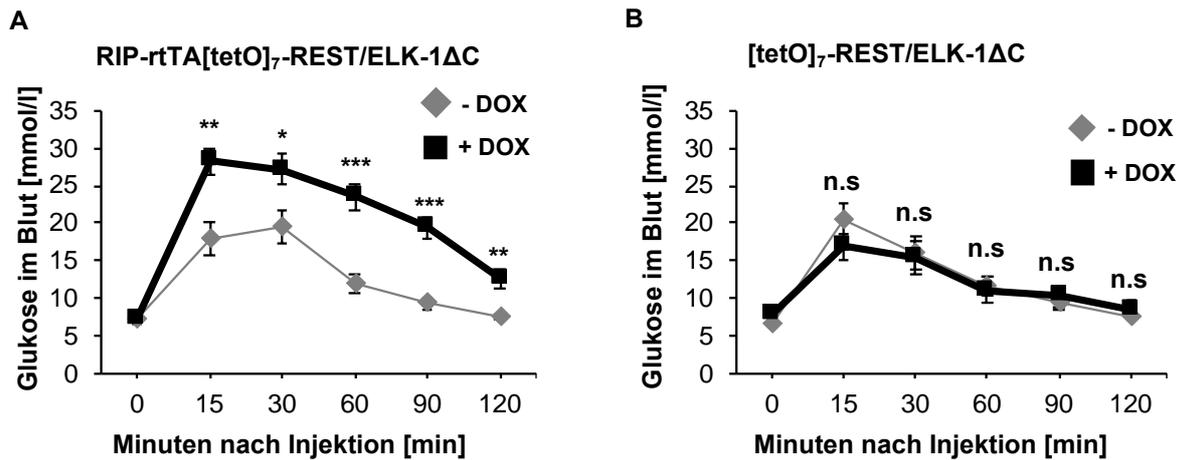


Abbildung 51: Der Intraperitoneale Glukosetoleranz Test (IPGTT) zeigt in RIP-rtTA[tetO]₇-REST/Elk-1ΔC-Mäusen eine Entkopplung der Glukosehomöostase.

Bestimmung der Glukose-Konzentrationen im Blut doppelt transgener Mäuse (RIP-rtTA[tetO]₇-REST/Elk-1ΔC) (**A**) und der homozygoten [tetO]₇-REST/Elk-1ΔC-Kontrolltiere (**B**) zu den Zeitpunkten 0 (Messwert vor der Glukose Applikation (2 g/kg Körpergewicht)), 15, 30, 60, 90 und 120 Minuten [min]. Es wurden die Kontrolltiere (- DOX, grau) den mit Doxycyclin (+ DOX, schwarz) behandelten Tieren gegenübergestellt. Die Glukosekonzentration im Blut ist in mmol/l angegeben. Die Standardfehler sind zu den angegebenen Zeitpunkten dargestellt, sowie die durch Student's t-test ermittelten Signifikanzen: *** = P<0,001, ** = P<0,01, * = P<0,05, n.s = nicht signifikant. Zu jeder Bedingung entsprach die Testkohorte n= 8.

Die gezielte Expression der dominant-negativen Mutante REST/Elk-1ΔC in den β-Zellen des Pankreas der doppelt transgenen RIP-rtTA[tetO]₇-REST/Elk-1ΔC-Mäuse ergab eine signifikant erhöhte Glukosekonzentration im Blut der mit Doxycyclin-behandelten Mäuse, im Vergleich zu den mit Sucrose behandelten Kontrolltieren (Abbildung 51 A). Bei den homozygoten REST/Elk-1ΔC-Mäusen wurde kein Unterschied zwischen den mit Doxycyclin oder Sucrose behandelten Tieren festgestellt (Abbildung 51 B).

In Abbildung 52 sind die Messergebnisse als Fläche unter der Kurve ausgewertet worden, um die beobachteten Unterschiede zu quantifizieren.

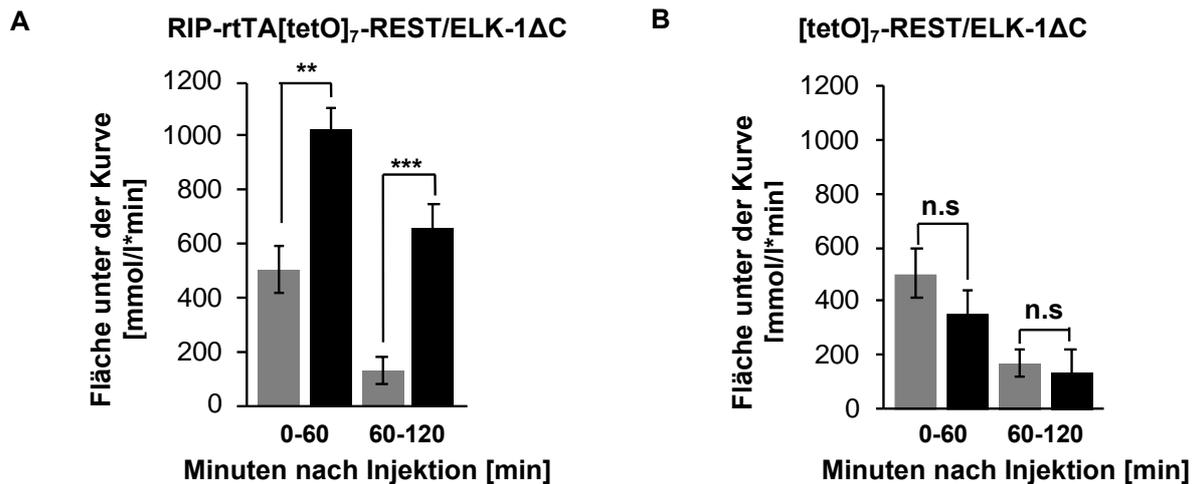


Abbildung 52: Die RIP-rtTA[tetO]₇-REST/Elk-1ΔC-Mäuse zeigen in der Quantifizierung eine deutlich gesteigerte Glukoseintoleranz.

Der intraperitoneale Glukosetoleranztest (IPGTT), als Fläche unter der Kurve [mmol/l*min]. **A)** Fläche unter der Kurve zu den Zeitpunkten 0-60 min und 60-120 min der doppelt transgenen Mäuse (RIP-rtTA[tetO]₇-REST/Elk-1ΔC), **B)** der homozygoten [tetO]₇-REST/Elk-1ΔC-Kontrolltiere zu den Zeitpunkten 0-60 min und 60-120 min. Der Messwert 0 entspricht dem Zeitpunkt vor der Glukose-Applikation (2 g/kg Körpergewicht). Es wurden die mit Sucrose im Trinkwasser behandelten Kontrolltiere (- DOX, grauer Balken) den mit Doxycyclin (+ DOX, schwarzer Balken) behandelten Tieren gegenübergestellt. Die Standardabweichung ist an den einzelnen Balken angegeben, sowie die durch Student's t-test ermittelten Signifikanzen: *** = P<0,001, ** = P<0,01, n.s. = nicht signifikant. Zu jeder Bedingung entsprach die Testkohorte n= 8.

Die Überexpression von REST/Elk-1ΔC in den Versuchsmäusen zeigte, dass die TCFs wie Elk-1 eine wichtige Funktion bei der Regulation der Glukosehomöostase haben (Abbildung 52 A). Bei den Kontrolltieren war keine signifikante Änderung nach Gabe von Doxycyclin zu beobachten (Abbildung 52 B). Eine Hemmung der Aktivität der TCF-Proteine in den pankreatischen Zellen hatte zur Folge, dass es zum Ausbilden eines diabetischen Phänotyps kam.

4.2.4. Ternäre Komplex Faktoren regulieren die Größe von pankreatischen Inseln

Nachdem gezeigt wurde, dass das Blockieren der TCF-Aktivität zu einer signifikanten Steigerung in der Glukoseintoleranz führte, wurde untersucht, welche Mechanismen dafür verantwortlich waren. Für Typ 2-Diabetes ist bekannt, dass eine Verringerung der β-Zellmasse ein entscheidender Schritt in der Ausbildung und Aufrechterhaltung dieses Diabetes-Typus ist (Sakuraba et al., 2002; Cho et al., 2011). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob sich nach der Expression von REST/Elk-1ΔC in doppelt-transgenen RIP-rtTA[tetO]₇-REST/Elk-1ΔC-Mäusen die Inselgröße veränderte. Abbildung 53 A zeigt beispielhaft zwei unterschiedlich

große pankreatische Inseln in Gewebsschnitten. Die durchschnittliche Größe aller vermessenen Inseln kann dem Balkendiagramm in Abbildung 53 B entnommen werden.

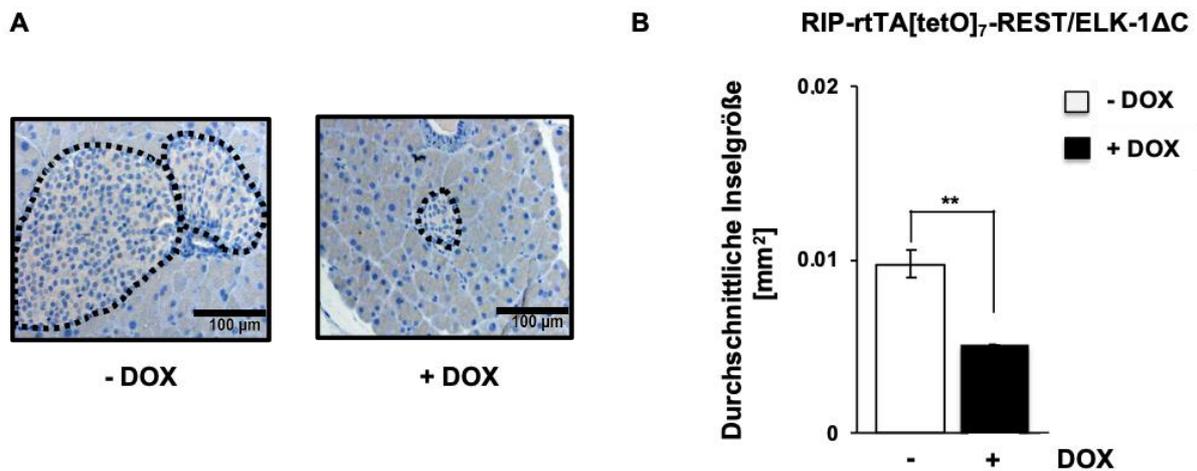


Abbildung 53: Die Expression von REST/Elk-1ΔC in pankreatischen β-Zellen transgener Mäuse führt zu einer verringerten Inselgröße.

Morphometrische Analyse von RIP-rtTA[tetO]₇-REST/Elk-1ΔC-Mäusen, die Doxycyclin (+ DOX) oder nur Sucrose (- DOX) in das Trinkwasser bekamen. **A)** Pankreas-Gewebsschnitt eines mit Doxycyclin behandelten Tieres und eines mit Sucrose behandelten Kontrolltieres. Die Färbung des Gewebes erfolgte mittels HE-Färbung. Die Größenverhältnisse sind durch einen Marker angegeben (100 μm). **B)** Statistische Auswertung aller vermessenen Inseln (mm²). Die mit Sucrose (- DOX) behandelten Tiere sind den mit Doxycyclin behandelten Tieren gegenübergestellt. Nur jeder 6. Schnitt (5 μm) von Kopf-, Mittel- und Schwanzstück des Pankreas wurde für die Auswertung verwendet. Zu jeder Bedingung wurden für die Morphometrie drei Tiere herangezogen (n=3). Durch Verwendung des Student's t-test wurde die Signifikanz zwischen den beiden Gruppen bestimmt (** = P<0,01).

Die morphometrische Analyse der Inseln ergab eine signifikante Verringerung der Größe der Inseln in den doppelt-transgenen Mäusen, im Vergleich zu den mit Sucrose gehaltenen Kontrolltieren.

4.2.5. Die Expression von REST/Elk-1ΔC induziert Apoptose in der INS-1 832/13-Zelllinie

Im nächsten Schritt wurden Experimente durchgeführt, um die verringerte Größe der Inseln in RIP-rtTA[tetO]₇-REST/Elk-1ΔC-Mäusen zu erklären. Apoptotische Prozesse spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung von Diabetes und damit auch für die damit einhergehende Intoleranz gegenüber Glukose (Tomita, 2016). Des Weiteren konnte von Müller et al. (2012) gezeigt werden, dass es in Mäusen, die eine mutierte Variante des Egr-1-Proteins besaßen, zu einer Erhöhung der Caspase-3-Aktivität kam.

Insulinoma-Zellen (INS-1 832/13-Zellen) wurden mit einem Lentivirus infiziert, der für die dominant negative Mutante REST/EIk-1 Δ C kodierte. Nach zwei Tagen wurde die Caspase 3/7-Aktivität in den Zellen bestimmt und statistisch ausgewertet (Abbildung 54).

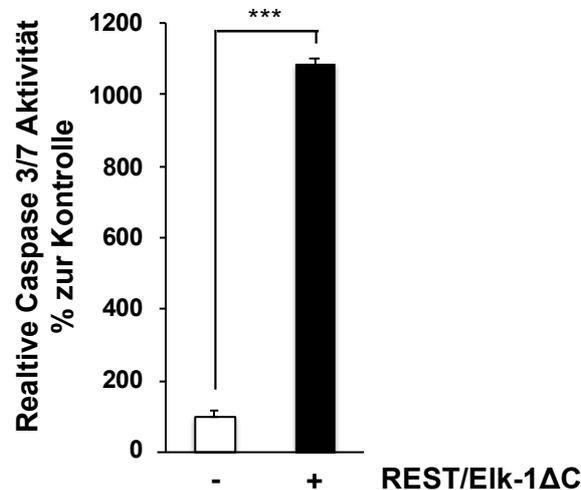


Abbildung 54: In INS-1 832/13-Zellen führte die Expression von REST/EIk-1 Δ C zu einer erhöhten Caspase 3/7-Aktivität.

INS-1 832/13-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, die für REST/EIk-1 Δ C kodierten. Nach 24 h wurden die Zellen Serum-reduziert und nach weiteren 24 h geerntet. Die Caspase 3/7-Aktivität wurde mittels des Caspase-Glo[®] 3/7 Assay Systems von Promega bestimmt. Die Aktivität wurde als relative Caspase 3/7-Aktivität, prozentual zur Kontrolle dargestellt und mittels Student's t-test auf Signifikanz überprüft (***) = $P < 0,001$). Der Versuch wurde zu jeder Bedingung als vierfach-Ansatz durchgeführt und dreimal wiederholt ($n=3$).

Abbildung 54 zeigt, dass es zu einer starken und signifikanten Erhöhung der Caspase-3-Aktivität in den REST/EIk-1 Δ C-exprimierenden Zellen kam.

4.2.6. Die Expression von REST/EIk-1 Δ C induziert Apoptose im Pankreas transgener RIP-rtTA[tetO]₇-REST/EIk-1 Δ C-Mäuse

Als nächstes wurden Experimente durchgeführt, um die Beobachtung *in vivo* zu bestätigen. Dazu wurden Gewebsschnitte von doppelt transgenen RIP-rtTA[tetO]₇-REST/EIk-1 Δ C-Mäusen angefertigt. Die Pankreata wurden hierzu operativ entfernt und die Gewebsstruktur mittels HE-Färbung sichtbar gemacht. Zusätzlich wurden die Schnitte mit einem Antikörper inkubiert, der gegen die aktive Caspase-3 gerichtet war (s.h. Abbildung 55).

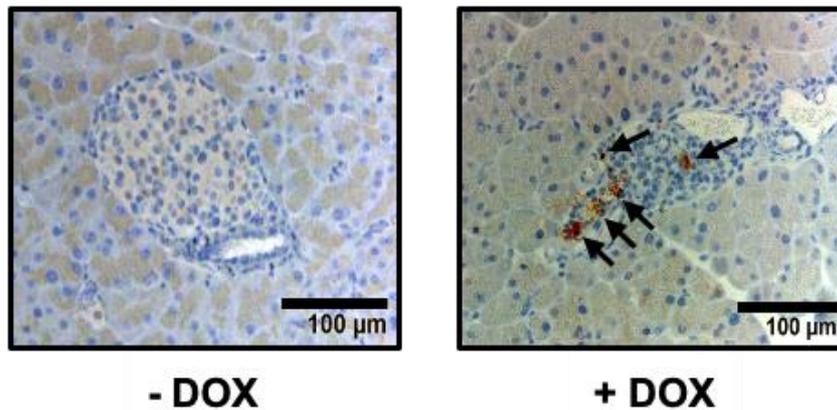


Abbildung 55: Die Expression von REST/Elk-1ΔC in pankreatischen β -Zellen von transgenen Mäusen führt zu erhöhter Caspase-3-Aktivität.

Beispiel der Sagittal-Pankreas-Gewebsschnitte eines mit Doxycyclin (+ DOX) behandelten Tieres und eines Kontrolltieres (- DOX). Den Versuchstieren wurde das exokrine Pankreas operativ entfernt und in Paraffin eingebettet. Mittels eines Mikrotoms wurden 5 μ M dicke Schnitte angefertigt, von denen nur jeder sechste Schnitt (5 μ M) von Kopf-, Mittel- und Schwanzstück verwendet wurde. Nach der Gewebsfärbung mittels Hämatoxylin/Eosin wurden die Schnitte mit Antikörpern, die gegen die aktive Form der Caspase-3 gerichtet waren, inkubiert. Bereiche in denen die aktive Caspase-3 nachweisbar war, sind als braune Punkte in der Abbildung zu sehen und beispielhaft mit Pfeilen kenntlich gemacht. Ein Größenmarker ist angegeben (100 μ m). Zu jeder Bedingung wurden drei Tiere herangezogen (n=3), die gleichen Ergebnisse lieferten.

In keinem der Kontrolltiere (- DOX) war die aktive Caspase-3 nachweisbar. Hingegen war in allen Inseln, der mit Doxycyclin behandelten Tiere eine Caspase-3-Aktivität nachweisbar.

5. Diskussion

5.1. Signaltransduktion des TRPV1-Kanals

5.1.1. Die Rolle von TRPV1 im Organismus als schmerz-detektierender Rezeptor

Innerhalb der Regulation zellulärer Regelkreisläufe und der Wahrnehmung von Stimuli aller Art, kommt den „Transient Receptor Potential“ (TRP)-Kanälen eine wichtige Rolle zu. Von zentraler Bedeutung ist dabei der TRPV1-Kanal, verdeutlicht dadurch, dass zu TRPV1 bis zum heutigen Tag 8197 Einträge auf der Internetseite der „National Library of Medicine“ gelistet sind. 2021 wurde David Julius zusammen mit Ardem Patapoutian der Nobelpreis für Medizin verliehen. Das Nobelkomitee erkannte an, dass die Erforschung des TRPV1-Kanals durch Julius, über die Verwendung von „Capsaicin, dem scharfen Stoff aus Chilis, welcher eine brennende Schmerz-Wahrnehmung induziert, um einen Sensor in den Nervenenden der Haut zu identifizieren, der auf Hitze reagiert...“ zur „...Identifizierung kritischer, bisher unbekannter Verbindungselemente in unserem Verständnis der komplexen Wechselwirkung zwischen unseren Sinnen und der Umwelt“ führte (<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2021/press-release/>). Seit seiner Entdeckung von Caterina et al. (1997) offenbarte sich immer mehr die zentrale Rolle von TRPV1 in der Schmerzwahrnehmung. So ist TRPV1 nicht nur der Sensor für Capsaicin, welches Chilischoten seine Schärfe verleiht, sondern nimmt zusammen mit TRPM3- und TRPA1-Kanälen eine entscheidende Rolle bei der Detektion und Weiterleitung schmerzhafter thermischer Reize im peripheren Nervensystem ein (Vandewauw et al., 2018; Vriens und Voets, 2019). Hier wird TRPV1 vor allem in den Spinalganglien, einer Nervenverdickung aus mehreren Perikaryen, die sich aus C-Fasern (ohne Myelinscheide) und A δ -Fasern (dünne Myelinscheide) zusammensetzen, exprimiert (Brown, 2016). Diese Nervenfasern dienen der Nozizeption in der Peripherie, also der Wahrnehmung schmerzhafter Reize. Nach der Detektion der schmerzhaften Reize wird die Erregung zum Rückenmark geleitet und im Gehirn letztendlich als Schmerz interpretiert (siehe Abbildung 56). Zu diesen schmerzhaften Reizen zählen unter anderem ein saurer pH-Wert (<6,5) und erhöhte Temperaturen ≥ 42 °C (Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998; Brown, 2016).

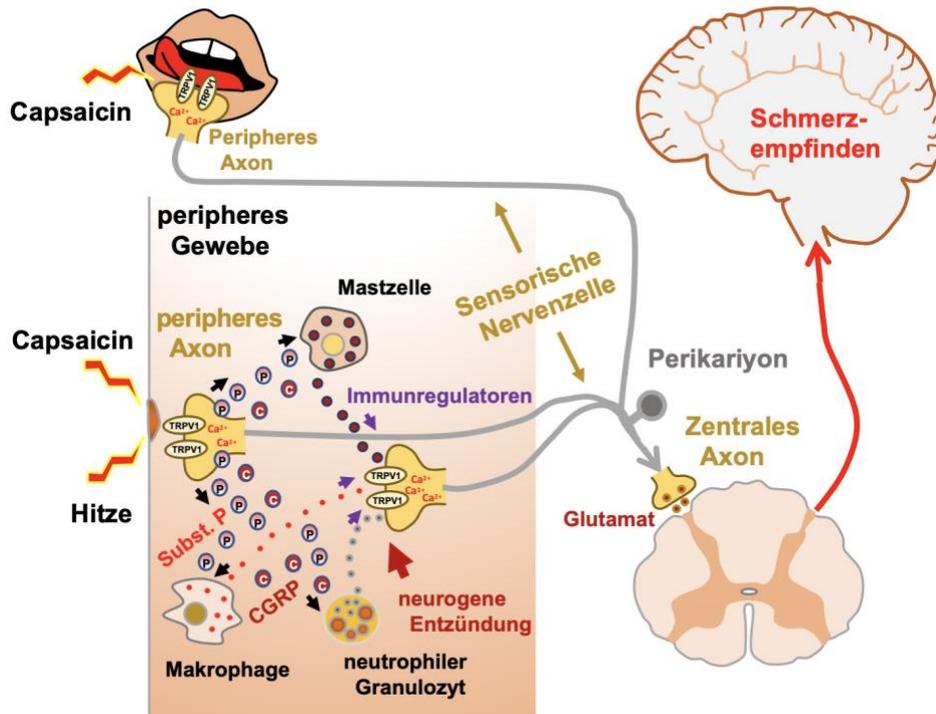


Abbildung 56: TRPV1 als Nozizeptor und Initiator neurogener Entzündungen.

Der TRPV1-Kanal wird hauptsächlich in den Spinalganglien des peripheren Nervensystems exprimiert. Ein Spinalganglion setzt sich dabei aus mehreren Perikaryen zusammen. Hier nimmt er als Nozizeptor schmerzhafte Reize aus der Peripherie auf, wie beispielsweise das schärfe- und hitze-induzierende Capsaicin. Diese schmerzhaften Reize können dann als Erregung über das Rückenmark, nach Ausschüttung von Glutamat, in das Zentral-Nervensystem weitergeleitet und dort als Schmerz interpretiert werden. Neben der Wahrnehmung solcher Schmerzreize kann eine Aktivierung von TRPV1 in den peripheren Axonen zu einer Induktion von neurogenen Entzündungen beitragen. Hier spielt die Ausschüttung von Substanz P und „Calcitonin Gene Related Peptide“ (CGRP) eine entscheidende Rolle. Deren Freisetzung bewirkt die Aktivierung von Immunzellen, wie Makrophagen, Mastzellen und neutrophilen Granulozyten. In der Folge kann es zu einer Entzündungsreaktion kommen. Abbildung entnommen aus Thiel, et al. (2020).

Neben der Wahrnehmung von Schmerzreizen kann die Aktivierung von TRPV1 in den peripheren Axonen zur Freisetzung von prominenten Entzündungsmediatoren, wie Substanz P und des „Calcitonin Gene Related Peptide“ (CGRP) führen. Diese Entzündungsmediatoren sind in der Folge in der Lage Immunzellen wie Mastzellen, Makrophagen und neutrophile Granulozyten zu aktivieren. Deren Aktivierung kann dann zur Ausbildung einer neurogenen Entzündung führen (Boillat, et al., 2014; Gouin et al., 2017; Thiel, et al., 2020). Schmerzhaft thermische Reize können nicht nur von extern, wie beispielsweise durch das Berühren eines heißen Gegenstandes, auf den TRPV1-Kanal einwirken, sondern auch über erhöhte Körpertemperatur in entzündeten Geweben. Bei einer solchen thermischen Hyperalgesie sinkt der Schwellenwert für die Aktivierbarkeit des TRPV1-Kanals über Temperatur (Davis et al., 2000; Walder et al., 2012). Über Phosphorylierungsreaktionen der Proteinkinase A (PKA) und der Proteinkinase C (PKC), kann der TRPV1-Kanal dabei sensibler werden. Diese Beobachtung wird mit dem Entstehen und dem Andauern einer Neuralgie (Nervenschmerz) in Verbindung gebracht (Julius, 2013; Malek et al., 2015).

Durch die zentrale Beteiligung von TRPV1 in der Schmerzwahrnehmung ist er seit Jahren Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Diese zielen darauf ab, geeignete Pharmaka zu entwickeln, welche es ermöglichen den TRPV1-Kanal so zu modulieren, dass er seine schmerzassoziierte Wirkung verliert (Szallasi et al., 2007; Gavva et al., 2008; Vay et al., 2012). Pharmakologische Blockade des TRPV1-Kanals oder die Inaktivierung des TRPV1-kodierenden Gens in transgenen Mäusen führte zur Ausbildung einer Hyperthermie, was wiederum zeigte, dass der TRPV1-Kanal auch an der Thermoregulation des Körpers beteiligt ist (Swanson et al., 2005; Steiner et al., 2007). Diese Ergebnisse korrelieren mit den Beobachtungen, die jeder beim Verzehr von scharfen Chilischoten machen kann, wonach es zu einem gesteigerten Hitzegefühl kommen kann. Bei der Entwicklung von Pharmaka, zur gezielten Inhibition von TRPV1, gibt es somit viele Faktoren zu beachten. Dabei ist der Effekt auf die Thermoregulation abhängig von Spezies, Geschlecht und Konzentration (Garami et al., 2020). Hieraus ergibt sich die hohe Bedeutung des TRPV1-Kanals für den menschlichen Organismus und rechtfertigt seine intensive Untersuchung.

5.1.2. N-Arachidonoyldopamin (NADA) und Resiniferatoxin (RTX) aktivierten AP-1 via TRPV1

Der bekannteste exogene Aktivator des TRPV1-Kanals ist Capsaicin. Es gibt aber eine große Zahl weiterer beschriebener TRPV1-Agonisten. Diese Aktivierungseigenschaften wurden von vielen Forschern auf der Basis ihrer Fähigkeit zur Induktion eines Ca^{2+} -Einstroms in die Zelle, postuliert (Caterina et al., 1997, 2000; Huang et al., 2002; Backes et al., 2018). Der Nachweis eines Anstieges der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration alleine ist aber nicht ausreichend zum Nachweis einer aktivierten Signalkaskade (Gallo et al., 2006; Thiel et al., 2021). Nachgewiesener Maßen führt beispielsweise die Stimulation des TRPM3-Kanals mit Nifedipin zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, nicht aber zu einer induzierten Signalkaskade (Lesch et al., 2014). Daher ist es sinnvoller, ein System wie es beim Nachweis der Aktivität der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren verwendet wird, anzuwenden. Hier wird beispielsweise die Biosynthese von „second messengern“ und die Phosphorylierung von ERK1/2 herangezogen (Thiel, 2015). Ein weiterer bekannter Aktivator des TRPV1-Kanals ist Resiniferatoxin (RTX), ein Pflanzenstoff des Wolfsmilchgewächses *Euphorbia resinifera*. Es aktiviert den TRPV1-Kanal um ein Vielfaches stärker als Capsaicin (Szallasi und Blumberg, 1989). Es wurde gezeigt, dass RTX in Mäusen die gleichen Symptome (Schmerz und Hypothermie) wie Capsaicin, bewirken konnte (Szallasi und Blumberg, 1989; Abdelhamid et al., 2013). Zudem führte die Inkubation von TRPV1-exprimierenden Zellen mit RTX zu einem Absterben dieser Zellen, wie es auch für höhere Capsaicin-Konzentrationen beschrieben

wurde (Olah et al., 2001). Die Beobachtung, wonach RTX in sehr geringen Dosen zum Zelltod der ausschließlich TRPV1-exprimierenden Neuronen führt, brachte die Idee auf, RTX als „neuronales Skalpell“ zu verwenden, da bei einigen schwerwiegenden Erkrankungen, wie beispielsweise krebs-induziertem Schmerz oder chronischer Arthritis, die Beteiligung des TRPV1-Kanals gezeigt wurde (Ghilardi et al., 2005; Hsieh et al., 2017). Ein gezieltes Ausschalten der hierbei beteiligten peripheren Neuronen könnte zu einer wirksamen Schmerztherapie beitragen. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, fanden mit RTX bereits Phase I-Studien statt (Brown, 2016). RTX weist eine deutlich höhere Wirksamkeit als Capsaicin auf und kann somit in viel geringeren Dosen eingesetzt werden (Szallasi und Blumberg, 1989; Singla et al., 2020). Da RTX genauso wie Capsaicin den TRPV1-Kanal aktivieren kann, lag der Gedanke nahe, dass auch RTX einen Einfluss auf die AP-1-Aktivität nach Stimulation des TRPV1-Kanals haben konnte. Diese Hypothese bestätigte sich für RTX bereits in einer Konzentration von 5 nM. Um zu überprüfen, ob die Aktivierung von AP-1 durch RTX tatsächlich durch die Aktivierung des TRPV1-Kanals vermittelt wurde, testete ich, ob RTX in HEK293-Zellen eine erhöhte AP-1-Aktivität induzieren konnte. Diese Zelllinie exprimiert den TRPV1-Kanal nachweislich nicht und eine Aktivierung von AP-1 nach der Stimulation mit RTX blieb aus. Durch RNA-Interferenz konnte ich den Zusammenhang zwischen dem RTX-stimulierten TRPV1-Kanal und der Aktivierung des AP-1 Transkriptionsfaktors aufzeigen. Resiniferatoxin war somit in der Lage, ebenso wie Capsaicin, Einfluss auf die Aktivität von AP-1, über die Aktivierung von TRPV1, zu nehmen. Die eingesetzte Konzentration von RTX, um eine vergleichbare AP-1-Aktivität zu bewirken, war jedoch um ein Vielfaches geringer.

Ein endogener Agonist des TRPV1-Kanals ist das Endovanilloid N-Arachidonoyldopamin (NADA). Ursprünglich wurde NADA als Agonist des „Cannabinoid Rezeptors 1“ (CB1) beschrieben (Bisogno et al., 2000). Gerade aufgrund der Tatsache, dass NADA hauptsächlich im zentralen Nervensystem exprimiert wird und nur in geringer Menge in den Spinalganglien des peripheren Nervensystems vorkommt (Huang et al., 2002), stellte sich die Frage nach der physiologischen Bedeutung von NADA als Aktivator des TRPV1-Kanals. Diese Ambivalenz der Daten für NADA und TRPV1 zeigt, dass weitere Untersuchungen zu diesem Themenkomplex notwendig sind.

Meine Hypothese, wonach NADA wie Capsaicin und RTX aktivierend auf den Transkriptionsfaktor AP-1 wirkt, konnte ich in H2C1-Zellen experimentell bestätigen. Bemerkenswerterweise kam es in HEK293/T17-Zellen, die mit NADA stimuliert wurden, zur Aktivierung von AP-1. Nachweislich exprimierten diese Zellen aber keinen TRPV1-Kanal. In der Summe führten diese Ergebnisse zu dem Schluss, dass NADA die AP-1-Aktivität sowohl TRPV1-abhängig als auch TRPV1-unabhängig regulieren konnte. Die TRPV1-unabhängige Aktivierung muss über einen noch zu identifizierenden Rezeptor reguliert werden. Die stärkere

Aktivierung von AP-1 in den H2C1-Zellen lässt sich möglicherweise auf einen synergistischen Effekt der Aktivierung von TRPV1 und des noch unbekanntem Rezeptors zurückführen.

In weiterführenden Experimenten konnte ich G_{α_q} -gekoppelte Rezeptoren als Regulatoren der TRPV1-unabhängigen AP-1-Aktivierung durch NADA ausschließen. Zukünftige Experimente sollten den hierfür verantwortlichen Rezeptor adressieren.

5.1.3. Der Einfluss von Capsaicin, RTX oder NADA auf den Einstrom von Calcium-Ionen über den TRPV1-Kanal

Der TRPV1-Kanal ist ein nicht-selektiver Kationen-Kanal (Caterina et al., 1997). Im Extrazellularraum der Zellen ist die Calcium-Ionen-Konzentration um ein Vielfaches höher als im Intrazellularraum, weswegen ein Öffnen von Kanalporen unter anderem zu einem starken intrazellulären Anstieg von Calcium führt. Die Ca^{2+} -Ionen wirken als „second messenger“ bei der Aktivierung von Signalmolekülen wie der Proteinkinase C (PKC) (Black und Black, 2013; Thiel et al., 2018). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ein Einstrom von Ca^{2+} -Ionen durch den TRPV1-Kanal notwendig ist, um eine intrazelluläre Signalkaskade zu induzieren. Die Inkubation von H2C1-Zellen mit Calcium-freiem-Medium verhinderte fast vollständig die Aktivierung von AP-1 in den mit Capsaicin, RTX oder NADA stimulierten H2C1-Zellen. Aus diesen Daten kann man schlussfolgern, dass der Einstrom von extrazellulärem Calcium in das Zytoplasma, nach der Stimulation des TRPV1-Kanals, entscheidend war für die Aktivierung von AP-1.

In Zusammenarbeit mit Dr. Xin Hui konnte ich zeigen, dass die Stimulation von H2C1-Zellen mit Capsaicin, RTX oder NADA zu einem signifikanten Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels führte. In Capsaicin- und RTX-stimulierten HEK293-Kontrollzellen kam es zu keinem Anstieg der zytoplasmatischen Calcium-Ionen-Konzentration. NADA bewirkte jedoch einen Ca^{2+} -Anstieg in den Kontrollzellen. Dies unterstützt die These, dass NADA zu einer TRPV1-abhängigen und TRPV1-unabhängigen AP-1-Aktivierung führen kann. Eine Stimulation der H2C1-Zellen mit NADA führte mit Abstand zum stärksten Einstrom von Ca^{2+} in das Zytoplasma. RTX als stärkster beschriebener TRPV1-Aktivator erzielte den geringsten messbaren Calcium-Ionen-Einstrom aus dem Extrazellularraum in die Zelle. Diese Beobachtung ließ sich zunächst nicht mit der hohen Potenz von RTX auf den TRPV1-Kanal in Einklang bringen. Bindungs- und Vergleichsstudien von Capsaicin und RTX haben aber gezeigt, dass RTX schneller und fester in der Bindefurche des TRPV1-Kanals bindet, dafür aber einen langsameren Einfluss auf den entstehenden Ladungsstrom hat (Elokely et al., 2016). Des Weiteren bindet RTX zwar an ähnliche Aminosäuren wie Capsaicin, dafür aber an bestimmte umso fester (Ohbuchi et al., 2016). Womöglich hat dieses festere Binden zur Folge,

dass RTX länger in der Bindefurche verbleibt und TRPV1 somit länger in einem geöffneten Zustand halten kann. Der durch Capsaicin induzierte Effekt lag zwischen dem von NADA und RTX. Möglicherweise hing der starke Ca^{2+} -Einstrom, nach Stimulation mit NADA, damit zusammen, dass andere potenzielle Kationenkanäle induziert wurden und somit zusätzlich Calcium in das Innere der Zelle einströmen konnte. Diese Theorie passte zu meinen Beobachtungen, wonach NADA einen TRPV1-abhängigen, als auch einen TRPV1-unabhängigen Effekt auf die Induktion des AP-1 Transkriptionsfaktors hatte.

5.1.4. Der TRPV1-Kanal und die Regulation der Apoptose

Sowohl der Transkriptionsfaktor AP-1 (Colotta et al., 1992; Karin et al., 1997; Shaulian und Karin, 2001) als auch die Aktivierung von TRPV1 in Neuronen (Caterina et al., 1997; Shirakawa et al., 2008) kann zur Induktion von Apoptose führen. Die durchgeführten Experimente zeigten, dass die Stimulation des TRPV1-Kanals keine Apoptose induzierte oder die Viabilität der H2C1-Zellen beeinflusste. Auch oxidativer Stress (ROS) konnte als AP-1 induzierender Stimulus ausgeschlossen werden.

5.1.5. Die „Mitogen Activated Protein Kinase“ ERK und ihre Rolle in der TRPV1 induzierten Transkriptionsänderung

Bei der Regulation intrazellulärer Signalkaskaden spielen „Mitogen Activated Protein Kinases“ (MAPKs) eine wichtige Rolle. Die Kinasen „Extracellular-signal Regulated Kinases“ (ERK), „c-Jun N-terminal Kinases“ (JNK) und p38 gehören zu den wichtigsten Vertretern. Ihre Aktivität hat beispielsweise Einfluss auf die Regulation von AP-1 (Gangnuss et al., 2004; Rubil et al., 2016; Lesch et al., 2017). Die aktivierten MAPKs können in den Zellkern translozieren und dort Transkriptionsfaktoren anschalten, die darauf eine entsprechende zelluläre Antwort auf transkriptioneller Ebene initiieren.

In meiner Masterarbeit untersuchte ich bereits die Bedeutung von ERK1/2, JNK und p38 für die TRPV1 vermittelte AP-1-Aktivierung. Experimente zur Expression der „MAP Kinase Phosphatase-1 (MKP-1), einer Phosphatase, die die Kinasen ERK1/2, JNK und p38 dephosphoryliert und damit inaktiviert (Sun et al., 1993; Liu et al., 1995; Franklin und Kraft, 1997) zeigten, dass eine Überexpression der MKP-1 die TRPV1 induzierte Signalkaskade hemmte. Folglich musste eine oder mehrere der drei MAP-Kinasen die Stimulation des TRPV1-Kanals mit der AP-1-Aktivierung verbinden. Zur näheren Untersuchung dieser Hypothese führte ich ein Experiment durch, indem ich zeitabhängig die Phosphorylierung von

ERK1/2, in Capsaicin-stimulierten H2C1-Zellen untersuchte. Die Stimulation von TRPV1 mit Capsaicin hatte zur Folge, dass vermehrt ERK1/2 phosphoryliert und aktiviert wurde. Über einen pharmakologischen Ansatz wurden diese Resultate bestätigt. H2C1-Zellen wurden mit PD98059 inkubiert, einem spezifischen Inhibitor des ERK1/2-Signalweges (Alessi et al., 1995). In der Folge kam es zu einer verringerten AP-1-Aktivierung in Capsaicin-stimulierten H2C1-Zellen. Somit war es unerlässlich, dass ERK phosphoryliert wurde, um aktiv im Zellkern eine Aktivierung von AP-1 zu induzieren.

5.1.6. Der TRPV1-Kanal und seine regulatorische Wirkung auf die Transkriptionsmaschinerie

Wenig ist bis heute über die Rolle des TRPV1-Kanals bei der Regulation der Transkriptionsmaschinerie und seiner assoziierten Signalkaskaden bekannt.

In meiner Masterarbeit konnte ich zeigen, dass die Stimulation des TRPV1-Kanals mit Capsaicin in TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen (H2C1-Zellen) zu einem starken Anstieg der Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 führt (Backes, 2014). In der vorliegenden Arbeit zeigte ich, dass die Induktion der AP-1-Aktivität, nach Stimulation des TRPV1-Kanals mit Capsaicin, zeitabhängig anstieg. Durch die Verwendung des spezifischen TRPV1-Inhibitors AMG9810 konnte ich den Zusammenhang zwischen einer gesteigerten AP-1-Aktivität und der Stimulation des TRPV1-Kanals belegen. Die Verwendung dieses Inhibitors zeigte nach der Stimulation mit Capsaicin eine signifikante und fast vollständige Reduktion der AP-1-Aktivität. Die Aktivität des TRPV1-Kanals war somit unerlässlich für die gesteigerte transkriptionelle Aktivität, induziert durch Capsaicin. Bestätigt wurden diese Resultate durch die Expression einer spezifischen „small hairpin“ RNA (shRNA), die gegen TRPV1 gerichtet war. Auch diese konnte die Aktivierung des AP-1-Komplexes in Capsaicin stimulierten H2C1-Zellen signifikant reduzieren.

5.1.7. Die Bedeutung der Transkriptionsfaktoren c-Jun und c-Fos für den stimulierten TRPV1-Kanal

Der Transkriptionsfaktor AP-1 bildet sich aus den „basic leucine zipper“ (bZIP)-Proteinen der c-Jun-, c-Fos- und der ATF-Familien (Alonso et al., 2018). AP-1 kann aber auch durch die Interaktion von c-Jun mit Proteinen der ATF-Familie gebildet werden, wobei die Zusammensetzung beispielsweise abhängig von Zelltyp und Stimulus ist (Lee et al., 2012; Gazon et al., 2018). Das c-Jun/c-Fos-Dimer ist in der Lage das „12-O-tetradecanoylphorbol-

13-acetate (TPA)-responsive element“ (TRE) in Zielgenen zu erkennen (Alonso et al., 2018). Für die Untersuchung der Zusammensetzung des TRPV1-Kanals nach der Stimulation mit Capsaicin ging ich von der Hypothese aus, dass er sich aus den Proteinen c-Jun und c-Fos zusammensetzt. In meiner Masterarbeit konnte ich bereits zeigen, dass der Transkriptionsfaktor c-Jun an der Bildung des AP-1-Komplexes in H2C1-Zellen beteiligt sein könnte (Backes, 2014). Die Betrachtung der Expression von c-Jun auf der Proteinebene, in der vorliegenden Arbeit, zeigte dass die Konzentration von c-Jun im Nukleus der Zellen zeitabhängig zunahm, wenn sie mit Capsaicin stimuliert wurden. Das gleiche Resultat zeigte sich für die Konzentration von c-Fos im Nukleus der mit Capsaicin stimulierten H2C1-Zellen. Der durch Capsaicin induzierte AP-1-Komplex war somit ein Heterodimer aus c-Jun und c-Fos.

Der Transkriptionsfaktor c-Jun wird direkt durch ERK1/2 aktiviert (Westwick et al., 1994; Whitmarsh et al., 1995; Thiel und Rössler, 2014). Die Regulation von c-Fos durch ERK1/2 erfolgt hingegen indirekt über die Aktivität der Transkriptionsfaktoren der „ternary complex factors“ (TCFs)-Familie wie Elk-1 (Gille et al., 1995; Whitmarsh und Davis, 1996; Thiel et al., 2021). In meiner Masterarbeit konnte ich zeigen, dass die Inhibition von Elk-1 zu einer verringerten AP-1-Aktivität nach der Stimulation des TRPV1-Kanals führt. In Kombination mit der regulatorischen Bedeutung des aktiven ERK1/2 in Capsaicin stimulierten H2C1-Zellen ist Elk-1 an der TRPV1-vermittelten AP-1 Aktivierung beteiligt. Die Regulation von Elk-1 erfolgt hierbei vermutlich über ERK1/2. Der direkte Zusammenhang muss aber in zukünftigen Experimenten gezeigt werden. Abbildung 57 fasst die Daten zur TRPV1-induzierten Signalkaskade zusammen.

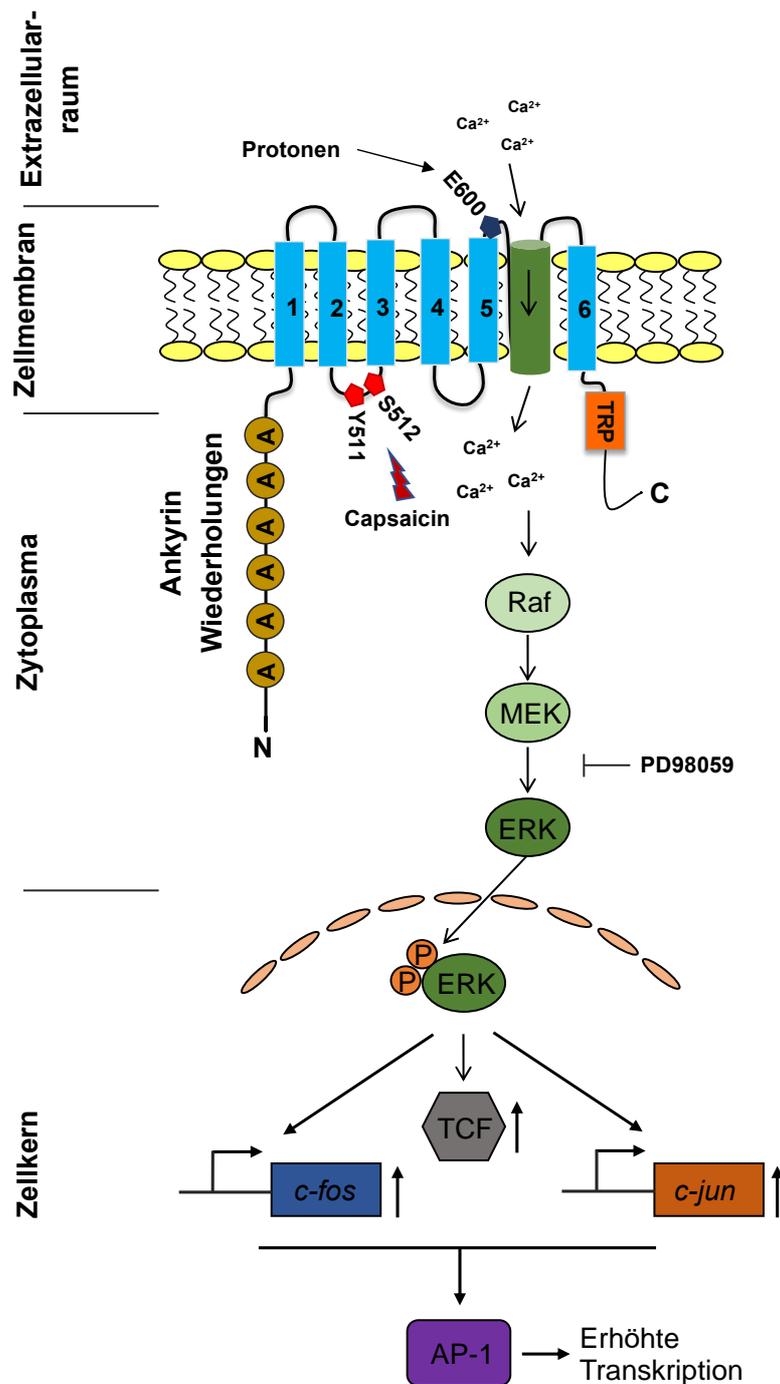


Abbildung 57: Die TRPV1 induzierte Signalkaskade zur Aktivierung von AP-1.

Die Aktivierung von TRPV1 mit Capsaicin erfolgt an der zytosolischen Seite des Rezeptors. Hauptsächlich an den Aminosäuren Y511 und S512. Nachdem Calcium in die Zelle eingeströmt ist, kommt es zur Induktion des ERK-Signalweges über die Phosphorylierung von Raf und MEK (das Calcium aktiviert wahrscheinlich die PKC, welche dann wiederum Raf aktiviert). Letzteres aktiviert ERK, wodurch dieses im phosphorylierten Zustand in den Zellkern translozieren kann. Hier aktiviert es ternäre Komplex Faktoren (TCF's) wie Elk-1, sowie erhöhte Expression von *c-fos* und *c-jun*. Die Proteine können dann als AP-1 Transkriptionsfaktor Einfluss auf die Transkription nehmen.

Dabei führt die Stimulation von TRPV1 über Capsaicin, RTX oder NADA zu einem Einstrom von Calcium in das Zytoplasma der Zelle. In der Folge kommt es zur Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK1/2. Das phosphorylierte ERK1/2 transloziert daraufhin in den Zellkern und

aktiviert Elk-1. Letzteres führt dann zur Expression von *c-fos*. Die Expression von *c-jun* kann direkt über ERK1/2 stimuliert werden. Der AP-1-Komplex setzt sich somit aus c-Jun und c-Fos zusammen.

5.1.8. Die Pharmakologie des TRPV1-Kanals

Neben dem „klassischen“ TRPV1 Agonisten Capsaicin gibt es zahlreiche Verbindungen, die als TRPV1-Agonisten oder Antagonisten beschrieben wurden. Abhängig von Zelltyp und eingesetzter Konzentration der jeweiligen Verbindungen gibt es viele Beobachtungen über Wirkung und Spezifität, welche sich teilweise auch widersprechen. So wurde 2-APB als TRPV1-Aktivator beschrieben (Hu et al., 2004), wirkt jedoch auf den TRPC5-Kanal inhibitorisch (Xu et al., 2005). Auch auf den TRPV6-Kanal wirkt 2-APB inhibitorisch, indem es sich in die Struktur zwischen der ersten und vierten Transmembrandomäne einlagert, welcher der von TRPV1 sehr ähnlich ist (Singh et al., 2018). Meine Ergebnisse zeigen, dass 2-APB in der Lage ist TRPV1 zu aktivieren. Wurden H2C1-Zellen aber mit 2-APB vorinkubiert und danach mit Capsaicin simuliert, kam es überraschenderweise zu einer Inhibition der AP-1 Aktivierung. Somit kann geschlussfolgert werden, dass 2-APB sowohl stimulierend als auch inhibierend, auf die TRPV1 vermittelte AP-1-Aktivierung wirken kann.

Das Antimykotikum Clotrimazol findet seine Anwendung in Salben zur Behandlung von Hautpilzkrankungen. Neben der antimykotischen Wirkung auf Pilze, wirkt Clotrimazol nachweislich aktivierend auf den TRPV1-Kanal, jedoch inhibitorisch auf den TRPM1-Kanal (Meseguer et al., 2008). Die durchgeführten Experimente zeigten keinen inhibitorischen Effekt von Clotrimazol auf den TRPV1-Kanal. Aufgrund dessen ist Clotrimazol nicht als TRPV1-Inhibitor anzusehen.

Die Verbindung BCTC wurde ursprünglich als spezifischer TRPV1-Inhibitor beschrieben (Valenzano et al., 2003). BCTC hemmt jedoch auch andere Kanalproteine wie beispielsweise TRPM8 (Thiel et al. 2019). Die hier gemachten Experimente bestätigen zwar die inhibitorische Eigenschaft von BCTC in Bezug auf TRPV1, jedoch ist BCTC nicht als spezifischer TRPV1-Inhibitor anzusehen.

Da für den TRPV1-Kanal neben NADA nur wenige endogene Regulatoren beschrieben wurden, ist es für die weitere Entschlüsselung seiner physiologischen Relevanz wichtig, zusätzliche endogene Regulatoren zu identifizieren. Wichtige Regulatoren physiologischer Prozesse im Körper sind beispielsweise Steroidhormone. Für das Steroidhormon Progesteron wurde beschrieben, dass es inhibitorisch auf den TRPC5-Kanal wirkt (Majeed et al., 2011). Die in dieser Arbeit gezeigten Experimente bestätigen, dass Progesteron auch den TRPV1-

Kanal hemmt. Pregnenolon führt ebenfalls zu einer Hemmung von TRPV1, wenn auch weniger stark.

5.2. Der TRPV1-Kanal und seine Assoziation mit der Insulinsekretion

Neben seiner Bedeutung in der Schmerzwahrnehmung und Ausbildung chronisch assoziierter Entzündungskrankheiten wurde in den letzten Jahren gezeigt, dass TRPV1 eine wichtige Rolle in der Regulation des Glukosespiegels spielt (Riera et al., 2014). Die Erforschung diabetischer Erkrankungen, im besonderen Diabetes-Typ 2 (DT2) kommt in unserer Gesellschaft eine essenzielle Bedeutung zu. Die „Deutsche Diabetes Gesellschaft“ definiert Typ-2-Diabetes wie folgt: „Der Typ-2-Diabetes ist eine chronische, sehr heterogene, multifaktorielle, progrediente Erkrankung, die u. a. durch vererbte und erworbene Insulinresistenz und durch qualitative und quantitative Insulinsekretionsstörungen charakterisiert ist“. Laut Bericht der „WHO“ gibt es zum jetzigen Zeitpunkt weltweit 422 Millionen Patienten, die an Diabetes erkrankt sind. Der Hauptteil dieser Erkrankung geht auf Diabetes-Typ-2 zurück und erstreckt sich durch alle gesellschaftlichen Schichten. Jedes Jahr kommt es durch Diabetes zu 1,6 Millionen Toten (Quelle: WHO). Eine erschreckend hohe Zahl an Erkrankten und Sterbefällen, die eine weitere Erforschung der Ursachen, aber auch der genetischen Regulation der Insulinregulation durch bisher unbekannte zelluläre Mechanismen dringend erforderlich macht.

Von Riera et al. (2014) wurde gezeigt, dass die Expression von TRPV1 in Spinalganglien von Mäusen einen negativen Effekt auf die Freisetzung von Insulin haben kann. Hier führte die Aktivierung des TRPV1-Kanals zu einer Signalkaskade, an deren Ende die Aktivierung des Leucin-Zipper Proteins „cAMP response element binding Protein“ (CREB) steht. CREB seinerseits führt zu einer erhöhten Produktion des Neuropeptids und Entzündungsmediators „Calcitonin gene-related peptide“ (CGRP). Für CGRP wurde in der Vergangenheit gezeigt, dass es einen negativen Effekt auf die Expression von Insulin haben kann (Pettersson et al., 1986; Tanaka et al., 2013). So berichteten in Korrelation zu diesen Ergebnissen Riera et al. (2014), dass es zu einer gesteigerten Glucose-Intoleranz sowie schnellerem Altern kommt, wenn der TRPV1-Kanal aktiv war. Der TRPV-1-Kanal hat somit nachweisbar einen Einfluss auf die Insulin-Sekretion über die Steuerung transkriptioneller Prozesse.

5.2.1. Die Rolle von AP-1 in der Glukosehomöostase und der Regulation der Pankreas-Entwicklung

Von Müller et al. (2010) wurde gezeigt, dass die Stimulation von Insulinomazellen (INS-1) mit Glukose zu einer Aktivierung des AP-1 Transkriptionsfaktors führt. Dabei erfolgte die Aktivierung von AP-1 über c-Jun und TCFs, die die c-Fos Expression regulieren. In früheren Untersuchungen von Susini et al. (1998) zeigte sich, dass die Stimulation von INS-1-Zellen mit Glukose die Expression von c-Jun und c-Fos induziert. Unbekannt war bisher die Rolle des AP-1-Komplexes in pankreatischen β -Zellen bzw. in Insulinomazellen. Zu einer Aktivierung von AP-1 kam es in den Insulinomazell-Experimenten in denen der spannungsgesteuerte $Ca_v1.2$ -Kanal stimuliert wurde. Weitere Experimente in Insulinomazellen zeigten, dass die Expression von A-Fos, welches mit c-jun, JunB, JunD und ATF2 einen Komplex bilden kann, die Bildung eines funktionalen AP-1-Komplexes verhindert. Diese Mutante verhindert somit die über $Ca_v1.2$ vermittelte Aktivierung von AP-1.

Der AP-1-Komplex kann unterschiedlich aufgebaut sein. Die Verwendung eines Reportergens, welches den Promotorbereich von c-Jun enthielt, zeigte nach der Stimulation mit KCl und FPL64176 eine erhöhte Aktivität. Experimente mit der dominant negativen Mutante c-Jun Δ N, welches die Aktivität von c-Jun unterdrückt zeigen, dass c-Jun Teil des AP-1-Komplexes ist. Experimente von Daniel Langfermann aus unserem Labor zeigten, dass ATF2 ebenfalls als Dimerisierungspartner von c-Jun in Insulinomazellen fungiert.

Müller et al. (2010) postulierten, dass die Regulation der AP-1-Aktivität in Glukose-stimulierten Insulinomazellen über die Aktivierung der Proteinkinase JNK erfolgt. Die hier durchgeführten pharmakologischen und genetischen Experimente bestätigten diese Hypothese.

Um die Funktion von AP-1 in den β -Zellen des Pankreas aufzuklären wurde ein doppelt-transgenes Mausmodell generiert, welches es erlaubte, die Mutante A-Fos induzierbar in den β -Zellen des Pankreas zu exprimieren. Es ist die Kernaufgabe dieser β -Zellen, die Glukosehomöostase des Organismus über die Regulation der Insulinsekretion, zu steuern. Die Expression von A-Fos in pankreatischen β -Zellen führte zu einer erheblichen Zunahme der Glukosekonzentration im Blut der transgenen Mäuse, gepaart mit einem langsameren Absinken des Glukosespiegels.

Müller et al. (2012) zeigten, dass die Expression einer dominant-negativen Mutante von Egr-1 in pankreatischen β -Zellen zur Ausbildung deutlich kleinerer pankreatischer Inseln führte. Die Größe der pankreatischen Inseln der A-Fos exprimierenden Mäuse unterschied sich hingegen nicht von denen der Kontrolltiere. Die Experimente zeigen, dass ein aktiver AP-1-Komplex notwendig ist, damit die β -Zellen die Glukosehomöostase regulieren können. Zukünftige Experimente sollten mögliche Zielgene des AP-1-Komplexes identifizieren, deren Genprodukte die Glukosehomöostase beeinflussen. AP-1 könnte beispielsweise einen

direkten Einfluss auf die Insulinexpression haben, wie es von Susini et al. (1998) postuliert wurde.

5.2.2. Die Regulation der Glukosehomöostase und der Inselgröße durch „Ternary complex factors“ im Mausmodell

In unserer Arbeitsgruppe wurde von Müller et al. (2012) gezeigt, dass das Egr-1 eine wichtige Rolle bei der Funktion pankreatischer β -Zellen spielt. Egr-1 wird hauptsächlich über Elk-1 reguliert (Mayer et al., 2008). Elk-1 seinerseits kann durch den ERK1/2-Signalweg induziert werden (Clarkson et al., 1999). Wird die Funktion von Egr-1 durch gezielte Expression einer Egr-1 Mutante in den β -Zellen von Versuchsmäusen unterbunden, so kommt es zur Ausbildung eines diabetischen Phänotyps. Charakterisiert ist dieser durch eine gesteigerte Glukose-Intoleranz und verkleinerte β -Zellen (Müller et al., 2012).

Ausgehend von den Beobachtungen von Müller et al. (2012) und der Tatsache, dass Elk-1 die Expression von Egr-1 reguliert (Shin et al., 2011), wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein Ausschalten der Elk-1-Aktivität ebenfalls die Glukosehomöostase und Inselgröße beeinflussen sollte. In dieser Arbeit wurde dazu eine doppelt-transgene Mauslinie analysiert, die eine dominant-negative Elk-1-Mutante (REST/Elk-1 Δ C) in den β -Zellen des Pankreas exprimierte. Diese Mutante ermöglichte es, die biologische Aktivität aller drei TCF's zu hemmen. Experimente mit dem transgenen Mausmodell zeigten, dass die Expression der Elk-1-Mutante zu einer gestörten Glukosehomöostase führte. Im intraperitonealen Glukosetoleranztest dieser Mäuse zeigte sich, dass die Versuchstiere im Vergleich zu den Kontrolltieren einen deutlich erhöhten und langsamer sinkenden Glukosespiegel aufwiesen. Die Störung der Glukosehomöostase beruht dabei wahrscheinlich auf den merklich verkleinerten Inseln. Die Ursache für die Generierung kleinerer Inseln war die Aktivierung der Caspase-3 durch die Elk-1-Mutante. Aufgrund dieser Beobachtung lässt sich schlussfolgern, dass die TCF-Proteine an der Regulation der Glukosehomöostase maßgeblich beteiligt sind. Kommt es zu einer Störung der Aktivierung der TCF-regulierten Gentranskription, so wird die Caspase-3 Aktivität erhöht. Apoptotische Prozesse und Insulinresistenz sind als wichtige Marker der Diabetes-Typ-2-Entwicklung beschrieben worden (Tomita, 2016). Die Beobachtungen für die TCFs wie Elk-1 sind vergleichbar zu den Beobachtungen der Regulation pankreatischer Funktionen durch Egr-1 wie sie von Müller et al. (2012) beschrieben wurden. Egr-1 reguliert die Expression von Pdx-1, einem Regulator der Insulin-Expression (Watada et al., 1996). Für Elk-1 wurde in Studien bereits gezeigt, dass es die Expression von Pdx-1 befördern kann (Eto et al., 2007; Mayer et al., 2011). Bedeutsam ist zudem, dass Pdx-1 neben seiner direkten Wirkung auf die Expression des Insulingens eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und Erhaltung der β -

Zellmasse über apoptotische Prozesse hat. Damit kommt Pdx-1 eine wichtige Rolle in der Entstehung von Diabetes zu (Jonsson et al., 1994; Fujimoto und Polonsky, 2009). TCFs wie Elk-1 nehmen dadurch möglicherweise eine Rolle in der Regulation von Apoptose, in den β -Zellen des Pankreas, über die Regulation von Pdx-1 ein. Weitere Untersuchungen sollten daher darauf abzielen, die direkte Interaktion zwischen Elk-1, Egr-1 und Pdx-1 im Diabetes-Kontext zu bestätigen. Für das weitere Verständnis der Entstehung und Aufrechterhaltung eines diabetischen Phänotyps ist die Entschlüsselung der beteiligten Signalkaskaden und Signalmoleküle unerlässlich.

6. Literaturverzeichnis

1. Abdelhamid R.E., Kovács K.J., Honda C.N., Nunez M.G., Larson A.A. (2013). Resiniferatoxin (RTX) causes a uniquely protracted musculoskeletal hyperalgesia in mice by activation of TRPV1 receptors. *Journal of Pain* 14:1629–1641
2. Acs G., Lee J., Marquez V.E., Blumberg P.M. (1996). Distinct structure-activity relations for stimulation of ^{45}Ca uptake and for high affinity binding in cultured rat dorsal root ganglion neurons and dorsal root ganglion membranes. *Molecular Brain Research* 35:173–182
3. Adisheshaiah P., Li J., Vaz M., Kalvakolanu D. V., Reddy S.P. (2008). ERK signaling regulates tumor promoter induced c-Jun recruitment at the Fra-1 promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 371:304–308
4. Akiba Y., Kato S., Katsube K.I., Nakamura M., Takeuchi K., Ishii H., Hibi T. (2004). Transient receptor potential vanilloid subfamily 1 expressed in pancreatic islet β cells modulates insulin secretion in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 321:219–225
5. Alam J., Stewart D., Touchard C., Boinapally S., Choi A.M.K., Cook J.L. (1999). Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *Journal of Biological Chemistry* 274:26071–26078
6. Alam J., Killeen E., Gong P., Naquin R., Hu B., Stewart D., Ingelfinger J.R., Nath K.A. (2003). Heme activates the heme oxygenase-1 gene in renal epithelial cells by stabilizing Nrf2. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 284:F743–F752
7. Alessi D.R., Cuenda A., Cohen P., Dudley D.T., Saltiel A.R. (1995). PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 270:27489–27494
8. Al-Sarraj A., Day R.M., Thiel G. (2005). Specificity of transcriptional regulation by the zinc finger transcription factors Sp1, Sp3, and Egr-1. *J Cell Biochem* 94:153–167
9. Ammendrup A., Maillard A., Nielsen K., Andersen A.N., Serup P., Madsen O.D., Mandrup-Poulsen T., Bonny C. (2000). The c-Jun amino-terminal kinase pathway is preferentially activated by interleukin-1 and controls apoptosis in differentiating pancreatic β -cells. *Diabetes* 49:1468–1476
10. Angel P., Imagawa M., Chiu R., Stein B., Imbra R.J., Rahmsdorf H.J., Jonat C., Herrlich P., Karin M. (1987). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* 49:729–39
11. Angel P., Baumann I., Stein B., Delius H., Rahmsdorf H.J., Herrlich P. (1987). 12-O-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* 7:2256–66
12. Angel P., Hattori K., Smeal T., Karin M. (1988). The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* 55:875–885

13. Angel P., Karin M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *BBA - Reviews on Cancer* 1072:129–157
14. Ashcroft F.M., Proks. P., Smith P.A., Ämmälä C., Bokvist K., Rorsman P. (1994). Stimulus–secretion coupling in pancreatic β cells. *J Cell Biochem* 55:54–65
15. Backes T.M. (2014). Signaltransduktion und Genregulation von Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) mit Capsaicin. Universität des Saarlandes
16. Backes T.M., Rössler O.G., Hui X., Grötzinger C., Lipp P., Thiel G. (2018). Stimulation of TRPV1 channels activates the AP-1 transcription factor. *Biochem Pharmacol* 150:160–169
17. Backes T.M., Langfermann D.S., Lesch A., Rössler O.G., Laschke M.W., Vinson C., Thiel G. (2021). Regulation and function of AP-1 in insulinoma cells and pancreatic β -cells. *Biochem Pharmacol* 193:114748
18. Bauer I., Al Sarraj J., Vinson C., Larsen R., Thiel G. (2007). Interleukin-1beta and tetradecanoylphorbol acetate-induced biosynthesis of tumor necrosis factor alpha in human hepatoma cells involves the transcription factors ATF2 and c-Jun and stress-activated protein kinases. *J Cell Biochem* 100:242–55
19. Belcheva M.M., Coscia C.J. (2002). Diversity of G protein-coupled receptor signaling pathways to ERK/MAP kinase. *Neurosignals* 11:34–44
20. Bernal-Mizrachi E., Wen W., Srinivasan S., Klenk A., Cohen D., Alan Permutt M. (2001). Activation of Elk-1, an Ets transcription factor, by glucose and EGF treatment of insulinoma cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281:E1286–E1299
21. Berridge M.V., Herst P.M., Tan A.S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* 11:127–152
22. Bisogno T., Melck D., Bobrov M.Y., Gretskaya N.M., Bezuglov V.V., De Petrocellis L., Di Marzo V. (2000). N-acyl-dopamines: Novel synthetic CB1 cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo. *Biochemical Journal* 351:817–824
23. Black A.R., Black J.D. (2013). Protein kinase C signaling and cell cycle regulation. *Front Immunol* 0:423
24. Boillat A., Alijevic O., Kellenberger S. (2014). Calcium entry via TRPV1 but not ASICs induces neuropeptide release from sensory neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience* 61:13–22
25. Bourinet E., Altier C., Hildebrand M.E., Trang T., Salter M.W., Zamponi G.W. (2014). Calcium-permeable ion channels in pain signaling. *Physiol Rev* 94:81–140
26. Boyd A.E. (1992). The role of ion channels in insulin secretion. *J Cell Biochem* 48:234–241
27. Brown D.C. (2016). Resiniferatoxin: The evolution of the “molecular scalpel” for chronic pain relief. *Pharmaceuticals* 9:1–11
28. Brüning D., Reckers K., Drain P., Rustenbeck I. (2017). Glucose but not KCL diminishes submembrane granule turnover in mouse beta-cells. *J Mol Endocrinol* 59:311–324

29. Cargnello M., Roux P.P. (2011). Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75:50–83
30. Caterina M.J., Schumacher M. A., Tominaga M., Rosen T. A., Levine J.D., Julius D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816–24
31. Caterina M.J., Leffler A., Malmberg A.B., Martin W.J., Trafton J., Petersen-Zeitz K.R., Koltzenburg M., Basbaum A.I., Julius D. (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* (1979) 288:306–313
32. Catterall W.A., Perez-Reyes E., Snutch T.P., Striessnig J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 57:411–425
33. Cesari F., Brecht S., Vintersten K., Vuong L.G., Hofmann M., Klingel K., Schnorr J.-J., Arsenian S., Schild H., Herdegen T., Wiebel F.F., Nordheim A. (2004). Mice Deficient for the Ets Transcription Factor Elk-1 Show Normal Immune Responses and Mildly Impaired Neuronal Gene Activation. *Mol Cell Biol* 24:294–305
34. Chan K, Kan YW (1999) Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12731–12736
35. Chen R.H., Sarnecki C., Blenis J. (1992). Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol* 12:915–927
36. Chiu R., Boyle W.J., Meek J., Smeal T., Hunter T., Karin M. (1988). The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* 54:541–52
37. Cho J.H., Kim J.W., Shin J.A., Shin J., Yoon K.H. (2011). β -cell mass in people with type 2 diabetes. *J Diabetes Investig* 2:6–17
38. Christoph T., Grünweller A., Mika J., Schäfer M.K.H., Wade E.J., Weihe E., Erdmann V.A., Frank R., Gillen C., Kurreck J. (2006). Silencing of vanilloid receptor TRPV1 by RNAi reduces neuropathic and visceral pain in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 350:238–243
39. Clapham D.E. (2007). Calcium signaling. *Cell* 131:1047–58
40. Clarkson R.W.E., Shang C.A., Levitt L.K., Howard T., Waters M.J. (1999). Ternary complex factors Elk-1 and Sap-1a mediate growth hormone-induced transcription of egr-1 (early growth response factor-1) in 3T3-F442A preadipocytes. *Molecular Endocrinology* 13:619–631
41. Colotta F., Polentarutti N., Sironi M., Mantovani A. (1992). Expression and involvement of c-fos and c-jun protooncogenes in programmed cell death induced by growth factor deprivation in lymphoid cell lines. *Journal of Biological Chemistry* 267:18278–18283
42. Costello P., Nicolas R., Willoughby J., Wasylyk B., Nordheim A., Treisman R. (2010). Ternary Complex Factors SAP-1 and Elk-1, but Not Net, Are Functionally Equivalent in Thymocyte Development. *The Journal of Immunology* 185:1082–1092

43. Costello P.S., Nicolas R.H., Watanabe Y., Rosewell I., Treisman R. (2004). Ternary complex factor SAP-1 is required for Erk-mediated thymocyte positive selection. *Nat Immunol* 5:289–298
44. Davis J.B., Gray J., Gunthorpe M.J., Hatcher J.P., Davey P.T., Overend P., Harries M.H., Latcham J., Clapham C., Atkinson K., Hughes S.A., Rance K., Grau E., Harper A.J., Pugh P.L., Rogers D.C., Bingham S., Randall A., Sheardown S.A. (2000). Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405:183–187
45. Dhaka A., Uzzell V., Dubin A.E., Mathur J., Petrus M., Bandell M., Patapoutian A. (2009). TRPV1 is activated by both acidic and basic pH. *Journal of Neuroscience* 29:153–158
46. Di Benedetto G., Zoccarato A., Lissandron V., Terrin A., Li X., Houslay M.D., Baillie G.S., Zaccolo M. (2008). Protein kinase A type I and type II define distinct intracellular signaling compartments. *Circ Res* 103:836–844
47. Donath M.Y., Gross D.J., Cerasi E., Kaiser N. (1999). Hyperglycemia-induced β -cell apoptosis in pancreatic islets of *Psammomys obesus* during development of diabetes. *Diabetes* 48:738–744
48. DuBridge R.B., Tang P., Hsia H.C., Leong P.M., Miller J.H., Calos M.P. (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* 7:379–87
49. Dudley D.T., Pang L., Decker S.J., Bridges A.J., Saltiel A.R. (1995). A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7686–7689
50. Eferl R., Wagner E.F. (2003). AP-1: A double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 3:859–868
51. Eferl R., Ricci R., Kenner L., Zenz R., David J.P., Rath M., Wagner E.F. (2003). Liver tumor development: c-Jun antagonizes the proapoptotic activity of p53. *Cell* 112:181–192
52. Elokely K., Velisetty P., Delemotte L., Palovcak E., Klein M.L., Rohacs T., Carnevale V. (2016). Understanding TRPV1 activation by ligands: Insights from the binding modes of capsaicin and resiniferatoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:E137–E145
53. Eto K., Kaur V., Thomas M.K. (2007). Regulation of pancreas duodenum homeobox-1 expression by early growth response-1. *Journal of Biological Chemistry* 282:5973–5983
54. Fenwick A.J., Fowler D.K., Wu S.W., Shaffer F.J., Lindberg J.E.M., Kinch D.C., Peters J.H. (2017). Direct anandamide activation of TRPV1 produces divergent calcium and current responses. *Front Mol Neurosci* 10:200
55. Ferdaoussi M., Abdelli S., Yang J.Y., Cornu M., Niederhauser G., Favre D., Widmann C., Regazzi R., Thorens B., Waeber G., Abderrahmani A. (2008). Exendin-4 protects β -cells from interleukin-1 β -induced apoptosis by interfering with the c-Jun NH₂-terminal kinase pathway. *Diabetes* 57:1205–1215

56. Franklin C.C., Kraft A.S. (1997). Conditional expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase MKP-1 preferentially inhibits p38 MAPK and stress-activated protein kinase in U937 cells. *Journal of Biological Chemistry* 272:16917–16923
57. Fujimoto K., Polonsky K.S. (2009). Pdx1 and other factors that regulate pancreatic β -cell survival. *Diabetes Obes Metab* 11:30–37
58. Gallo E.M., Canté-Barrett K., Crabtree G.R. (2006). Lymphocyte calcium signaling from membrane to nucleus. *Nat Immunol* 7:25–32
59. Gangnuss S., Cowin A.J., Daehn I.S., Hatzirodos N., Rothnagel J.A., Varelias A., Rayner T.E. (2004). Regulation of MAPK activation, AP-1 transcription factor expression and keratinocyte differentiation in wounded fetal skin. *Journal of Investigative Dermatology* 122:791–804
60. Garami A., Shimansky Y.P., Rumbus Z., Vizin R.C.L., Farkas N., Hegyi J., Szakacs Z., Solymar M., Csenkey A., Chiche D.A., Kapil R., Kyle D.J., Van Horn W.D., Hegyi P., Romanovsky A.A. (2020). Hyperthermia induced by transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) antagonists in human clinical trials: Insights from mathematical modeling and meta-analysis. *Pharmacol Ther* 208:107474
61. Alonso I.G.L.F., Liang H.C., Turner S.D., Lagger S., Merkel O., Kenner L. (2018). The role of activator protein-1 (AP-1) family members in CD30-positive lymphomas. *Cancers (Basel)* 10 (4):93
62. Gavva N.R., Treanor J.J.S., Garami A., Fang L., Surapaneni S., Akrami A., Alvarez F., Bak A., Darling M., Gore A., Jang G.R., Kessler J.P., Ni L., Norman M.H., Palluconi G., Rose M.J., Salfi M., Tan E., Romanovsky A.A., Banfield C., Davar G. (2008). Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans. *Pain* 136:202–210
63. Gazon H., Barbeau B., Mesnard J.-M., Peloponese J.-M.Jr. (2018). Hijacking of the AP-1 Signaling Pathway during Development of ATL. *Front Microbiol* 0:2686
64. Gerdes M.J., Myakishev M., Frost N.A., Rishi V., Moitra J., Acharya A., Levy M.R., Park S.W., Glick A., Yuspa S.H., Vinson C. (2006). Activator protein-1 activity regulates epithelial tumor cell identity. *Cancer Res* 66:7578–7588
65. Ghilardi J.R., Röhrich H., Lindsay T.H., Sevcik M.A., Schwei M.J., Kubota K., Halvorson K.G., Poblete J., Chaplan S.R., Dubin A.E., Carruthers N.I., Swanson D., Kuskowski M., Flores C.M., Julius D., Mantyh P.W. (2005). Selective blockade of the capsaicin receptor TRPV1 attenuates bone cancer pain. *Journal of Neuroscience* 25:3126–3131
66. Gille H., Kortenjann M., Thomae O., Moomaw C., Slaughter C., Cobb M.H., Shaw P.E. (1995). ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. *EMBO J* 14:951–962
67. Gossen M., Bujard H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5547–5551

68. Gossen M., Freundlieb S., Bender G., Müller G., Hillen W., Bujard H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268:1766–1769
69. Gotoh M., Maki T., Satomi S., Porter J, Bonner-Weir S., O'Hara C.J., Monaco A.P. (1987). Reproducible high yield of rat islets by stationary in vitro digestion following pancreatic ductal or portal venous collagenase injection. *Transplantation* 43:725–730
70. Gouin O., L'Herondelle K., Lebonvallet N., Le Gall-Ianotto C., Sakka M., Buhé V., Plée-Gautier E., Carré J.L., Lefeuvre L., Misery L., Le Garrec R. (2017). TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation: pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization. *Protein Cell* 8:644–661
71. Grabiec U., Dehghani F. (2017). N -Arachidonoyl Dopamine: A Novel Endocannabinoid and Endovanilloid with Widespread Physiological and Pharmacological Activities. *Cannabis Cannabinoid Res* 2:183–196
72. Graham F.L., Smiley J., Russell W.C., Nairn R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36:59–74
73. Gram D.X., Ahrén B., Nagy I., Olsen U.B., Brand C.L., Sundler F., Tabanera R., Svendsen O., Carr R.D., Santha P., Wierup N., Hansen A.J. (2007). Capsaicin-sensitive sensory fibers in the islets of Langerhans contribute to defective insulin secretion in Zucker diabetic rat, an animal model for some aspects of human type 2 diabetes. *European Journal of Neuroscience* 25:213–223
74. Gregorio-Teruel L., Valente P., González-Ros J.M., Fernández-Ballester G., Ferrer-Montiel A. (2014). Mutation of I696 and W697 in the TRP box of vanilloid receptor subtype 1 modulates allosteric channel activation. *Journal of General Physiology* 143:361–375
75. Hectors T.L.M., Vanparys C., Pereira-Fernandes A., Martens G.A., Blust R. (2013). Evaluation of the INS-1 832/13 Cell Line as a Beta-Cell Based Screening System to Assess Pollutant Effects on Beta-Cell Function. *PLoS One* 8:60030
76. Henkel-Rieger R., Hohmeier H.E., Chen G., Prentki M., Newgard C.B., Mulder H. (2007). Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive K⁺ channel-dependent and -independent glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 49:424–430
77. Hillen W., Berens C. (2002). Tetracyclin-gesteuerte Genregulation : Vom bakteriellen Ursprung zum eukaryotischen Werkzeug. *BIOspektrum* 8:355–358
78. Ho K.W., Ward N.J., Calkins D.J. (2012). TRPV1: a stress response protein in the central nervous system. *Am J Neurodegener Dis* 1:1–14
79. Hohmeier H.E., Mulder H., Chen G., Henkel-Rieger R., Prentki M., Newgard C.B. (2000). Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive K⁺ channel-dependent and -independent glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 49:424–430

80. Hsieh W.S., Kung C.C., Huang S.L., Lin S.C., Sun W.H. (2017). TDAG8, TRPV1, and ASIC3 involved in establishing hyperalgesic priming in experimental rheumatoid arthritis. *Sci Rep* 7:1–14
81. Hu H.Z., Gu Q., Wang C., Colton C.K., Tang J., Kinoshita-Kawada M., Lee L.Y., Wood J.D., Zhu M.X. (2004). 2-Aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3. *Journal of Biological Chemistry* 279:35741–35748
82. Huang S.M., Bisogno T., Trevisani M., Al-Hayani A., De Petrocellis L., Fezza F., Tognetto M., Petros T.J., Krey J.F., Chu C.J., Miller J.D., Davies S.N., Geppetti P., Walker J.M., Di Marzo V. (2002). An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8400–8405
83. Hurst H.C. (1994) Transcription factors 1: bZIP proteins. *Protein Profile* 1:123–68
84. Janknecht R., Nordheim A. (1992). Elk-1 protein domains required for direct and SRF-assisted DNA-binding. *Nucleic Acids Res* 20:3317–3324
85. Jin X., Touhey J., Gaudet R. (2006). Structure of the N-terminal Ankyrin Repeat Domain of the TRPV2 Ion Channel *. *Journal of Biological Chemistry* 281:25006–25010
86. Jochum W., Passequé E., Wagner E.F. (2001). AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene* 20:2401–2412
87. Johansen F.E., Prywes R. (1994). Two pathways for serum regulation of the c-fos serum response element require specific sequence elements and a minimal domain of serum response factor. *Mol Cell Biol* 14:5920–5928
88. Jonsson J., Carlsson L., Edlund T., Edlund H. (1994). Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371:606–609
89. Jordt S.-E., Julius D. (2002). Molecular basis for species-specific sensitivity to „hot“ chili peppers. *Cell* 108:421–30
90. Julius D. (2013). TRP channels and pain. *Annu Rev Cell Dev Biol* 29:355–384
91. Karin M. (1995). The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 270:16483–6
92. Karin M., Liu Z.G., Zandi E. (1997). AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9:240–246
93. Kolch W., Heidecker G., Kochs G., Hummel R., Vahidi H., Mischak H., Finkenzeller G., Marmé D., Rapp U.R. (1993). Protein kinase C α activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* 364:249–252
94. Langfermann D.S., Rössler O.G., Thiel G. (2018). Stimulation of B-Raf increases c-Jun and c-Fos expression and upregulates AP-1-regulated gene transcription in insulinoma cells. *Mol Cell Endocrinol* 472:126–139

95. Lanuza-Masdeu J., Isabel Arévalo M., Vila C., Barberà A., Gomis R., Caelles C. (2013). In vivo jnk activation in pancreatic β -cells leads to glucose intolerance caused by insulin resistance in pancreas. *Diabetes* 62:2308–2317
96. Lavoie H., Gagnon J., Therrien M. (2020). ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21:607–632
97. Lee S.Y., Yoon J., Lee M.H., Jung S.K., Kim D.J., Bode A.M., Kim J., Dong Z. (2012). The role of heterodimeric AP-1 protein comprised of JunD and c-Fos proteins in hematopoiesis. *Journal of Biological Chemistry* 287:31342–31348
98. Lee W., Haslinger A., Karin M., Tjian R. (1987). Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40. *Nature* 325:368–372
99. Lee Y.S., Kang Y.S., Lee J.S., Nicolova S., Kim J.A. (2004). Involvement of NADPH oxidase-mediated generation of reactive oxygen species in the apoptotic cell death by capsaicin in HepG2 human hepatoma cells. *Free Radic Res* 38:405–412
100. Lesch A., Rubil S., Thiel G. (2014). Activation and inhibition of transient receptor potential TRPM3-induced gene transcription. *Br J Pharmacol* 171:2645–2658
101. Lesch A., Rössler O.G., Thiel G. (2017). Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase, c-Jun N-Terminal Protein Kinase, and Calcineurin Regulate Transient Receptor Potential M3 (TRPM3) Induced Activation of AP-1. *J Cell Biochem* 118:2409–2419
102. Lishko P.V., Procko E., Jin X., Phelps C.B., Gaudet R. (2007). The Ankyrin Repeats of TRPV1 Bind Multiple Ligands and Modulate Channel Sensitivity. *Neuron* 54:905–918
103. Liu Y., Gorospe M., Yang C., Holbrook N.J. (1995). Role of mitogen-activated protein kinase phosphatase during the cellular response to genotoxic stress: Inhibition of c-Jun N-terminal kinase activity and AP-1-dependent gene activation. *Journal of Biological Chemistry* 270:8377–8380
104. Lois C., Hong E.J., Pease S., Brown E.J., Baltimore D. (2002). Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* 295:868–72
105. Lopez-Bergami P., Huang C., Goydos J.S., Yip D., Bar-Eli M., Herlyn M., Smalley K.S.M., Mahale A., Eroshkin A., Aaronson S., Ronai Z. (2007). Rewired ERK-JNK Signaling Pathways in Melanoma. *Cancer Cell* 11:447–460
106. Maedler K., Schulthess F.T., Bielman C., Berney T., Bonny C., Prentki M., Donath M.Y., Roduit R. (2008). Glucose and leptin induce apoptosis in human β - cells and impair glucose-stimulated insulin secretion through activation of c-Jun N-terminal kinases. *The FASEB Journal* 22:1905–1913
107. Majeed Y., Amer M.S., Agarwal A.K., McKeown L., Porter K.E., O'Regan D.J., Naylor J., Fishwick C.W.G., Muraki K., Beech D.J. (2011). Stereo-selective inhibition of transient receptor potential TRPC5 cation channels by neuroactive steroids. *Br J Pharmacol* 162:1509–1520

108. Majeed Y., Tumova S., Green B.L., Seymour V.A.L., Woods D.M., Agarwal A.K., Naylor J., Jiang S., Picton H.M., Porter K.E., O'Regan D.J., Muraki K., Fishwick C.W.G., Beech D.J. (2012). Pregnenolone sulphate-independent inhibition of TRPM3 channels by progesterone. *Cell Calcium* 51:1–11
109. Malek N., Pajak A., Kolosowska N., Kucharczyk M., Starowicz K. (2015) The importance of TRPV1-sensitisation factors for the development of neuropathic pain. *Molecular and Cellular Neuroscience* 65:1–10
110. Manning G., Whyte D.B., Martinez R., Hunter T., Sudarsanam S (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* (1979) 298:1912–1934
111. Mayer S.I., Willars G.B., Nishida E., Thiel G. (2008). Elk-1, CREB, and MKP-1 regulate Egr-1 expression in gonadotropin-releasing hormone stimulated gonadotrophs. *J Cell Biochem* 105:1267–1278
112. Mayer S.I., Thiel G. (2009). Calcium influx into MIN6 insulinoma cells induces expression of Egr-1 involving extracellular signal-regulated protein kinase and the transcription factors Elk-1 and CREB. *Eur J Cell Biol* 88:19–33
113. Mayer S.I., Müller I., Mannebach S., Endo T., Thiel G. (2011). Signal transduction of pregnenolone sulfate in insulinoma cells: activation of Egr-1 expression involving TRPM3, voltage-gated calcium channels, ERK, and ternary complex factors. *J Biol Chem* 286:10084–96
114. Meisenberg G., Simmons W.H (2012). Integration of Metabolism. *Principles of Medical Biochemistry* 504-534
115. Mergler S., Skrzypski M., Sassek M., Pietrzak P., Pucci C., Wiedenmann B., Strowski M.Z. (2012). Thermo-sensitive transient receptor potential vanilloid channel-1 regulates intracellular calcium and triggers chromogranin A secretion in pancreatic neuroendocrine BON-1 tumor cells. *Cell Signal* 24:233–46
116. Meseguer V., Karashima Y., Talavera K., D'Hoedt D., Donovan-Rodríguez T., Viana F., Nilius B., Voets T. (2008). Transient receptor potential channels in sensory neurons are targets of the antimycotic agent clotrimazole. *Journal of Neuroscience* 28:576–586
117. Miede S., Crause P., Schmidt T., Löhn M., Kleemann H.W., Licher T., Dittrich W., Rütten H., Strübing C. (2012). Inhibition of diacylglycerol-sensitive TRPC channels by synthetic and natural steroids. *PLoS One* 7:e35393
118. Milo-Landesman D., Surana M., Berkovich I., Compagni A., Christofori G., Fleischer N., Efrat S. (2001). Correction of hyperglycemia in diabetic mice transplanted with reversibly immortalized pancreatic beta cells controlled by the tet-on regulatory system. *Cell Transplant* 10:645–50
119. Müller I., Mayer S.I., Keim A., Thiel G., *Biochemie M.* (2009). Analyse von transkriptioneller Aktivierung und DNA-Bindung. *BIOspektrum* 15:52–53

120. Müller I., Endo T., Thiel G. (2010). Regulation of AP-1 activity in glucose-stimulated insulinoma cells. *J Cell Biochem* 110:1481–1494
121. Müller I., Rössler O.G., Thiel G. (2011). Pregnenolone sulfate activates basic region leucine zipper transcription factors in insulinoma cells: role of voltage-gated Ca²⁺ channels and transient receptor potential melastatin 3 channels. *Mol Pharmacol* 80:1179–89
122. Müller I., Rössler O.G., Wittig C., Menger M.D., Thiel G. (2012). Critical Role of Egr Transcription Factors in Regulating Insulin Biosynthesis, Blood Glucose Homeostasis, and Islet Size. *Endocrinology* 153:3040–3053
123. Murthy Madiraju S.R., Poitout V. (2007). G protein-coupled receptors and insulin secretion: 119 and counting. *Endocrinology* 148:2598–2600
124. Nilius B. (2007). TRP channels in disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1772:805–812
125. Nilius B., Owsianik G., Voets T., Peters J.A. (2007). Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev* 87:165–217
126. Nilius B., Szallasi A. (2014). Transient receptor potential channels as drug targets: From the science of basic research to the art of medicine. *Pharmacol Rev* 66:676–814
127. Nitert M.D., Nagorny C.L.F., Wendt A., Eliasson L., Mulder H. (2008). Cav1.2 rather than Cav1.3 is coupled to glucose-stimulated insulin secretion in INS-1 832/13 cells. *J Mol Endocrinol* 41:1–11
128. Ohbuchi K., Mori Y., Ogawa K., Warabi E., Yamamoto M., Hirokawa T. (2016). Detailed Analysis of the Binding Mode of Vanilloids to Transient Receptor Potential Vanilloid Type I (TRPV1) by a Mutational and Computational Study. *PLoS One* 11:e0162543
129. Olah Z., Szabo T., Karai L., Hough C., Fields R.D., Caudle R.M., Blumberg P.M., Iadarola M.J. (2001). Ligand-induced Dynamic Membrane Changes and Cell Deletion Conferred by Vanilloid Receptor 1. *Journal of Biological Chemistry* 276:11021–11030
130. Olive M., Krylov D., Echlin D.R., Gardner K., Taparowsky E., Vinson C. (1997). A dominant negative to activation protein-1 (AP1) that abolishes DNA binding and inhibits oncogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 272:18586–18594
131. Park-Windhol C., Zhang P., Zhu M., Su J., Chaves L., Maldonado A.E., King M.E., Rickey L., Cullen D., Mende U. (2012). Gq/11-mediated signaling and hypertrophy in mice with cardiac-specific transgenic expression of regulator of G-protein signaling 2. *PLoS One* 7:e40048
132. Payne D.M., Rossomando A.J., Martino P., Erickson A.K., Her J.H., Shabanowitz J., Hunt D.F., Weber M.J., Sturgill T.W. (1991). Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J* 10:885–892
133. Pettersson M., Ahrén B., Böttcher G., Sundler F. (1986). Calcitonin gene-related peptide: Occurrence in pancreatic islets in the mouse and the rat and inhibition of insulin secretion in the mouse. *Endocrinology* 119:865–869

134. Piantadosi C.A., Withers C.M., Bartz R.R., MacGarvey N.C., Fu P., Sweeney T.E., Welty-Wolf K.E., Suliman H.B. (2011). Heme oxygenase-1 couples activation of mitochondrial biogenesis to anti-inflammatory cytokine expression. *Journal of Biological Chemistry* 286:16374–16385
135. Riera C.E., Huising M.O., Follett P., Leblanc M., Halloran J., Van Andel R., de Magalhaes Filho C.D., Merkwirth C., Dillin A. (2014). TRPV1 Pain Receptors Regulate Longevity and Metabolism by Neuropeptide Signaling. *Cell* 157:1023–1036
136. Rössler O.G., Henss I., Thiel G. (2008). Transcriptional response to muscarinic acetylcholine receptor stimulation: regulation of Egr-1 biosynthesis by ERK, Elk-1, MKP-1, and calcineurin in carbachol-stimulated human neuroblastoma cells. *Arch Biochem Biophys* 470:93–102
137. Rössler O.G., Lesch A., Thiel G. (2016). Combining fibroblast isolation with lentiviral gene transfer to validate transgene expression in mice following pronucleus injection. *Transgenic Res* 25:839–846
138. Rubil S., Rössler O.G., Thiel G. (2016). CREB, AP-1, ternary complex factors and MAP kinases connect transient receptor potential melastatin-3 (TRPM3) channel stimulation with increased c-Fos expression. *Br J Pharmacol* 173:305–318
139. Rubinson D.A., Dillon C.P., Kwiatkowski A.V., Sievers C., Yang L., Kopinja J., Rooney D.L., Zhang M., Ihrig M.M., McManus M.T., Gertler F.B., Scott M.L., 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* 33:401–6
140. Sakuraba H., Mizukami H., Yagihashi N., Wada R., Hanyu C., Yagihashi S. (2002). Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese Type II diabetic patients. *Diabetologia* 45:85–96
141. Salzer I., Ray S., Schicker K., Boehm S. (2019). Nociceptor signalling through ion channel regulation via GPCRs. *Int J Mol Sci* 20:
142. Sanchez J.F., Krause J.E., Cortright D.N. (2001). The distribution and regulation of vanilloid receptor VR1 and VR1 5' splice variant RNA expression in rat. *Neuroscience* 107:373–381
143. Schliess F., Sinning R., Fischer R., Schmalenbach C., Häussinger D. (1996). Calcium-dependent activation of erk-1 and erk-2 after hypo-osmotic astrocyte swelling. *Biochemical Journal* 320:167–171
144. Schönwasser D.C., Marais R.M., Marshall C.J., Parker P.J. (1998). Activation of the Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway by Conventional, Novel, and Atypical Protein Kinase C Isoforms. *Mol Cell Biol* 18:790–798
145. Schulla V., Renström E., Feil R., Feil S., Franklin I., Gjinovci A., Jing X.J., Laux D., Lundquist I., Magnuson M.A., Obermüller S., Olofsson C.S., Salehi A., Wendt A., Klugbauer N., Wollheim C.B., Rorsman P., Hofmann F. (2003). Impaired insulin secretion and glucose tolerance in β cell-selective Cav1.2 Ca²⁺ channel null mice. *EMBO Journal* 22:3844–3854

146. Shapiro P.S., Ahn N.G. (1998). Feedback regulation of Raf-1 and mitogen-activated protein kinase (MAP) kinase kinases 1 and 2 by MAP kinase phosphatase-1 (MKP-1). *J Biol Chem* 273:1788–93
147. Shaulian E., Karin M. (2001). AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 20:2390–2400
148. Shaulian E., Karin M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 4:E131–E136
149. Shin S.Y., Kim C.G., Lim Y., Lee Y.H. (2011). The ETS family transcription factor ELK-1 regulates induction of the cell cycle-regulatory gene p21 Waf1/Cip1 and the BAX gene in sodium arsenite-exposed human keratinocyte HaCaT cells. *Journal of Biological Chemistry* 286:26860–26872
150. Shirakawa H., Yamaoka T., Sanpei K., Sasaoka H., Nakagawa T., Kaneko S. (2008). TRPV1 stimulation triggers apoptotic cell death of rat cortical neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 377:1211–1215
151. Singh A.K., Saotome K., McGoldrick L.L., Sobolevsky A.I. (2018). Structural bases of TRP channel TRPV6 allosteric modulation by 2-APB. *Nat Commun* 9:1–11
152. Singla R.K., Sultana A., Alam M.S., Shen B. (2020). Regulation of Pain Genes—Capsaicin vs Resiniferatoxin: Reassessment of Transcriptomic Data. *Front Pharmacol* 11:1565
153. Stefano L., Al Sarraj J., Rössler O.G., Vinson C., Thiel G. (2006). Up-regulation of tyrosine hydroxylase gene transcription by tetradecanoylphorbol acetate is mediated by the transcription factors Ets-like protein-1 (Elk-1) and Egr-1. *J Neurochem* 97:92–104
154. Steiner A.A., Turek V.F., Almeida M.C., Burmeister J.J., Oliveira D.L., Roberts J.L., Bannon A.W., Norman M.H., Louis J.C., Treanor J.J.S., Gavva N.R., Romanovsky A.A. (2007). Nonthermal activation of transient receptor potential vanilloid-1 channels in abdominal viscera tonically inhibits autonomic cold-defense effectors. *Journal of Neuroscience* 27:7459–7468
155. Steinmüller L., Cibelli G., Moll J.R., 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
156. Sun H., Charles C.H., Lau L.F., Tonks N.K. (1993). MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell* 75:487–493
157. Susini S., Roche E., Prentki M., Schlegel W. (1998). Glucose and glucocorticoid peptides synergize to induce c-fos, c-jun, junB, zif-268, and nur-77 gene expression in pancreatic β (INS-1) cells. *The FASEB Journal* 12:1173–1182
158. Swanson D.M., Dubin A.E., Shah C., Nasser N., Chang L., Dax S.L., Jetter M., Breitenbucher J.G., Liu C., Mazur C., Lord B., Gonzales L., Hoey K., Rizzolio M., Bogenstaetter M., Codd E.E., Lee D.H., Zhang S.P., Chaplan S.R., Carruthers N.I. (2005). Identification and biological evaluation of 4-(3-trifluoromethylpyridin-2-yl)piperazine-1-carboxylic acid (5-

- trifluoromethylpyridin-2-yl)amide, a high affinity TRPV1 (VR1) vanilloid receptor antagonist. *J Med Chem* 48:1857–1872
159. Szallasi A., Blumberg P.M. (1989). Resiniferatoxin, a phorbol-related diterpene, acts as an ultrapotent analog of capsaicin, the irritant constituent in red pepper. *Neuroscience* 30:515–520
 160. Szallasi A., Cortright D.N., Blum C. A., Eid S.R. (2007). The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat Rev Drug Discov* 6:357–72
 161. Tanaka H., Kashiwagi R., Koizumi T. (2013). Inhibition of calcitonin gene-related peptide (CGRP) has the potential to extend first-phase insulin secretion. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* 121:280–285
 162. Thiel G., Rössler O.G. (2007). Viren als Werkzeuge der Gentherapie. Wie aus einem Retrovirus ein gentransfer-vektor entsteht. *Biologie in Unserer Zeit* 37:241–248
 163. Thiel G., Rössler O.G. (2014). Resveratrol stimulates AP-1-regulated gene transcription. *Mol Nutr Food Res* 58:1402–1413
 164. Thiel G. (2015). Designer receptors exclusively activated by designer drugs. Springer New York
 165. Thiel G., Lesch A., Rubil S., Backes T.M., Rössler O.G. (2018). Regulation of Gene Transcription Following Stimulation of Transient Receptor Potential (TRP) Channels. Academic Press
 166. Thiel G., Backes T.M., Welck J., Steinhausen S., Fischer A.L., Langfermann D.S., Ulrich M., Wissenbach U., Rössler O.G. (2019). Pharmacological inhibition of TRPM8-induced gene transcription. *Biochem Pharmacol* 170:113678
 167. Thiel G., Backes T.M., Rössler O.G. (2020). Chili und der Capsaicinrezeptor TRPV1: Some like it hot – and spicy. *Biologie in Unserer Zeit* 50:246–252
 168. Thiel G., Backes T.M., Guethlein .LA., Rössler O.G. (2021). Critical Protein–Protein Interactions Determine the Biological Activity of Elk-1, A Master Regulator of Stimulus-Induced Gene Transcription. *Molecules* 2021, Vol 26, Page 6125 26:6125
 169. Thiel G., Schmidt T., Rössler O.G. (2021). Ca²⁺ microdomains, calcineurin and the regulation of gene transcription. *Cells* 10:
 170. Thorens B. (2015). GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. *Diabetologia* 58:221–232
 171. Tominaga M., Caterina M.J., Malmberg A.B., Rosen T.A., Gilbert H., Skinner K., Raumann B.E., Basbaum A.I., Julius D. (1998). The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21:531–543
 172. Tomita T. (2016). Apoptosis in pancreatic β -islet cells in Type 2 diabetes. *Bosn J Basic Med Sci* 16:162–179
 173. Treisman R. (1992). The serum response element. *Trends Biochem Sci* 17:423–6

174. Trevisani M., Smart D., Gunthorpe M.J., Tognetto M., Barbieri M., Campi B., Amadesi S., Gray J., Jerman J.C., Brough S.J., Owen D., Smith G.D., Randall A.D., Harrison S., Bianchi A., Davis J.B., Geppetti P. (2002). Ethanol elicits and potentiates nociceptor responses via the vanilloid receptor-1. *Nat Neurosci* 5:546–551
175. Tuluc P., Theiner T., Jacobo-Piqueras N., Geisler S.M. (2021). Role of high voltage-gated ca²⁺ channel subunits in pancreatic β -cell insulin release. From structure to function. *Cells* 10:2004
176. Valenzano K.J., Grant E.R., Wu G., Hachicha M., Schmid L., Tafesse L., Sun Q., Rotshteyn Y., Francis J., Limberis J., Malik S, Whitemore E.R., Hodges D. (2003). N-(4-tertiarybutylphenyl)-4-(3-chloropyridin-2-yl)tetrahydropyrazine-1 (2H)-carbox-amide (BCTC), a novel, orally effective vanilloid receptor 1 antagonist with analgesic properties: I. In vitro characterization and pharmacokinetic properties. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 306:377–386
177. Vandewauw I., De Clercq K., Mulier M., Held K., Pinto S., Van Ranst N., Segal A., Voet T., Vennekens R., Zimmermann K., Vriens J., Voets T. (2018). A TRP channel trio mediates acute noxious heat sensing. *Nature* 555:662–666
178. Vay L., Gu C., McNaughton P.A. (2012). The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. *Br J Pharmacol* 165:787–801
179. Vignali S., Leiss V., Karl R., Hofmann F., Welling A. (2006). Characterization of voltage-dependent sodium and calcium channels in mouse pancreatic A- and B-cells. *Journal of Physiology* 572:691–706
180. Vriens J., Voets T. (2019). Heat sensing involves a TRiPlet of ion channels. *Br J Pharmacol* 176:3893–3898
181. Walder R.Y., Radhakrishnan R., Loo L., Rasmussen L.A., Mohapatra D.P., Wilson S.P., Sluka K.A. (2012). TRPV1 is important for mechanical and heat sensitivity in uninjured animals and development of heat hypersensitivity after muscle inflammation. *Pain* 153:1664–1672
182. Wang K., Hou Y., Gu C., Zhao D., Duan Y., Ran Z., Li Q., Li X. (2017). Inhibitory effect of the mitogen activated protein kinase specific inhibitor PD98059 on mtb-ag-activated Y δ T cells. *Int J Clin Exp Pathol* 10:9644–9648
183. Watada H., Kajimoto Y., Miyagawa J.I., Hanafusa T., Hamaguchi K., Matsuoka T.A., Yamamoto K., Matsuzawa Y., Kawamori R., Yamasaki Y. (1996). PDX-1 induces insulin and glucokinase gene expressions in α TC1 clone 6 cells in the presence of betacellulin. *Diabetes* 45:1826–1831
187. Wes P.D., Chevesich J., Jeromin A., Rosenberg C., Stetten G., Montell C. (1995). TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9652–6

184. Westwick J.K., Cox A.D., Der C.J., Cobb M.H., Hibi M., Karin M., Brenner D.A. (1994). Oncogenic Ras activates c-Jun via a separate pathway from the activation of extracellular signal-regulated kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91:6030–6034
185. Whitmarsh A.J., Shore P., Sharrocks A.D., Davis R.J. (1995). Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. *Science* (1979) 269:403–407
186. Whitmarsh A.J., Davis R.J. (1996). Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med* 74:589–607
187. Winter J., Dray A., Wood J.N., Yeats J.C., Bevan S. (1990). Cellular mechanism of action of resiniferatoxin: a potent sensory neuron excitotoxin. *Brain Res* 520:131–140
188. Xu S.Z., Zeng F., Boulay G., Grimm C., Harteneck C., Beech D.J. (2005). Block of TRPC5 channels by 2-aminoethoxydiphenyl borate: A differential, extracellular and voltage-dependent effect. *Br J Pharmacol* 145:405–414
189. Zhang T., Inesta-Vaquera F., Niepel M., Zhang J., Ficarro S.B., MacHleidt T., Xie T., Marto J.A., Kim N., Sim T., Laughlin J.D., Park H., Lograsso P.V., Patricelli M., Nomanbhoy K., Sorger P.K., Alessi D.R., Gray N.S. (2012). Discovery of potent and selective covalent inhibitors of JNK. *Chem Biol* 19:140–154

7. Publikationen

Tobias M. Backes, Oliver G. Rössler, Xin Hui, Carsten Grötzinger, Peter Lipp und Gerald Thiel: Stimulation of TRPV1 channels activates the AP-1 transcription factor. *Biochemical Pharmacology*. 150, 2018, 160-169.

Gerald Thiel, Andrea Lesch, Sandra Rubil, **Tobias M. Backes** und Oliver G. Rössler: Regulation of Gene Transcription Following Stimulation of Transient Receptor Potential (TRP) Channels. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 33, 2018, 167-189.

Gerald Thiel, **Tobias M. Backes**, Jennifer Welck, Sebastian Steinhausen, Anna-Lena Fischer, Daniel S. Langfermann, Myriam Ulrich, Ulrich Wissenbach und Oliver G. Rössler: Pharmacological Inhibition of TRPM8-induced Gene Transcription. *Biochemical Pharmacology*. 170, 2019, 113678.

Gerald Thiel, **Tobias M. Backes** und Oliver G. Rössler: Chili und der Capsaicinrezeptor TRPV1: Some like it hot – and spicy. *Biologie in Unserer Zeit*. 50, 2020, 246-252.

Andrea Lesch*, **Tobias M. Backes***, Daniel S. Langfermann*, Oliver G. Rössler*, Matthias W. Laschke und Gerald Thiel: Ternary Complex Factor Regulates Pancreatic Islet Size and Blood Glucose Homeostasis in Transgenic Mice. *Pharmacological Research*. 159, 2020, 104983.

(* **gleichwertige Erstautorenschaft**).

Gerald Thiel, **Tobias M. Backes**, Lisbeth A. Guethlein, Oliver G. Rössler: Chromatin-embedded reporter genes: Quantification of stimulus-induced gene transcription. *Gene*. 787, 2021, 145645.

Tobias M. Backes*, Daniel S. Langfermann*, Andrea Lesch, Oliver G. Rössler, Mathias Laschke, Charles Vinson, Gerald Thiel: Regulation and function of AP-1 in insulinoma cells and pancreatic β -cells. *Biochemical Pharmacology*. 193, 2021, 114748

(* **gleichwertige Erstautorenschaft**).

Gerald Thiel, **Tobias M. Backes**, Lisbeth A. Guethlein, Oliver G. Rössler: Critical Protein–Protein Interactions Determine the Biological Activity of Elk-1, a Master Regulator of Stimulus-Induced Gene Transcription. *Molecules*. 26, 2021, 6125.

Louisa Loviscach, **Tobias M. Backes**, Daniel S. Langfermann, Myriam Ulrich, Gerald Thiel: Zn²⁺ ions inhibit gene transcription following stimulation of the Ca²⁺ channels Cav1.2 and TRPM3. *Metallomics*. 12, 2020, 1735-1747.

Tobias M. Backes, Oliver G. Rössler und Gerald Thiel: Somatosensorik und Ionenkanäle. *Biologie in Unserer Zeit*. 52, 2022, 18-19.

8. Kongresse

8.1. Poster

- "Cutting Edge Concepts in Molecular Pharmacology: GPCRs - G-Proteins – TRP channels" vom 3-5 März 2016 in Berlin. Ausgerichtet von der Medizinischen Hochschule Hannover. Titel des Posters: „Stimulation of TRPV1 channels activates the transcriptionfactor AP-1“
- 1st CaSign Symposium am 5. September 2018 an der KU Leuven. Titel des Posters: „Stimulation of TRPV1 channels activates the transcriptionfactor AP-1“

8.2. Vortrag

- 8. Nachwuchswissenschaftler-Meeting „Young Scientists meet Experience“ der GBM auf Schloss Reisenburg vom 2-3 Dezember 2017.
Titel des Vortrags: „Stimulation of TRPV1 channels activates the transcription factor AP-1“

9. Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thiel für die Bereitstellung der hier vorgestellten Forschungsthemen, den geleisteten fachlichen Beistand, die Möglichkeit diese Themen umsetzen zu können und zu guter Letzt der tollen Arbeitsatmosphäre bedanken.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Schmitz für die Bereitschaft zur Übernahme der Zweitkorrektur.

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Laschke und seiner Arbeitsgruppe für die tolle Zusammenarbeit und Unterstützung.

Weiter möchte ich Herrn Dr. Rößler für seinen unermüdlichen Rat in theoretischen, fachlichen, aber auch privaten Themen danken. Für ein nettes Gespräch hat er immer Zeit gefunden.

Danken möchte ich auch allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Thiel für die netten Gespräche und fachlichen Diskussionen, die meine Arbeit ungemein bereichert haben, mich aber auch persönlich haben wachsen lassen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner gesamten Familie, die es mir überhaupt erst ermöglicht haben, dass ich diese Arbeit anfertigen konnte. Durch ihre Entscheidungen konnte ich zu dem werden, der ich heute bin.

Danken möchte ich auch meinen ehemaligen Kommilitonen, die mir das Studium zu einer so großartigen Erfahrung gemacht haben.

Nicht unerwähnt soll auch mein Freundeskreis bleiben, der mir auch immer wieder den Rücken gestärkt und mit Neugierde meine Arbeit verfolgt hat.

Am Ende dieser Danksagung möchte ich meine Freundin nicht unerwähnt lassen, da sie einen nicht unerheblichen Anteil an dieser Arbeit hat, durch ihr Verständnis für das hohe Zeitinvestment in diese Arbeit und den Verlust gemeinsamer Zeit. Sie wurde nie müde die richtigen Worte zu finden. Dafür kann ich nicht genug danken.

10. Publikations-Auswahl

Biochemical Pharmacology 150 (2018) 160–169



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochempharm

Stimulation of TRPV1 channels activates the AP-1 transcription factor

Tobias M. Backes^a, Oliver G. Rössler^a, Xin Hui^b, Carsten Grötzinger^c, Peter Lipp^b, Gerald Thiel^{a,*}^a Department of Medical Biochemistry and Molecular Biology, Saarland University Medical Faculty, D-66421 Homburg, Germany^b Anatomy and Cell Biology, Saarland University Medical Faculty, D-66421 Homburg, Germany^c Department of Internal Medicine, Division of Hepatology and Gastroenterology, Charité, D-13353 Berlin, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Capsaicin
Calcium
c-Fos
c-Jun
ERK
TRPV1

Chemical compounds studied in this article:

PD98059, PubChem CID: 4713
Capsaicin, PubChem CID: 24896598
Resiniferatoxin, PubChem CID: 5702546
N-arachidonoyldopamine, PubChem CID: 5282105

ABSTRACT

Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels were originally described as the receptors of capsaicin, the main constituent of hot chili pepper. The biological functions of TRPV1 channels include pain sensation and inflammatory thermal hyperalgesia. Here, we show that stimulation of HEK293 cells expressing TRPV1 channels (H2C1 cells) with capsaicin or the TRPV1 ligand resiniferatoxin activated transcription mediated by the transcription factor AP-1. No cell death was occurring under these experimental conditions. The AP-1 activity was not altered in capsaicin or resiniferatoxin-stimulated HEK293 cells lacking TRPV1. We identified the AP-1 DNA binding site as the capsaicin/resiniferatoxin-responsive element. Stimulation with the TRPV1 ligand *N*-arachidonoyldopamine increased AP-1 activity in a TRPV1-dependent and TRPV1-independent manner. Stimulation of TRPV1 channels induced an influx of Ca^{2+} into the cells and this rise in intracellular Ca^{2+} was essential for activating AP-1 in capsaicin or resiniferatoxin-stimulated cells. *N*-arachidonoyldopamine stimulation induced a rise in intracellular Ca^{2+} in a TRPV1-dependent and independent manner. AP-1 is a dimeric transcription factor, composed of proteins of the c-Jun, c-Fos and ATF families. Stimulation of TRPV1 channels with capsaicin increased c-Jun and c-Fos biosynthesis in H2C1 cells. The signal transduction of capsaicin, leading to enhanced AP-1-mediated transcription, required extracellular signal-regulated protein kinase ERK1/2 as a signal transducer and the activation of the transcription factors c-Jun and ternary complex factor. Together, these data suggest that the intracellular functions of TRPV1 stimulation may rely on the activation of a stimulus-regulated protein kinase and stimulus-responsive transcription factors.

1. Introduction

Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels belong to the family of TRP non-selective cation channels. TRPV1 has the typical TRP modular structure with six transmembrane domains. The central ion channel is formed by the transmembrane regions 5 and 6. Both N- and C-termini are located in the cytosol [1]. Numerous ligands have been identified that activate TRPV1 channels [1,2]. Most prominent, TRPV1 is activated by capsaicin (trans-8-methyl-*N*-vanillyl-6-nonenamide), a vanilloid derived from hot chili pepper (*Capsicum annuum*). In fact, TRPV1 was initially identified by expression cloning as a capsaicin receptor [3]. The vanilloid resiniferatoxin from *Euphorbia resinifera* is also highly active in stimulation of TRPV1 channels. Various lipids function as endogenous ligands for TRPV1, including *N*-arachidonylethanolamine (anandamide), *N*-arachidonoyldopamine (NADA), *N*-oleoyldopamine, and leukotriene B4 [4]. TRPV1 is prominently expressed in trigeminal and dorsal root sensory ganglia, particular in peptidergic somatosensory neurons. TRPV1 is also expressed outside

the nervous system, e. g. in the kidney and in the gastrointestinal tract.

TRPV1 belongs to the thermoTRPs that sense thermal changes of the environment resulting in sensory nerve impulses. Gene targeting experiments revealed that TRPV1 channels are required for pain sensation and for tissue injury-induced inflammatory thermal hyperalgesia. Thus, TRPV1 plays an essential role in pain hypersensitivity which is associated with chronic pain conditions [5,6]. Activation of TRPV1 channels triggers the secretion of the pro-inflammatory neuropeptides substance P and calcitonin gene-related peptide from peripheral neuronal termini, thus initiating neurogenic inflammation [7]. TRPV1 is also involved in pain conditions associated with inflammation in the gastrointestinal tract [8]. According to its prominent role in pain sensation, TRPV1 is a well studied drug target and TRPV1 antagonists have been suggested for use in the treatment of migraine, chronic intractable pain secondary to cancer, AIDS, diabetes, urinary urge incontinence, chronic cough and irritable bowel syndrome [9].

We previously showed that stimulation of TRPM3 and TRPC6 channels activated stimulus-responsive transcription factors [10–15].

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

<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.02.008>

Received 1 December 2017; Accepted 8 February 2018

Available online 13 February 2018

0006-2952/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

Therefore, we asked whether stimulation of TRPV1 channels leads to a change in gene transcription as well. Here, we show that stimulation of human TRPV1 channels with the plant-derived compounds capsaicin and resiniferatoxin, or the natural TRPV1 ligand NADA increased the biosynthesis of the basic region-leucine zipper (bZIP) transcription factors c-Fos and c-Jun and activated the AP-1 transcription factor. AP-1 (activator protein-1) is a dimer of proteins from the Fos, Jun and ATF transcription factor families. The results of this study show that the TRPV1 ligands capsaicin and resiniferatoxin induced an influx of Ca^{2+} into the cells and this rise in intracellular Ca^{2+} was essential to couple TRPV1 stimulation with the AP-1 transcription factor. The TRPV1 ligand NADA increased the intracellular Ca^{2+} concentration in a TRPV1-dependent and TRPV1-independent manner. Accordingly, stimulation of the cells with NADA activated AP-1 in a TRPV1-dependent and TRPV1-independent manner. We identified extracellular signal-regulated protein kinase as signal transducer and showed that AP-1 activation required the transcription factors c-Jun and TCF following stimulation of TRPV1 channels. Together, our data show that stimulation of TRPV1 channels leads to alternations in the gene expression pattern. In particular, as AP-1 is involved in the regulation of proliferation, transformation, differentiation, and programmed cell death in a tissue-specific manner [16], our data link TRPV1 stimulation to the biological functions of AP-1.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

As a cellular model system to analyze TRPV1 channel signaling, H2C1 cells [17] were used, HEK293 cells expressing human TRPV1 channels. HEK293 cells are frequently used to analyze signaling TRP channel signaling. H2C1 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum, 100 units/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, and 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418. Stimulation with capsaicin (Cap., Sigma-Aldrich, Hamburg, Germany, # M2028, dissolved in ethanol), resiniferatoxin (RTX, 5 nM, Tocris, Wiesbaden, Germany, # 1137, dissolved in DMSO), and *N*-arachidonoyldopamine (NADA, 10 μM , Caymen, Ann Arbor, USA, # 90057, dissolved in ethanol) was performed for 24 h in DMEM containing 0.05% fetal bovine serum. Stimulation with arsenite (Sigma-Aldrich, Hammburg, Germany, # S7400) was performed as described [18,19]. The MAP kinase kinase inhibitor PD98059 was purchased from Calbiochem (Darmstadt, Germany, # S513000), dissolved in DMSO and used at a concentration of 50 μM .

2.2. Lentiviral gene transfer

The lentiviral transfer vectors pFUW-FLAG-REST/Elk-1 Δ C, pFUW-MKP-1, and pFUWc-Jun Δ N have been described elsewhere [20–22]. The viral particles were produced as described [23,24].

2.3. Lentiviral expression of short hairpin RNAs (shRNAs)

The lentiviral vector pLentiLox3.7 (pLL3.7) was purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). The sequence used to knock down human TRPV1 expression has been described [25]. The oligonucleotides for creating RNAi stem loops for pLL3.7 were designed as described (http://mcmanuslab.ucsf.edu/protocols/ll37stemloop_design.pdf).

2.4. Reporter assays

The lentiviral transfer vectors pFWColl.luc, pFWColl.luc Δ TRE, and pFWStRE.luc have been described elsewhere [15,26–28]. Cell extracts were prepared using reporter lysis buffer (Promega, Mannheim, Germany) and analyzed for luciferase activities as described [29]. Luciferase activity was normalized to the protein concentration. Data shown

are mean \pm SD from three independent experiments performed in quadruplicate.

2.5. Ca^{2+} transient acquisition and analysis

For ratiometric Fura-2-based Ca^{2+} measurements, H2C1 cells and parental HEK293 cells lacking TRPV1 were loaded with Fura-2/AM (Life Technologies, Darmstadt, Germany) for 30 min and 10 min for de-esterification. Cells were bathed in Tyrode's solution (135 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 , 10 mM glucose, 2 mM MgCl_2 , and 10 HEPES, adjusted to pH 7.35), mounted on a microscope (TILL IMIC, TILL Photonics GmbH, Gräfelfing, Germany) and imaged through a 20x oil-immersion objective (UPLSAPO 20x oil 0.85, Olympus, Tokyo, Japan). Excitation was performed at alternating wavelengths 340/380 nm (15 nm FWHM with a PolyChrome V, TILL Photonics, Germany) while the emission (> 510 nm) was imaged by a CCD camera (Retiga-2000R, Qimaging, Surrey, Canada) with 2 fps (image size: 400 x 300 pixels). Where mentioned, Ca^{2+} free extracellular Tyrode was generated by omitting additional Ca^{2+} and adding 5 mM EGTA. The acquired images were analyzed using custom written macros in ImageJ processing program (W. Rasband, NIH, Bethesda, USA). Images were background corrected and region-of-interest (ROI) fluorescence over time data was collected and further processed into F340/F380 ratio of Fura-2 in IgorPro (Wavemetrics, Lake Oswego, USA). The amplitude of Ca^{2+} transient was calculated as 98% maximum from baseline of the signal. The final statistical analysis was undertaken in Prism 6 software (GraphPad Software Inc., FI/USA).

2.6. RT-PCR

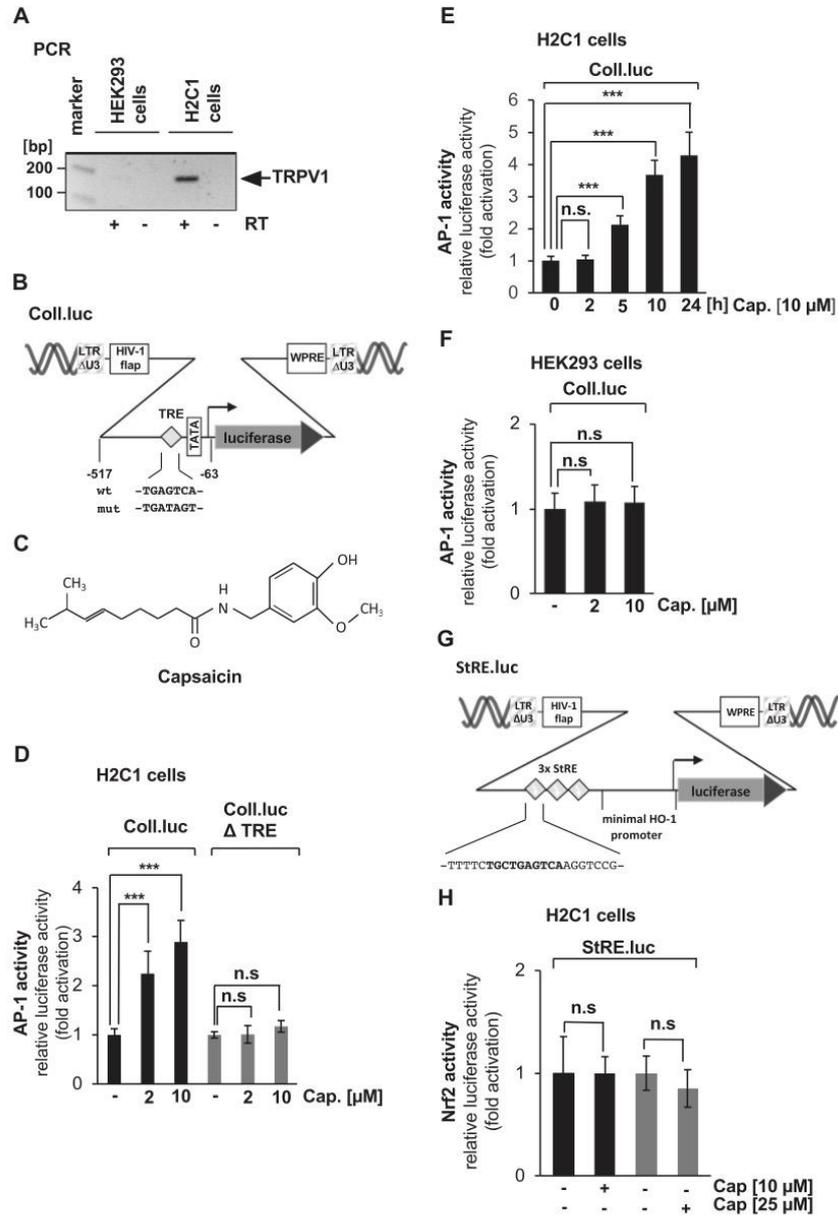
Total RNA was isolated from H2C1 cells and HEK293 cells using an RNeasy Mini Kit (# 74104, Qiagen, Hilden, Germany). 1 μg of RNA was reverse transcribed with Revert AidTM Reverse Transcriptase (# EP0441, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany, 200 U) and random hexamer primers (# S0142, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany) in a 20 μl reaction mix according to the manufacturers protocol. PCR was performed with 1 μl cDNA in a 25 μl reaction mix with Taq DNA Polymerase (# M0267S, New England Biolabs, Frankfurt, Germany, 1 U) with the TRPV1 specific primers, 5'-AAGGGTGACTCGGAGGAG-3' and 5'-CTGCGATCATAGAGCCTG AGG-3', to amplify a 194 bp fragment. The following PCR cycle conditions were used: denaturation (95 $^{\circ}\text{C}$, 30 s), annealing (60 $^{\circ}\text{C}$, 30 s), primer extension (68 $^{\circ}\text{C}$, 30 s) with 27 cycles. PCR product was resolved by electrophoresis on agarose gel and stained with ethidium bromide.

2.7. Western blot

Whole cell extracts and nuclear extracts were prepared as described [29]. 30 μg of nuclear proteins were separated by SDS-PAGE and the blots were incubated with antibodies directed against c-Fos (Santa Cruz, Heidelberg, Germany, # sc-52), or c-Jun (Santa Cruz, Heidelberg, Germany, # sc-1694). An antibody directed against HDAC1 (Santa Cruz, Heidelberg, Germany, # sc-81598) was used as a loading control. Phosphorylated extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) was detected with an antibody directed against the phosphorylated form of ERK (Santa Cruz, Heidelberg, Germany, # sc-153). The antibody directed against ERK (Santa Cruz, Heidelberg, Germany, # sc-7383) was used as a loading control. FLAG-tagged proteins were detected with the M2 monoclonal antibody directed against the FLAG epitope (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany, # F3165). Immunoreactive bands were detected via enhanced chemiluminescence as described [10,30].

2.8. Cell viability assay

Cell death was measured by determination of the mitochondrial reduction capacities via quantification of the level of 3-(4,5-



(caption on next page)

Fig. 1. Stimulation of H2C1 cells with capsaicin increases the cellular AP-1 activity. (A) Expression of TRPV1 in H2C1 cells. RNA was prepared from H2C1 and HEK293 cells. Expression of TRPV1 was monitored via RT-PCR. (B) Schematic representation of the integrated provirus encoding a collagenase promoter/luciferase reporter gene (Coll.luc). The location and sequence of the AP-1 binding site (12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-responsive element (TRE)), within the collagenase promoter is depicted. The U3 region of the 5' LTR of the transfer vector is deleted. The location of the woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element (WPRE) and the HIV-1 flap element are shown. (C) Capsaicin. (D) H2C1 cells were infected with a recombinant lentivirus containing either a collagenase promoter/luciferase reporter gene (left panel, Coll.luc) or a collagenase promoter/luciferase reporter gene with mutations within the TRE (right panel, Coll.lucΔTRE). The cells were serum-starved for 24 h and then stimulated with capsaicin (2 and 10 μM) for 24 h. Cell extracts were prepared and analyzed for luciferase activities. Luciferase activity was normalized to the protein concentration. Data shown are mean ± SD of three independent experiments performed in quadruplicate (***, $P < 0.001$; n.s., not significant). (E) H2C1 cells were infected with a recombinant lentivirus containing the collagenase promoter/luciferase reporter gene. The cells were serum-starved for 24 h and then stimulated with capsaicin (10 μM) for 2, 5, 10, or 24 h. Cell extracts were prepared and analyzed for luciferase activities. Luciferase activity was normalized to the protein concentration. Data shown are mean ± SD of three independent experiments performed in quadruplicate (***, $P < 0.001$; n.s., not significant). (F) HEK293 cells were infected with a recombinant lentivirus containing a Coll.luc reporter gene. The cells were serum-starved for 24 h and then stimulated with capsaicin (2 and 10 μM) for 24 h. Cell extracts were prepared and analyzed for luciferase activities. Luciferase activity was normalized to the protein concentration. Data shown are mean ± SD of 3 independent experiments performed in quadruplicate. (G) Schematic representation of the integrated provirus encoding a stress-response element-regulated luciferase reporter gene (StRE.luc). The sequence of the stress-response element is in bold. The regulatory region contains three binding sites for the transcription factor Nrf2, derived from the heme oxygenase gene, upstream of a minimal heme oxygenase promoter. (H) H2C1 cells were infected with a recombinant lentivirus containing the StRE.luc reporter gene. The cells were serum-starved for 24 h and then stimulated with capsaicin (10 μM and 25 μM). Luciferase activity was normalized to the protein concentration. Data shown are mean ± SD of three independent experiments performed in quadruplicate (n.s., not significant).

dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma) reduction to formazan dye crystals as described [31].

2.9. Statistics

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

3. Results

3.1. Stimulation of H2C1 cells with capsaicin activates the transcription factor AP-1

We recently showed that stimulation of TRPM3 and TRPC6 channels induced the activation of AP-1 [11–13,15,32]. Therefore, we asked whether stimulation of TRPV1 channels with capsaicin also results in the activation of AP-1. As a cellular model system, we used H2C1 cells which are HEK293 cells that constitutively express human TRPV1 channels (Fig. 1A). To measure the cellular AP-1 activity, a collagenase promoter/luciferase reporter gene was used that contains a well characterized AP-1 binding site, also known as a 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-responsive element (TRE), in its proximal promoter region [12,13,15,33–35]. To integrate the reporter gene into the genome of the cells, we used lentiviral gene transfer. By this means, the reporter gene was embedded into a nucleosomal architecture. In Fig. 1B an integrated provirus containing the collagenase promoter/luciferase reporter gene is depicted, including the sequence of the wild-type and mutated TRE (ΔTRE). H2C1 cells were infected with a lentivirus containing a luciferase gene under the control of the collagenase promoter (Coll.luc). The cells were stimulated with the TRPV1 ligand capsaicin (Fig. 1C) for 24 h, harvested and analyzed for luciferase activity. Fig. 1D shows that capsaicin stimulation strongly activated AP-1 in a dose-dependent manner. In contrast, capsaicin stimulation did not increase transcription of the Coll.luc reporter gene that contained a mutated AP-1 binding site (Coll.lucΔTRE). These data indicate that the TRE functions as a capsaicin-responsive element. The analysis of the time scale showed that capsaicin induced a significant AP-1 activation 5 h after stimulation (Fig. 1E). We selected a 24 h treatment because previous experiments addressing the activation of AP-1 following stimulating of TRPM3 or TRPC6 channels used this time scale. Capsaicin stimulation of HEK293 cells that did not express TRPV1 channels did not result in elevated AP-1 activity (Fig. 1F), indicating that expression of TRPV1 channels was essential to connect capsaicin stimulation with increased AP-1-regulated gene transcription. Stimulation of TRPV1 channels with capsaicin did not induce transcription from the StRE.luc reporter gene that is regulated by the bZIP transcription factor Nrf2 (Fig. 1G, 1H).

3.2. AP-1 activation following stimulation of TRPV1 channels is not the result of capsaicin toxicity and cell death

Prolonged activation of TRPV1 channels has been described to induce apoptosis in neurons [36,37]. We therefore assessed whether the activation of AP-1 in capsaicin-stimulated H2C1 cells was the result of capsaicin toxicity and cell death. We used the reduction of tetrazolium salts by mitochondrial NAD(P)H-dependent dehydrogenases to formazan as an indicator for cell death and survival. Capsaicin concentrations of 10 or 25 μM in the cell culture medium were not cytotoxic, indicating that no cell death was occurring under these experimental conditions (data not shown).

3.3. Stimulation of TRPV1 channels with natural and plant-derived ligands activates AP-1 regulated gene transcription

Various ligands have been described for TRPV1 channels. To exclude that the activation of AP-1 is a specific effect of capsaicin, we tested the TRPV1 ligands resiniferatoxin (RTX) and NADA (Fig. 2A, C). Fig. 2B and D show that stimulation of TRPV1 channels with RTX or NADA triggered an activation of AP-1. To assess the specificity of these ligands, we stimulated HEK293 cells lacking TRPV1 channels with RTX or NADA. RTX stimulation did not change the AP-1 activity in HEK293 cells lacking TRPV1 channels. In contrast, a significantly elevated AP-1 activity was measured in HEK293 cells that had been stimulated with NADA (Fig. 2D). These results indicate that RTX requires TRPV1 channels to stimulate AP-1, while NADA exhibits TRPV1-dependent and TRPV1-independent activities, leading to the stimulation of AP-1.

3.4. Stimulation of AP-1 following treatment of H2C1 cells with capsaicin, RTX, or NADA requires TRPV1 channels

We used a genetic tool to confirm the connection between TRPV1 stimulation and AP-1 activation. We expressed a TRPV1-specific small hairpin (sh) RNA in H2C1 cells. TRPV1 expression was significantly reduced in H2C1 cells expressing the TRPV1-specific shRNA (Fig. 3A). Fig. 3B–D show that the cellular AP-1 activities were significantly reduced in the presence of the TRPV1-specific shRNAs in H2C1 cells that had been stimulated with either capsaicin, RTX, or NADA.

3.5. Stimulation of TRPV1 channels triggers a rise in cytoplasmic Ca^{2+}

TRPV1 channels are non-selective cation channels that have a high Ca^{2+} permeability [3]. AP-1 is frequently activated in various cell types following a rise in cytoplasmic Ca^{2+} levels. Therefore, we assessed whether stimulation of TRPV1 channels with natural and synthetic ligands changes the intracellular Ca^{2+} concentration. TRPV1 expressing H2C1 cells and HEK293 cells were stimulated with either capsaicin, RTX, or NADA. Fig. 4A shows typical Fura2-ratio traces. Fig. 4B depicts

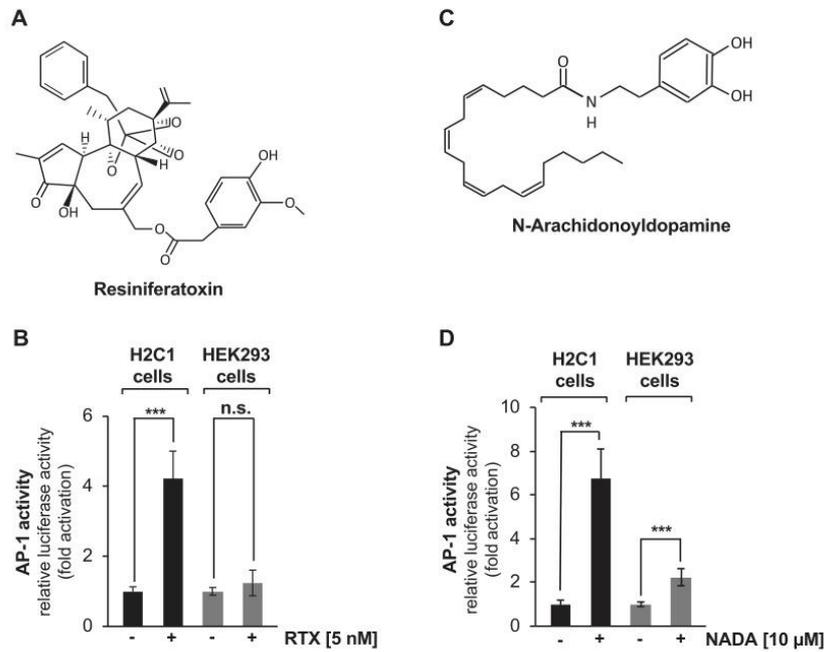


Fig. 2. Stimulation of H2C1 cells with the TRPV1 ligands resiniferatoxin and *N*-arachidonoyldopamine induces the activation of AP-1. (A) Resiniferatoxin (RTX). (C) *N*-Arachidonoyldopamine (NADA). (B, D) H2C1 cells and HEK293 cells were infected with a recombinant lentivirus containing the Coll.luc reporter gene. The cells were serum-starved for 24 h and stimulated with RTX (5 nM) (B), or NADA (10 μM) (D) for 24 h. Cell extracts were prepared and analyzed for luciferase activities. Luciferase activity was normalized to the protein concentration. Data shown are mean \pm SD of three independent experiments performed in quadruplicate (***, $P < 0.001$; n.s., not significant).

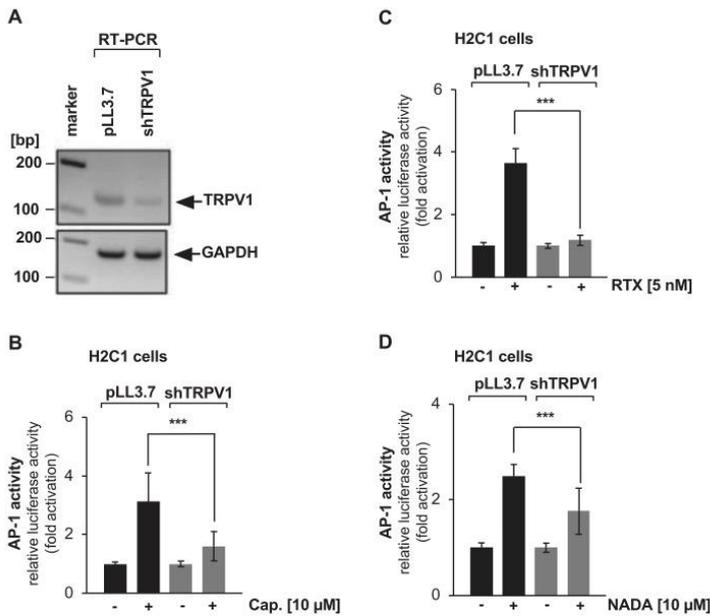


Fig. 3. Essential role of TRPV1 channels in activating AP-1 following stimulation with either capsaicin, RTX or NADA. (A) Reduction of TRPV1 expression in H2C1 cells expressing a TRPV1-specific shRNA. H2C1 cells were infected with a lentivirus encoding a TRPV1-specific shRNA. As a control, cells were infected with a lentivirus prepared with the parent lentiviral vector pLL3.7 and incubated for 3 days. RNA was prepared from the infected cells and expression of TRPV1 was monitored via RT-PCR using gene specific primers. (B-D) H2C1 cells were infected with a recombinant lentivirus containing the Coll.luc reporter gene. In addition, cells were infected with a lentivirus encoding a TRPV1-specific shRNA. A lentivirus prepared with the lentiviral vector pLL3.7 was used as a control. The cells were serum-starved for 24 h and stimulated with either capsaicin (10 μM) (B), RTX (5 nM) (C), or NADA (10 μM) (D) for 24 h. Cell extracts were prepared and analyzed for luciferase activities. Luciferase activity was normalized to the protein concentration. Data shown are mean \pm SD of three independent experiments performed in quadruplicate (***, $P < 0.001$).

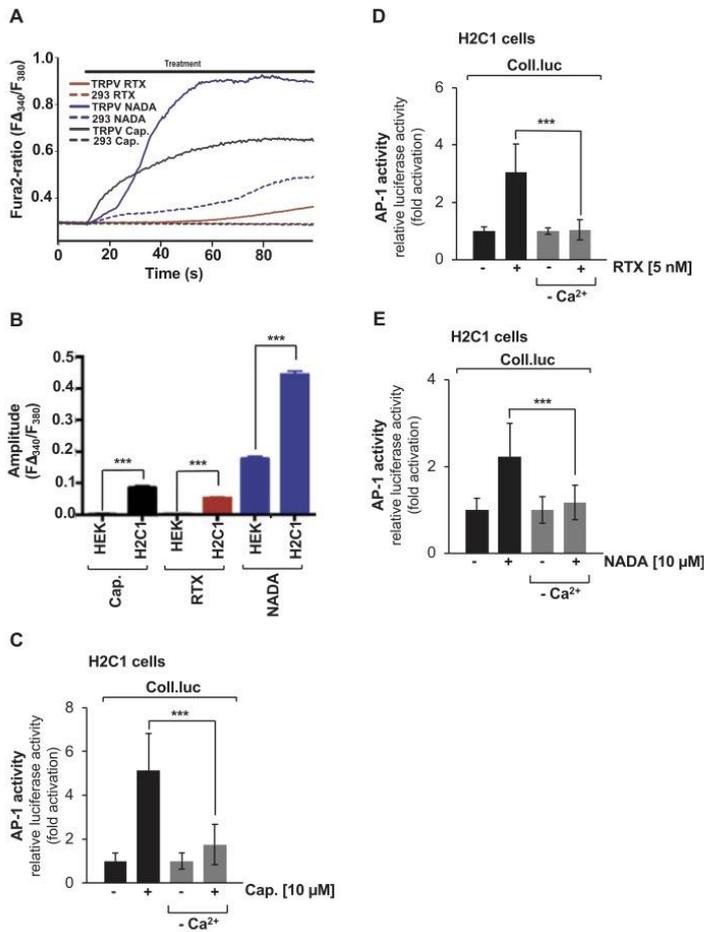


Fig. 4. A rise in intracellular Ca²⁺ is required to connect TRPV1 stimulation with AP-1 activation. (A, B) Ca²⁺ measurements in H2C1 and HEK293 cells, stimulated with either capsaicin, RTX, or NADA. (A) Cells were loaded with Fura-2. Typical Fura-2 ratio traces in individual H2C1 and HEK293 cells stimulated with either capsaicin (10 μM), RTX (5 nM), or NADA (10 μM). (B) Statistical summary of a larger population of cells. (C-E) H2C1 cells and HEK293 cells infected with a recombinant lentivirus containing the Coll.luc reporter gene. The cells were serum-starved for 24 h in either DMEM or in Ca²⁺-free medium. Cells were stimulated with either capsaicin (10 μM) (C), RTX (5 nM) (D), or NADA (10 μM) (E) for 24 h. Cell extracts were prepared and analyzed for luciferase activities. Luciferase activity was normalized to the protein concentration. Data shown are mean ± SD of three experiments performed in quadruplicate (***, P < 0.001).

the statistical comparison. Stimulation of the cells with capsaicin or RTX increased the intracellular Ca²⁺ concentration in TRPV1-expressing H2C1 cells, while no or only a marginal elevation of Ca²⁺ was measured in HEK293 cells. These results indicate that the Ca²⁺ influx in capsaicin or RTX-stimulated cells was mediated by TRPV1. Treatment of HEK293 cells with NADA induced a strong Ca²⁺-influx which was even stronger in H2C1 cells (Fig. 4A, B). Thus, NADA stimulation increased the intracellular Ca²⁺ concentration in a TRPV1-dependent and TRPV1-independent manner.

3.6. Essential role of Ca²⁺ influx in activating AP-1 following stimulation of TRPV1 channels

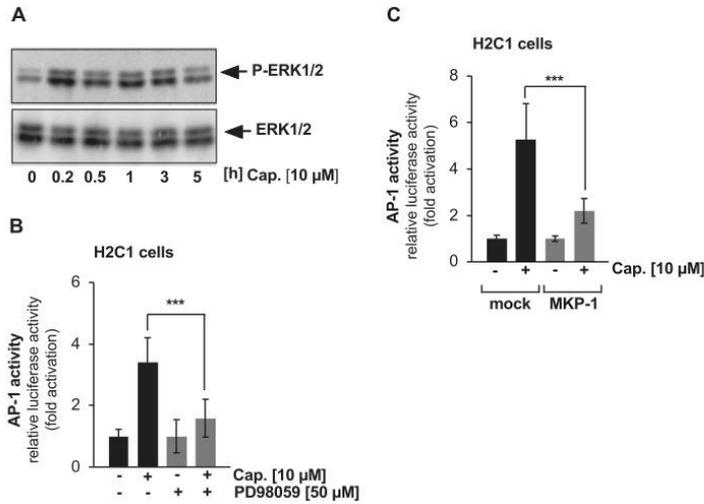
Next, we assessed whether the influx of Ca²⁺ is essential to activate AP-1 following stimulation of TRPV1 channels. Fig. 4C-E show that the activation of AP-1 following stimulation of the cells with either capsaicin, RTX, or NADA was significantly reduced when the cells were cultured in Ca²⁺-free medium. These data indicate that an influx of Ca²⁺ ions into the cells is required to connect TRPV1 stimulation with an upregulation of AP-1-mediated gene transcription.

3.7. Stimulation of TRPV1 channels with capsaicin triggers the phosphorylation of ERK1/2

To elucidate the signal transduction pathway connecting TRPV1 stimulation with AP-1-mediated gene transcription, we focused on the TRPV1 ligand capsaicin. An increase in the intracellular Ca²⁺ concentration frequently activates the protein kinase ERK1/2. Therefore, TRPV1-expressing H2C1 cells were stimulated with capsaicin and phosphorylation of ERK1/2 was detected with a phospho-specific antibody directed against ERK1/2. Fig. 5A shows that stimulation of TRPV1 channels with capsaicin induced a rapid phosphorylation of ERK1/2 that lasted at least 3 h.

3.8. Inhibition of the ERK1/2 signaling pathway attenuates capsaicin-induced activation of AP-1 in H2C1 cells

To assess whether ERK1/2 functions as a signal transducer that connects TRPV1 channel activation with AP-1, we infected H2C1 cells with a lentivirus encoding the collagenase promoter/luciferase reporter gene Coll.luc. The infected cells were preincubated with PD98059, a



(10 μM) for 24 h. Cell extracts were prepared and analyzed for luciferase activities. Luciferase activity was normalized to the protein concentration. Data shown are mean \pm SD of three experiments performed in quadruplicate (***, $P < 0.001$).

Fig. 5. ERK1/2 functions as signal transducer connecting TRPV1 stimulation with AP-1 activation. (A) TRPV1 stimulation induces the phosphorylation of ERK1/2. H2C1 cells were serum-starved for 24 h and stimulated with capsaicin (10 μM) for the indicated time periods. Whole cell extracts were prepared and subjected to Western blot analysis. The blots were incubated with an antibody directed against the phosphorylated active form of ERK2. As a loading control, an antibody detecting ERK was used. (B) Pharmacological impairment of the ERK1/2 signaling pathway attenuates capsaicin/TRPV1-mediated activation of AP-1. H2C1 cells were infected with a recombinant lentivirus containing the Coll.luc reporter gene. The cells were serum-starved for 24 h and preincubated with the compound PD98059 (50 μM). Cells were stimulated with capsaicin (10 μM) for 24 h in the presence of PD98059. Cell extracts were prepared and analyzed for luciferase activities. Luciferase activity was normalized to the protein concentration. Data shown are mean \pm SD of three independent experiments performed in quadruplicate (***, $P < 0.001$). (C) Active nuclear ERK1/2 is required to connect activated TRPV1 channels with AP-1. H2C1 cells were infected with a recombinant lentivirus containing the collagenase promoter/luciferase reporter gene (Coll.luc). Cells were infected with a lentivirus encoding MKP-1. As a control, cells were infected with a lentivirus generated with the lentiviral transfer plasmid pFUW (mock). The cells were serum-starved for 24 h and then stimulated with capsaicin

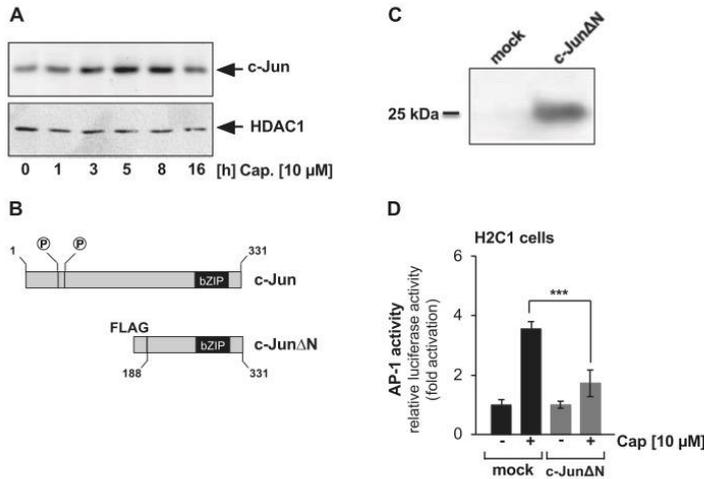
compound that interferes with the phosphorylation of MAP kinase kinase by Raf. Cells were stimulated with capsaicin for 24 h. Fig. 5B shows that preincubation of the cells with PD98059 significantly attenuated the activation of AP-1 in capsaicin-treated H2C1 cells. Thus, an activation of the ERK signaling pathway is required to stimulate AP-1 following TRPV1 activation.

Phosphorylated ERK1/2 translocates to the nucleus to phosphorylate nuclear gene regulatory proteins. To assess whether the signaling cascade connecting TRPV1 channels with AP-1 requires activated ERK1/2 in the nucleus, we expressed MAP kinase phosphatase-1 (MKP-1) in H2C1 cells. MKP-1 catalyzes the dephosphorylation of ERK1/2 and other MAP kinases in the nucleus [38,39]. Fig. 5C shows that AP-1-

regulated transcription was significantly reduced in capsaicin-stimulated H2C1 cells that had been infected with a MKP-1 encoding lentivirus. Together, these data indicate that ERK1/2 functions as signal transducer connecting TRPV1 channels with the AP-1 transcription factor.

3.9. Essential role of c-Jun in activating AP-1 following stimulation of TRPV1 channels with capsaicin

The AP-1 transcription factor was originally described as a heterodimer of c-Jun and c-Fos [40]. Fig. 6A shows that treatment of H2C1 cells with capsaicin induced an upregulation of c-Jun expression. To



(10 μM) for 24 h. Cell extracts were prepared and analyzed for luciferase activities. Luciferase activity was normalized to the protein concentration. Data shown are mean \pm SD of three independent experiments performed in quadruplicate (***, $P < 0.001$).

Fig. 6. The transcription factor c-Jun is essential to connect TRPV1 stimulation with AP-1 activation. (A) Capsaicin stimulation triggers an upregulation of c-Jun expression in H2C1 cells. The cells were cultured for 24 h in medium containing 0.05% serum and then stimulated with capsaicin (10 μM) as indicated. Nuclear extracts were prepared and subjected to Western blot analysis using an antibody directed against c-Jun. The antibody directed against HDAC1 was used as a loading control. (B) Schematic representation of the modular structure of c-Jun and the dominant-negative c-Jun mutant c-JunΔN. c-JunΔN encompasses amino acid residues from amino acid 188 to amino acid 331 of c-Jun. The dominant-negative mutant lacks the transcriptional activation domain, but retains the DNA binding and dimerization domains. The mutant inhibits DNA-binding of its wild-type bZIP counterpart by blocking the cognate sites for DNA-binding. (C) Western blot analysis of H2C1 cells infected with a c-JunΔN-encoding lentivirus. As a control, cells were infected with a lentivirus prepared with the lentiviral vector pFUW (mock). Western blots were probed with the antibody directed against the FLAG epitope. (D) Expression of c-JunΔN attenuates capsaicin-induced activation of AP-1. H2C1 cells were infected with a lentivirus containing a collagenase promoter/luciferase reporter gene. In addition, cells were infected with a lentivirus encoding c-JunΔN. As a control, cells were infected with lentiviral stocks prepared with the lentiviral transfer vector pFUW (mock). Serum-starved cells were stimulated with capsaicin

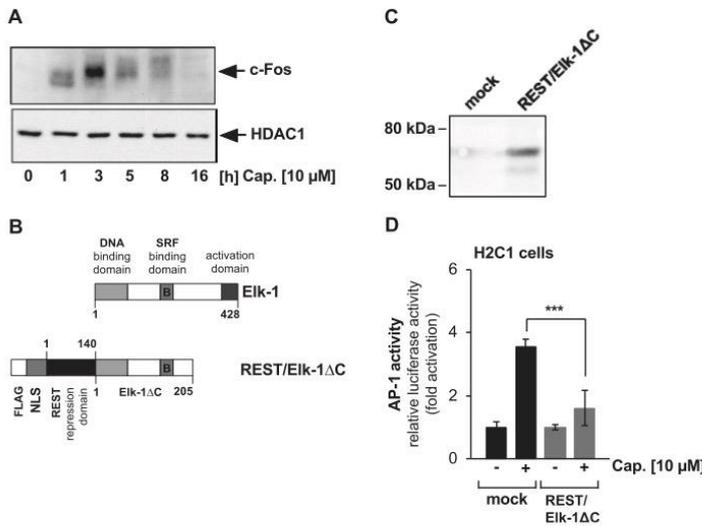


Fig. 7. Ternary complex factors are required to link TRPV1 stimulation with AP-1 activation. (A) Capsaicin stimulation triggers an upregulation of c-Fos expression in H2C1 cells. The cells were cultured for 24 h in medium containing 0.05% serum and then stimulated with capsaicin (10 μM) as indicated. Nuclear extracts were prepared and subjected to Western blot analysis using an antibody directed against c-Fos. The antibody directed against HDAC1 was used as a loading control. (B) Schematic representation of the modular structure of Elk-1 and the dominant-negative mutant REST/Elk-1ΔC. (C) Western blot analysis of H2C1 cells infected with a REST/Elk-1ΔC-encoding lentivirus. As a control, cells were infected with a lentivirus prepared with the lentiviral vector pFUW (mock). Western blots were probed with the antibody directed against the FLAG epitope. (D) H2C1 cells were infected with a lentivirus containing the Coll.luc reporter gene. In addition, cells were either mock-infected or infected with a recombinant lentivirus encoding REST/Elk-1ΔC. The cells were stimulated with capsaicin (10 μM) for 24 h. Cell extracts were prepared and analyzed for luciferase activities. Luciferase activity was normalized to the protein concentration. Data shown are mean ± SD of three independent experiments performed in quadruplicate (***, $P < 0.001$).

assess the role of c-Jun in the regulation of AP-1 activity by TRPV1, we expressed a dominant-negative mutant of c-Jun, c-JunΔN (Fig. 6B), in H2C1 cells, an efficient inhibitor of c-Jun [13,33,35,41]. Fig. 6C shows the expression of c-JunΔN in H2C1 cells following infection with a recombinant lentivirus encoding c-JunΔN. Next, the impact of c-JunΔN on capsaicin-mediated stimulation of AP-1 was assessed. Fig. 6D shows that expression of c-JunΔN attenuated AP-1-regulated gene transcription in capsaicin-stimulated H2C1 cells, indicating that c-Jun or a c-Jun dimerization partner is involved in the stimulation of AP-1 in H2C1 cells that had been stimulated with capsaicin.

3.10. Essential role of ternary complex factors in stimulating AP-1 in H2C1 cells expressing active TRPV1 channels

The classic dimerization partner of c-Jun is c-Fos. Fig. 7A shows that stimulation of H2C1 cells with capsaicin increased the expression level of c-Fos. Capsaicin stimulation resulted in the generation of multiple c-Fos immunoreactive bands, most likely due to covalent modifications of the c-Fos protein. One of the best characterized activators of c-Fos gene transcription are the serum response factor and the ternary complex factors (TCFs). TCFs are transcription factors that contact DNA and also bind to a dimer of the serum response factor (SRF), thus generating a ternary complex. TCFs connect intracellular signaling cascades with transcriptional activation of serum response element (SRE)-responsive genes [42,43]. Elk-1 belongs to the ternary complex factors (TCFs) and it has been shown that Elk-1 controls AP-1 activity, most likely via controlling c-Fos expression [13,27,33–35,41]. We therefore assessed whether an impairment of Elk-1 function attenuated the capsaicin-mediated upregulation of AP-1 in H2C1 cells. We expressed a dominant-negative mutant of Elk-1, REST/Elk-1ΔC (Fig. 7B) in H2C1 cells. The mutant retained the DNA and SRF binding domains, but lacked the activation domain of Elk-1. REST/Elk-1ΔC binds to the Elk-1 DNA-cognate site and to SRF and thus blocks the access of wild-type Elk-1 to DNA. The Elk-1 mutant was expressed in H2C1 cells that had been infected with a REST/Elk-1ΔC-encoding lentivirus (Fig. 7C). Expression of REST/Elk-1ΔC significantly reduced AP-1 activity in capsaicin-stimulated H2C1 cells (Fig. 7D). We conclude that the signaling cascade connecting stimulated TRPV1 channels with AP-1 requires the transcription factors c-Jun and Elk-1.

4. Discussion

Recently, we showed that stimulation of TRPM3 and TRPC6 channels triggers a signaling cascade leading to the activation of AP-1 [11–13,15]. The objective of this study was to investigate whether stimulation of TRPV1 channels leads to an activation of AP-1 as well. AP-1 is a dimeric transcription factor composed of bZIP proteins of the Fos, Jun, and ATF (activating transcription factor) family of transcription factors. Originally, AP-1 was described as a heterodimer of c-Jun and c-Fos [40]. AP-1 is a convergence point for many intracellular signaling cascades, regulating many biological functions, including the regulation of proliferation, transformation, differentiation, and apoptosis [44]. To measure AP-1 activity in the cells, an AP-1-responsive reporter gene was used as suggested by Karin [16] which was integrated into the chromatin to ensure that it was packed into an ordered nucleosomal structure. The results of this study show that stimulation with the TRPV1 ligands capsaicin or RTX activated the AP-1 transcription factor in a TRPV1-dependent manner. NADA exhibited a TRPV1-dependent and a TRPV1-independent activation of AP-1. Endovanilloids such as NADA are not TRPV1-specific ligands. Rather, these compounds are promiscuous, as shown by the observation that NADA activates CB₁ cannabinoid receptors and also shows TRPV1 and CB₁ receptor-independent activities [45,46]. The nature of the NADA receptor in HEK293 cells is not yet known. Experiments involving overexpression of regulator of G protein signaling-2 (RGS2) were negative (T.M. Backes, G.Thiel, unpublished observations), indicating that receptors coupled to the Gαq protein are not involved in NADA signaling.

The activation of AP-1 in TRPV1 expressing cells was not the result of ligand toxicity as observed for cortical neurons [36,37]. Thus, neurons are much more sensitive in terms of capsaicin-induced toxicity in comparison to HEK293-derived H2C1 cells.

TRPV1 functions as a Ca²⁺-permeable cation channel [3]. Accordingly, the influx of Ca²⁺ into the cells and the subsequent rise in the intracellular Ca²⁺ concentration has been frequently used as an indicator of activated TRPV1 channels [3,5]. Ca²⁺ imaging experiments revealed that stimulation of H2C1 cells expressing TRPV1 channels with either capsaicin, RTX, or NADA increased the intracellular Ca²⁺ concentration. While stimulation of HEK293 cells with either capsaicin

or RTX induced no or only marginal changes in the intracellular Ca^{2+} concentration, stimulation with NADA led to a rise in intracellular $[\text{Ca}^{2+}]_i$. This observation explains the TRPV1-independent activation of AP-1 in NADA-stimulated HEK293 cells, which is most likely based on a TRPV1-independent influx of Ca^{2+} following stimulation of HEK293 cells with NADA. Naturally, higher intracellular Ca^{2+} concentrations were measured in H2C1 cells, based on TRPV1-dependent and TRPV1-independent influx of Ca^{2+} .

A rise in cytoplasmic Ca^{2+} levels, induced by stimulating either G α q-coupled receptors, voltage or ligand-activated Ca^{2+} channels, activates the protein kinase ERK1/2 [13,35,47,48]. The results of this study reveal that stimulation of TRPV1 channels with capsaicin also leads to a rapid phosphorylation and activation of ERK1/2. Pharmacological experiments, using the compound PD98059 as a tool for a selective inhibition of the ERK1/2 signaling pathway, clearly showed that the activation of ERK is essential to connect TRPV1 stimulation with AP-1 activation. Moreover, expression experiments involving the nuclear phosphatase MKP-1 revealed that an activated nuclear ERK is needed for stimulation of AP-1 in H2C1 cells. MKP-1 may function as a nuclear shut-off device that interrupts the signaling cascades initiated by capsaicin stimulation of TRPV1 channels. Together, these data identified ERK1/2 as the signal transducer that connects activated TRPV1 channels with AP-1-regulated gene transcription.

AP-1 was originally described as a heterodimer of the bZIP proteins c-Jun and c-Fos. The experiments described here showed that stimulation of TRPV1 channels induced the expression of both of these classical constituents of AP-1. The essential role of both proteins was analyzed in a series of experiments. Based on expression experiments of a dominant-negative mutant of c-Jun, we identified c-Jun as an important regulator of AP-1 activity in capsaicin-treated H2C1 cells. Likewise, capsaicin-induced activation of AP-1 was attenuated in H2C1 cells following expression of a dominant-negative mutant of Elk-1. By this means serum response element-mediated stimulation of c-Fos expression was attenuated. These data confirm previous results showing that the TCF proteins are important regulators of AP-1 [27,33–35,41]. We conclude, c-Jun and TCFs are regulators of AP-1 that are required to connect TRPV1 stimulation with the activation of AP-1.

In summary, we present here the first study showing that stimulation of TRPV1 channels with natural or plant-derived ligands activates the transcription factor AP-1. These results indicate that TRPV1 controls cellular functions via regulating gene transcription of AP-1-regulated genes. Mutational analysis identified the AP-1 DNA binding site as capsaicin-responsive element. The analysis of the signaling pathway revealed that TRPV1 ligands induced a rise in cytoplasmic Ca^{2+} and this Ca^{2+} influx was essential to transduce the signal generated by activation of TRPV1 to the cytoplasm. ERK1/2 was identified as signal transducer within the signaling cascade connecting TRPV1 channels with AP-1, while in the nucleus, the transcription factors c-Jun and TCF were shown to be required for TRPV1-triggered activation of AP-1. In sensory neurons, stimulation of TRPV1 channels has been shown to activate calcitonin gene-related peptide expression involving the transcription factor cAMP response element binding protein (CREB) [49]. Future work has to include the regulation of AP-1 by TRPV1 stimulation in these cells, in order to identify tissue-specific delayed response genes of AP-1.

Authorship contributions

GT conceived and coordinated the study and wrote the paper. TMB, OGR, and XH performed the experiments. GT, TMB, OGR, and PL analyzed the data. CG contributed an indispensable reagent. All authors reviewed the results, corrected the manuscript, and approved the final version of the manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

We thank Libby Guethlein for critical reading of the manuscript. This work was supported by the Saarland University (LOM-T201000492) and by a grant from Deutsche Forschungsgemeinschaft to CG (GR1829/1-1).

References

- [1] S. Bevan, T. Quallo, D.A. Andersson, TRPV1, in: B. Nilius, V. Flockerzi (Eds.), *Mammalian transient receptor potential (TRP) cation channels*, Handbook of Experimental Pharmacology, 222 (2014), pp. 207–240.
- [2] F.C. Meotti, E. Lemos de Andrade, J.B. Calixto, TRP modulation by natural compounds, in: B. Nilius, V. Flockerzi (Eds.), *Mammalian transient receptor potential (TRP) cation channels*, Handbook of Experimental Pharmacology, 223 (2014), pp. 1177–1238.
- [3] M.J. Caterina, M.A. Schumacher, M. Tomlinago, T.A. Rosen, J.D. Levine, D. Julius, The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway, *Nature* 389 (1997) 816–824.
- [4] J. Vriens, G. Appendino, B. Nilius, Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels, *Mol. Pharmacol.* 75 (2009) 1262–1279.
- [5] M.J. Caterina, A. Leffler, A.B. Malmberg, W.J. Martin, J. Trafton, K.R. Petersen-Zeit, M. Koltzenburg, A.I. Basbaum, D. Julius, Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor, *Science* 288 (2000) 306–313.
- [6] J.B. Davis, J. Gray, M.J. Gunthorpe, J.P. Hatcher, P.T. Davey, P. Overend, M.H. Harries, J. Latchman, C. Clapham, K. Atkinson, S.A. Hugher, K. Rance, E. Grau, A.J. Harper, P.L. Pugh, D.C. Rogers, S. Bingham, A. Randall, S.A. Sheardown, Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia, *Nature* 405 (2000) 183–187.
- [7] I. Devesa, C. Ferrándiz-Huertas, S. Mathivanan, C. Wolf, R. Luján, J.P. Changeux, A. Ferrer-Montiel, CGRP is essential for algescic exocytotic mobilization of TRPV1 channels in peptidergic nociceptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111 (2014) 18345–18350.
- [8] R.J. Laing, A. Dhaka, ThermoTRP and pain, *Neuroscientist* 22 (2016) 171–187.
- [9] A. Szallasi, D.N. Cortright, C.A. Blum, S.R. Eid, The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept, *Nat. Rev. Drug Discov.* 6 (2016) (2007) 357–372.
- [10] S.I. Mayer, I. Müller, M. Mannebach, T. Endo, G. Thiel, Signal transduction of pregnenolone sulfate in insulinoma cells. Activation of Egr-1 expression involving TRPM3, voltage-gated calcium channels, ERK, and ternary complex factors, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 10084–10096.
- [11] I. Müller, O.G. Rössler, G. Thiel, Pregnenolone sulfate activates basic region leucine zipper transcription factors in insulinoma cells: role of voltage-gated Ca^{2+} channels and transient receptor potential melastatin 3 channels, *Mol. Pharmacol.* 80 (2011) 1179–1189.
- [12] A. Lesch, S. Rubil, G. Thiel, Activation and inhibition of transient receptor potential TRPM3-induced gene transcription, *Br. J. Pharmacol.* 171 (2014) 2645–2658.
- [13] A. Lesch, X. Hui, P. Lipp, G. Thiel, Transient receptor potential melastatin-3 (TRPM3)-induced activation of AP-1 requires Ca^{2+} ions and the transcription factors c-Jun, ATF2, and ternary complex factor, *Mol. Pharmacol.* 87 (2015) 617–628.
- [14] S. Rubil, O.G. Rössler, G. Thiel, CREB, AP-1, ternary complex factors and MAP kinases connect transient receptor potential melastatin-3 (TRPM3) channel stimulation with increased c-Fos expression, *Brit. J. Pharmacol.* 173 (2016) 305–318.
- [15] G. Thiel, O.G. Rössler, Hyperforin activates gene transcription involving transient receptor potential C6 channels, *Biochem. Pharmacol.* 129 (2017) 96–107.
- [16] M. Karin, The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 16483–16486.
- [17] S. Mergler, M. Skrzypski, M. Sassek, P. Pietrzak, C. Pucci, B. Wiedenmann, M. Strowski, Thermo-sensitive transient receptor potential vanilloid channel-1 regulates intracellular calcium and triggers chromogranin A secretion in pancreatic neuroendocrine BON-1 tumor cells, *Cell. Signal.* 24 (2012) 233–246.
- [18] A. Keim, O.G. Rössler, T.L. Rothhaar, G. Thiel, Arsenite-induced apoptosis of human neuroblastoma cells requires p53 but occurs independently of c-Jun, *Neuroscience* 206 (2012) 25–38.
- [19] O.G. Rössler, G. Thiel, Specificity of stress-responsive transcription factors Nrf2, ATF4, and AP-1, *J. Cell. Biochem.* 118 (2017) 127–140.
- [20] L. Stefano, J. Al Sarraj, O.G. Rössler, C. Vinson, G. Thiel, Up-regulation of tyrosine hydroxylase gene transcription by tetradecanoylphorbol acetate is mediated by the transcription factors Ets-like protein-1 (Elk-1) and Egr-1, *J. Neurochem.* 97 (2006) 92–104.
- [21] I. Bauer, J. Al Sarraj, C. Vinson, R. Larsen, G. Thiel, Interleukin 1 β and tetradecanoylphorbol acetate-induced biosynthesis of tumor necrosis factor α in human hepatoma cells involves the transcription factors ATF2 and c-Jun and stress-activated protein kinases, *J. Cell. Biochem.* 100 (2007) 242–255.
- [22] S.I. Mayer, V. Dexheimer, E. Nishida, S. Kitajima, G. Thiel, Expression of the transcriptional repressor ATF3 in gonadotrophs is regulated by Egr-1, CREB, and ATF2 after gonadotropin-releasing hormone receptor stimulation, *Endocrinology* 149 (2008) 6311–6325.

- [23] A. Keim, I. Müller, G. Thiel, Efficient genetic manipulation of 1321N1 astrocytoma cells using lentiviral gene transfer, *J. Neurosci. Meth.* 206 (2012) 138–142.
- [24] O.G. Rössler, G. Thiel, Regulation of gene transcription following stimulation of Gq α -coupled designer receptors, Thiel Designer receptors exclusively activated by designer drugs, 108 Springer, Humana Press, New York, Neuromethods, 2015, pp. 49–60.
- [25] T. Christoph, A. Grünweller, J. Mika, M.K.H. Schäfer, E.J. Wade, E. Weihe, V.A. Erdmann, R. Frank, C. Gillen, J. Kurreck, Silencing of vanilloid receptor TRPV1 by RNAi reduces neuropathic and visceral pain in vivo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 350 (2006) 238–243.
- [26] O.G. Rössler, I. Henß, G. Thiel, Transcriptional response to muscarinic acetylcholine receptor stimulation: Regulation of Egr-1 biosynthesis by Elk-1, ERK, MKP-1 and calcineurin in carbachol stimulated human neuroblastoma cells, *Arch. Biochem. Biophys.* 470 (2008) 93–102.
- [27] I. Müller, T. Endo, G. Thiel, Regulation of AP-1 activity in glucose-stimulated insulinoma cells, *J. Cell. Biochem.* 110 (2010) 1481–1494.
- [28] G. Thiel, K. Kaufmann, A. Magin, M. Lietz, K. Bach, M. Cramer, The human transcriptional repressor protein NAB1: expression and biological activity, *Biochim. Biophys. Acta* 1493 (2000) 289–301.
- [29] K. Kaufmann, G. Thiel, Epidermal growth factor and thrombin induced proliferation of immortalized human keratinocytes is coupled to the synthesis of Egr-1, a zinc finger transcriptional regulator, *J. Cell. Biochem.* 85 (2002) 381–391.
- [30] D. Spohn, O.G. Rössler, S.E. Philipp, M. Raubuch, S. Kitajima, D. Griesemer, M. Hoth, G. Thiel, Thapsigargin induces expression of activating transcription factor 3 in human keratinocytes involving Ca²⁺ ions and c-Jun N-terminal protein kinase, *Mol. Pharmacol.* 78 (2010) 865–876.
- [31] O.G. Rössler, K.M. Giehl, G. Thiel, Neuroprotection of immortalized hippocampal neurons by brain-derived neurotrophic factor and Raf 1 protein kinase: role of extracellular signal-regulated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase, *J. Neurochem.* 88 (2004) 1240–1252.
- [32] A. Lesch, O.G. Rössler, G. Thiel, Extracellular signal-regulated protein kinase, c-Jun N-terminal protein kinase, and calcineurin regulate transient receptor potential M3 (TRPM3) induced activation of AP-1, *J. Cell. Biochem.* 118 (2017) 2409–2419.
- [33] G. Thiel, O.G. Rössler, Immediate-early transcriptional response to angiotensin II in human adrenocortical cells, *Endocrinology* 152 (2011) 4211–4223.
- [34] G. Thiel, O.G. Rössler, Resveratrol stimulates AP-1-regulated gene transcription, *Mol. Nutr. Food Res.* 58 (2014) 1402–1413.
- [35] A. Kaufmann, A. Keim, G. Thiel, Regulation of immediate-early gene transcription following activation of Gq α -coupled designer receptors, *J. Cell. Biochem.* 114 (2013) 681–696.
- [36] H. Shirakawa, T. Yamaoka, K. Sanpei, H. Sasaoka, T. Nakagawa, S. Kaneko, TRPV1 stimulation triggers apoptotic cell death of rat cortical neurons, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377 (2008) 1211–1215.
- [37] J. Song, J.H. Lee, S.H. Lee, K.A. Park, W.T. Lee, J.E. Lee, TRPV1 activation in primary cortical neurons induces calcium-dependent programmed cell death, *Exp. Neurol.* 22 (2013) 51–57.
- [38] P.S. Shapiro, N.G. Ahn, Feedback regulation of Raf-1 and mitogen-activated protein kinase (MAP) kinase kinase 1 and 2 by MAP kinase phosphatase-1 (MKP-1), *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 1788–1793.
- [39] D.N. Slack, O.M. Seternes, M. Gabrielsen, S.K. Keyse, Distinct binding determinants for ERK2/p38 α and JNK MAP kinases mediate catalytic activation and substrate selectivity of MAP kinase phosphatase-1, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 16491–16500.
- [40] R. Chiu, W.J. Boyle, J. Meek, T. Smeal, T. Hunter, M. Karin, The c-fos protein interacts with c-jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes, *Cell* 54 (1988) 541–552.
- [41] G. Thiel, A. Lesch, A. Keim, Transcriptional response to calcium-sensing receptor stimulation, *Endocrinology* 153 (2012) 4716–4728.
- [42] M.A. Cahill, R. Janknecht, A. Nordheim, Signal uptake by the c-fos serum response element, in: P.A. Baeuerle (Ed.), *Inducible Gene Expression*, 2 Birkhäuser, Boston/Basel/Berlin, 1995, pp. 39–72.
- [43] P.E. Shaw, J. Saxton, Ternary complex factors: prime nuclear targets for mitogen-activated protein kinases, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35 (2003) 1210–1226.
- [44] E. Shaulian, M. Karin, AP-1 as a regulator of cell life and death, *Nat. Cell Biol.* 4 (2002) E131–E136.
- [45] L. Di Petrocellis, V. Di Marzo, Role of endocannabinoids and endovanilloids in Ca²⁺ signaling, *Cell Calcium* 45 (2009) 611–624.
- [46] W.J. Redmond, E.E. Cawston, N.L. Grimsey, J. Stuart, A.R. Edington, M. Glass, M. Connor, Identification of N-arachidonoyl dopamine as a highly biased ligand at cannabinoid CB₁ receptors, *Brit. J. Pharmacol.* 173 (2016) 115–127.
- [47] L. Stefano, O.G. Rössler, D. Griesemer, M. Hoth, G. Thiel, P2X₇ receptor stimulation upregulates Egr-1 biosynthesis involving a cytosolic Ca²⁺ rise, transactivation of the EGF receptor and phosphorylation of ERK and Elk-1, *J. Cell. Physiol.* 213 (2007) 36–44.
- [48] J. Selway, R. Rigatti, N. Storey, J. Lu, G.B. Willars, T.P. Herbert, Evidence that Ca²⁺ within the microdomain of the L-type voltage gated Ca²⁺ channel activates ERK in MIN6 cells in response to glucagon-like peptide-1, *PLoS One* 7 (2012) e33004.
- [49] M. Nakanishi, K. Hata, T. Nagayama, T. Sakurai, T. Nishisho, H. Wakabayashi, T. Hiraga, S. Ebisu, T. Yoneda, Acid activation of Trpv1 leads to an up-regulation of calcitonin gene-related peptide expression in dorsal root ganglion neurons via the CamK-CREB cascade: a potential mechanism of inflammatory pain, *Mol. Biol. Cell* 21 (2010) 2568–2577.

50. Jahrgang August 2020 ISSN 0045-205X BLUZAR D 5627

4 | 2020

VBio

Verband Biologie, Biowissenschaften
& Biomedizin in Deutschland



BIOAKUSTIK
Instrumentallaute
der Vögel



BOTANIK
Frühblüher mit
Nektarheizung



ÖKOLOGIE
Invasiver
Obstschädling

BIOLOGIE

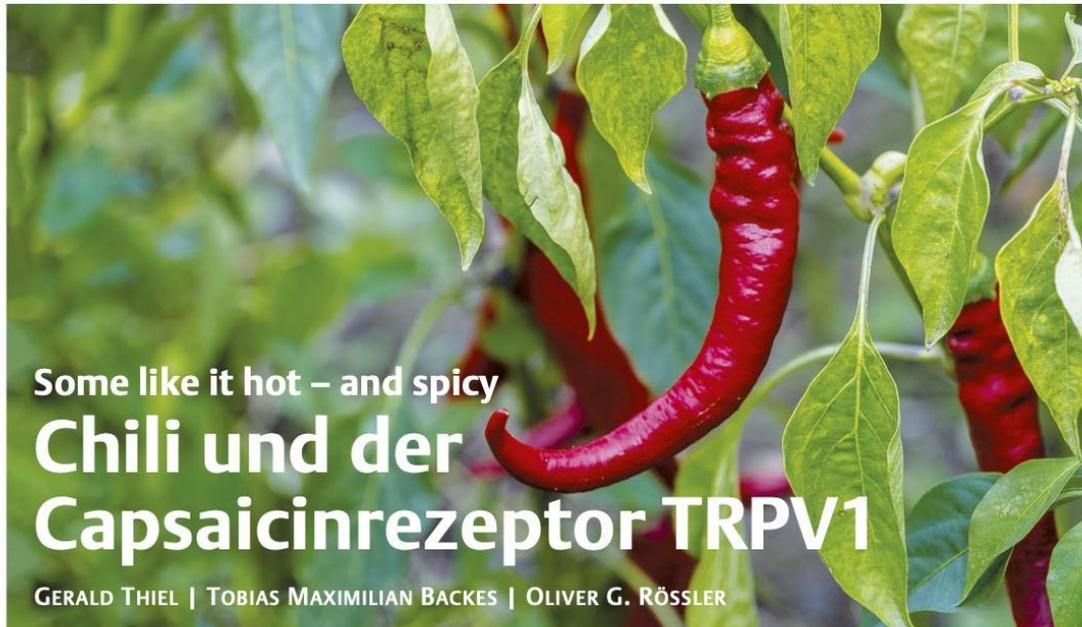
IN UNSERER ZEIT

Scharfmacher
Capsaicinrezeptor



www.biuz.de

WILEY-VCH



Some like it hot – and spicy
**Chili und der
 Capsaicinrezeptor TRPV1**

GERALD THIEL | TOBIAS MAXIMILIAN BACKES | OLIVER G. RÖSSLER

Foto: Lars Nissen auf www.pixabay.com

*Viele haben es schon einmal erlebt oder bei Freunden gesehen: Man isst ein Gericht mit scharfer Soße und schon fängt das Brennen an; die Zunge, der Gaumen und die Lippen brennen, der Puls steigt an. Man beginnt zu schwitzen, es wird einem richtig heiß, der Kopf wird knallrot, man muss Luft holen, und die Tränen beginnen zu fließen. Manchmal kann man gar nicht weiter essen, weil das Essen zu scharf ist. Die Ursache dieser Reaktion ist das Vanilloid Capsaicin (trans-8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamid), das in Chili (*Capsicum annuum*) und in höheren Konzentrationen in Habaneros, der Frucht der Habanero-Pflanze (*Capsicum chinense*) vorkommt (Abbildung 1a, b). Capsaicin bewirkt diese Veränderungen durch Bindung und Stimulation des Capsaicinrezeptors TRPV1. Ein noch stärkerer TRPV1-Aktivator ist das Resiniferatoxin, das aus *Euphorbia resinifera* gewonnen wird (Abbildung 1c, d).*

Die mit einem grünen Pfeil markierten Begriffe werden im Glossar auf Seite 251 erklärt.

Der TRPV1-Kanal ist ein polymodaler Integrator verschiedener chemischer und thermischer Signale, der die Erregbarkeit von Nervenzellen, die schädliche mechanische, chemische und thermische Reize detektieren (Nozizeptoren), nach Gewebsverletzung und Entzündung moduliert. Die Primärstruktur des Capsaicinrezeptors wurde 1997 durch die Methode des Expressionsklonierens aufgeklärt [1]. Es stellte sich heraus, dass der Rezeptor zur Familie der »TRP- („transient receptor potential“)-Ionenkanalproteine gehört, so dass er in TRPV1 umbenannt wurde. TRP-Kanäle sind nicht-selektive Kationenkanäle, die alle einen ähnlichen modularen Aufbau aufweisen (Abbildung 2). TRPV1 besitzt sechs Transmembrandomänen, wobei die Kanalpore von den Transmembrandomänen 5 und 6 gebildet wird. Im N-terminalen Bereich finden sich sogenannte „Ankyrin-Repeats“, während C-terminal von der 6. Transmembrandomäne eine sog. „TRP-Box“ identifiziert wurde, die es auch in anderen TRP-Kanälen gibt. Die „Ankyrin-Repeats“ und die TRP-Box binden Proteine wie Calmodulin oder Phospholipide, die die TRPV1-Kanalfunktion modulieren [2].

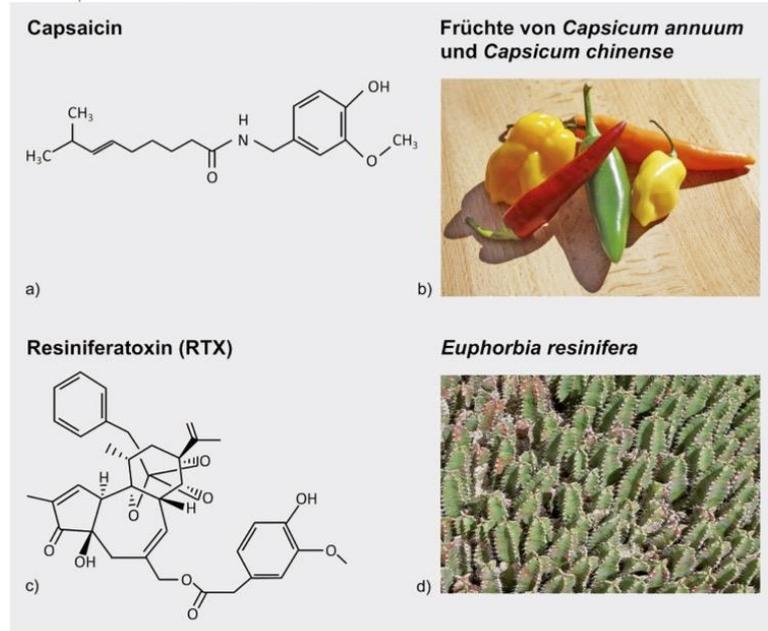
Capsaicin aktiviert den TRPV1-Kanal, so dass Ca^{2+} -Ionen von außen in die Zelle strömen können. Interessanterweise ist der TRPV1-Kanal der Vögel nicht durch Capsaicin stimulierbar. Ein Vergleich der Primärstrukturen des TRPV1-Proteins von Säugetieren und Vögeln zeigt, dass die Capsaicinbindungsstelle auf der cytoplasmatischen

Schleife zwischen den Transmembrandomänen 2 und 3 zu finden ist, und die Aminosäuren Y511 und S512 involviert sind [3]. TRPV1 wird auch durch erhöhte Temperaturen aktiviert, so dass Temperaturänderungen der Umgebung durch TRPV1 detektiert und in sensorische Nervenimpulse umgewandelt werden können [1]. In der englischen Sprache gibt es für „scharf“ und „heiß“ nur das gemeinsame Wort „hot“. Chili heißt demnach „hot chilli pepper“, während man im Deutschen „scharfe Chilischoten“ dazu sagt. TRPV1 stellt das Detektionssystem für beide Reize dar, ohne dass zwischen scharf und heiß unterschieden wird. Der Genuss einer scharfen Chilischote löst daher auch ein brennendes Hitzegefühl aus. Die Aktivität der TRPV1-Kanäle wird durch Protonen beeinflusst, die als Folge von Gewebsverletzungen und Entzündungen freigesetzt werden. Protonen modulieren die Funktion des TRPV1-Kanals, indem sie dessen Sensitivität gegenüber Hitze, Capsaicin und Entzündungsmediatoren deutlich steigern [4]. Bei einem pH-Wert von 6,3 öffnet sich der Kanal schon bei einer Temperatur von 35° C, bei der er normalerweise geschlossen wäre. Die Protonen wirken auf den extrazellulären Teil des TRPV1-Kanals. Die Analyse verschiedener TRPV1-Mutanten zeigte, dass die Protonensensitivität zwischen den Transmembrandomänen 5 und 6 lokalisiert ist. Die Aminosäure E600 ist für die Protonen-induzierte Sensitivierung notwendig. Die TRPV1-Aktivität wird auch durch verschiedene Toxine von Spinnen, Tausendfüßlern, Skorpionen und Schnecken aktiviert. Das Toxin der Vogelspinne *Ornithoctonus huwena* (double-knot toxin, DkTx) bindet an die Pore des TRPV1-Kanals und arretiert diesen irreversibel in der offenen Konfiguration [5]. Ein Biss der Spinne ist normalerweise nicht tödlich, induziert jedoch einen starken Schmerzreiz und eine Entzündung, d. h. Folgen, die sehr gut mit einer Aktivierung des TRPV1-Kanals korrelieren. Endogene TRPV1-Liganden sind Lipide wie *N*-Arachidonylethanolamin, *N*-Arachidonoyldopamin, *N*-Oleoyldopamin und das Leukotrien B4 [2]. Diese Verbindungen sind jedoch nicht TRPV1-spezifisch. Die Wirkungsweise der endogenen Liganden ist, wie bei vielen anderen TRP-Kanälen, nicht im Detail bekannt.

Signaltransduktion von TRPV1

Die Stimulation der TRP-Kanalproteine löst eine intrazelluläre Signalkaskade aus, die letztlich zu einer Änderung

ABB. 1 | AKTIVATOREN DES TRPV1-KANALS

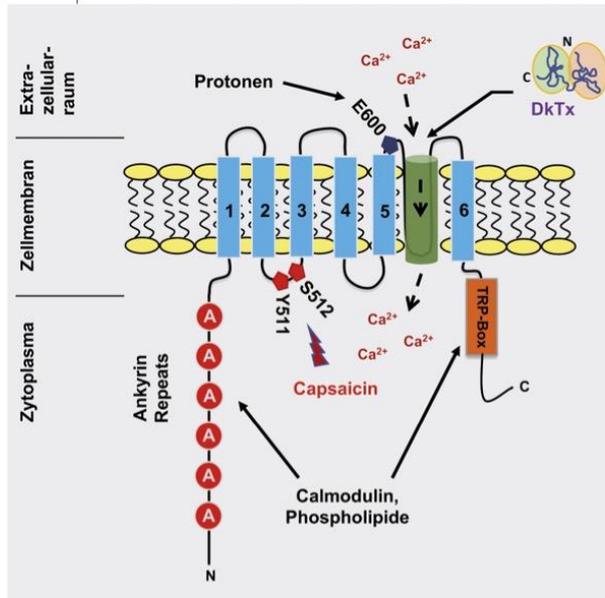


Chemische Struktur von Capsaicin und Resiniferatoxin, die aus den Pflanzen *Capsicum annuum* und *Euphorbia resinifera* isoliert wurden. Foto 1d: F. Vincentz, CC BY-SA 3.0.

IN KÜRZE

- Die TRP- („transient receptor potential“)-Kanalproteine sind **nicht-selektive Kationenkanäle**, die viele verschiedene biologische Funktionen wahrnehmen, wie beispielsweise die Thermo- und Osmoregulation, die Geruchswahrnehmung, die Neurotransmission und die Genregulation.
- Der Capsaicin-Rezeptor TRPV1 ist der **Rezeptor für die Chilissubstanz Capsaicin**, die nach Verzehr von Chili das Gefühl von Brennen und Schärfe vermittelt.
- Der TRPV1-Kanal wird auch durch Hitze, Protonen und verschiedene Toxine von Tieren aktiviert und stellt daher **einen polymodalen Sensor** für unterschiedliche schädliche Reize dar.
- Die Aktivierung des TRPV1-Kanals induziert eine **intrazelluläre Signalkaskade**, die zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT, AP-1 und CREB führt.
- Der TRPV1-Kanal wird in sensorischen Nervenzellen exprimiert und dient als Sensor für **schädliche chemische oder thermische Stimuli**, die in Nervenimpulse umgewandelt werden und zur Empfindung von Schmerzen führen.
- Medizinisch kann eine pharmakologische Beeinflussung der TRPV1-Aktivität dazu benutzt werden, **Schmerzen zu lindern**.

ABB. 2 | MODULÄRE STRUKTUR DES CAPSAICINREZEPTORS TRPV1



TRPV1 besitzt sechs Transmembrandomänen. Die Pore befindet sich zwischen der 5. und 6. Transmembrandomäne. Capsaicin bindet als lipophiles Molekül an eine intrazelluläre Bindungsstelle des TRPV1-Kanals. Protonen beeinflussen die TRPV1-Aktivität durch Interaktion mit extrazellulären Bindungsstellen zwischen der 5. und 6. Transmembrandomäne. Das Vogelspinnengift DkTx bindet an die Ionenpore und verändert irreversibel die Konformation des Kanals.

der Genexpression führt [6]. TRPV1-Kanäle besitzen eine hohe Permeabilität für Ca^{2+} -Ionen und dienen als Ca^{2+} -permeable Kationenkanäle [1, 2]. Die Stimulation des TRPV1-Kanals führt zu einem Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Zelle. Die nachfolgende Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Ionenkonzentration führt zur Aktivierung der Proteinkinase C, der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase und der „extracellular signal-regulated protein kinase“ ERK1/2. Die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase CaMKIV und die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen können in den Zellkern translozieren und genregulatorische Proteine phosphorylieren und aktivieren. Als Folge wird das zelluläre Expressionsmuster verändert. Abbildung 3 zeigt, dass die Stimulation des TRPV1-Kanals in sensorischen Nervenzellen die Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB induziert. CREB kann direkt über CaMKIV, und indirekt über die Proteinkinase ERK1/2 aktiviert werden. CREB bindet an die regulatorische Region des Calcitoninogens und bewirkt eine verstärkte Expression des „Calcitonin Gene-Related Peptide“ (CGRP) [7], eines Neuropeptids, das als starker Vasodilatator wirkt und mit einem Schmerzempfinden korreliert ist. Die Stimulation des

TRPV1-Kanals aktiviert, vermittelt durch die Aktivierung und Kerntranslokation der Proteinkinase ERK1/2, die Transkriptionsfaktoren c-Jun und c-Fos, die zusammen den AP-1-Transkriptionsfaktorkomplex bilden [8]. Die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach Stimulation der TRPV1-Kanalproteine aktiviert darüber hinaus die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin, die im Cytoplasma den Transkriptionsfaktor NFAT dephosphoryliert. Das dephosphorylierte NFAT-Protein transloziert anschließend in den Zellkern und aktiviert NFAT-responsive Gene.

Biologische Funktionen von TRPV1

TRPV1-Kanäle werden im peripheren Nervensystem in sensorischen Nervenzellen exprimiert. Außerhalb des Nervensystems findet man TRPV1-Kanäle in der Niere und im Gastrointestinaltrakt. TRPV1 spielt in primären sensorischen Nervenzellen die Rolle eines Thermosensors, der durch erhöhte Temperatur (Aktivierungsschwelle $> 42\text{ }^{\circ}\text{C}$) aktiviert wird [1]. TRPV1-Kanäle wandeln daher den Temperaturanstieg in sensorische Nervenimpulse um. Die Aktivierungsschwelle des TRPV1-Kanals kann nach Gewebsverletzungen oder Entzündungen deutlich gesenkt werden. TRPV1-Kanäle sind daher bei dem Schmerzempfinden nach Gewebsentzündungen involviert, bei der Temperaturen unter $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ ein Schmerzempfinden auslösen können. Capsaicin-sensitive sensorische Nervenzellen sind pseudounipolare Nervenzellen, deren Perikaryon (Zellkörper) sich in den Ganglien befinden und deren Axon sich in zwei Äste aufteilt. Das periphere Axon innerviert u. a. die Haut und die Muskeln, und erhält von dort stimulierende Reize. Das zentrale Axon verbindet sensorische Nervenzellen mit dem Rückenmark und stellt dadurch die Verbindung zum Zentralnervensystem her (Abbildung 4). Bei chronischen Schmerzen bewirkt die Aktivierung der TRPV1-Kanalproteine in den »nozizeptiven sensorischen Nervenzellen die Sekretion des Neurotransmitters Glutamat von den Synapsen des zentralen Axons und proinflammatorischer Neuropeptide wie »Substance P« und »Calcitonin Gene-Related Peptide« (CGRP) von den Synapsen der peripheren Axone. Die Glutamat-induzierten Aktionspotentiale werden in höheren Gehirnmarealen als brennender Schmerz wahrgenommen, der von einer Überempfindlichkeit gegenüber höheren Temperaturen begleitet sein kann. Die Neuropeptide »Substance P« und »Calcitonin Gene-Related Peptide« lösen eine biochemische Kaskade aus, die durch die Aktivierung des unspezifischen Immunsystems zu einer »neurogenen Entzündung führt. TRPV1 spielt eine wichtige Rolle bei einer Schmerzhypersensitivität, die man bei chronischen Schmerzpatienten findet [9, 10]. Auch im Gastrointestinaltrakt ist die Stimulation der TRPV-Kanäle mit einer Schmerzempfindung verbunden, die von einer Entzündung begleitet wird [11]. Experimente mit TRPV1-Antagonisten zeigen, dass die TRPV1-Kanalproteine für die Aufrechterhaltung der Körpertemperatur wichtig sind. Neuere Untersuchungen mit

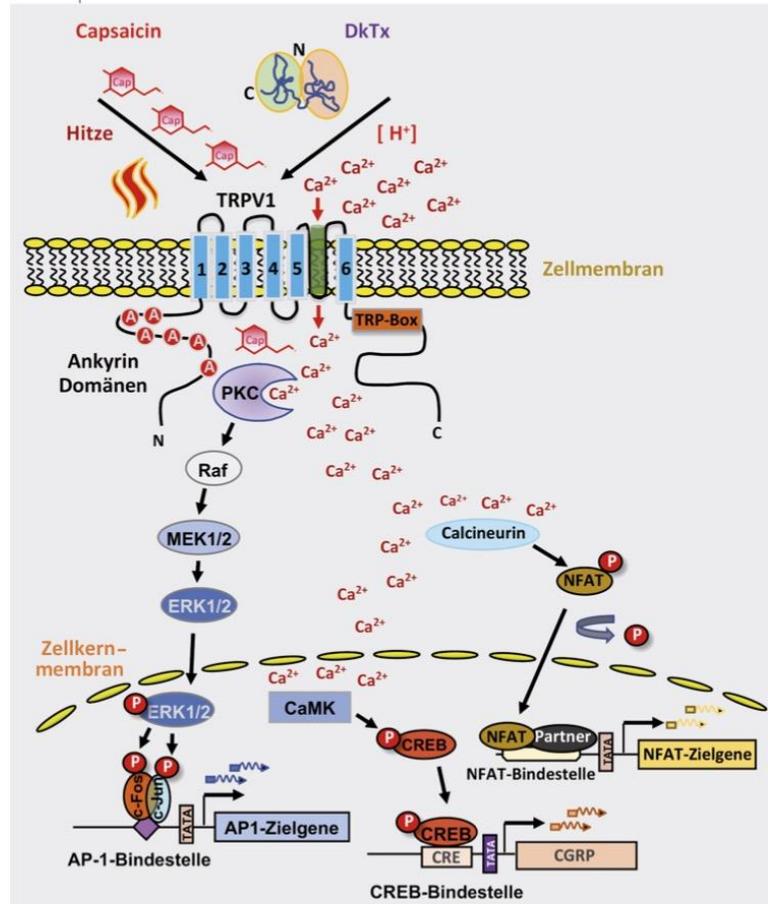
transgenen Mäusen ergaben, dass zusätzlich zu TRPV1 die TRP-Kanalproteine TRPM3 und TRPA1 für die Schmerzempfindung notwendig sind [12].

Capsaicin und sein Rezeptor in der Schmerztherapie

Die Tatsache, dass die TRPV1-Stimulation in sensorischen Nervenzellen zur Empfindung von Schmerz führen kann, ist die Grundlage für das Konzept, die TRPV1-Aktivität medikamentös zu beeinflussen, um Schmerzen zu lindern [13, 14]. Die ersten Versuche mit Mäusen zeigten, dass Inhibitoren des TRPV1-Kanals eine Schmerzüberempfindlichkeit (Hyperalgesie) als Folge einer Entzündung oder Neuropathie reduzieren können. Diese Daten bestätigen die Verbindung zwischen TRPV1-Aktivierung und der Schmerzempfindung. Die Verabreichung von TRPV1-Inhibitoren hatte jedoch einige Nebenwirkungen, z.B. eine unphysiologische Überwärmung des Körpers (Hyperthermie). Ebenso unerwünscht war der Verlust des Wärme/Hitze-Gefühls, der zu Verbrennungen führen kann. Neue TRPV1-Inhibitoren wurden daraufhin generiert und getestet, um die hyperthermische Wirkung von TRPV1 von der schmerzlindernden (analgetischen) Wirkung zu trennen. In Tierversuchen wurde gezeigt, dass diese TRPV1-Inhibitoren tatsächlich eine erwünschte analgetische Wirkung zeigten, ohne die hyperthermischen Nebenwirkungen auszulösen.

Eine der ersten Beobachtungen zur Funktion des TRPV1-Kanals bestand darin, dass Capsaicin als exzitatorisches (erregendes) Neurotoxin wirken kann, welches TRPV1-exprimierende Nervenzellen ab einer gewissen Konzentration desensitiviert oder sogar abtötet [1]. Diese Eigenschaft von Capsaicin kann therapeutisch eingesetzt werden [15]. Capsaicin bewirkt zuerst eine neuronale Erregung, auf die eine längere Refraktärperiode folgt. Während dieser Zeit reagieren die vorher erregten Nervenzellen nicht mehr auf schädliche mechanische, thermische oder chemische Reize. Dieser Vorgang wird als „Capsaicin-Desensitivierung“ bezeichnet. Die

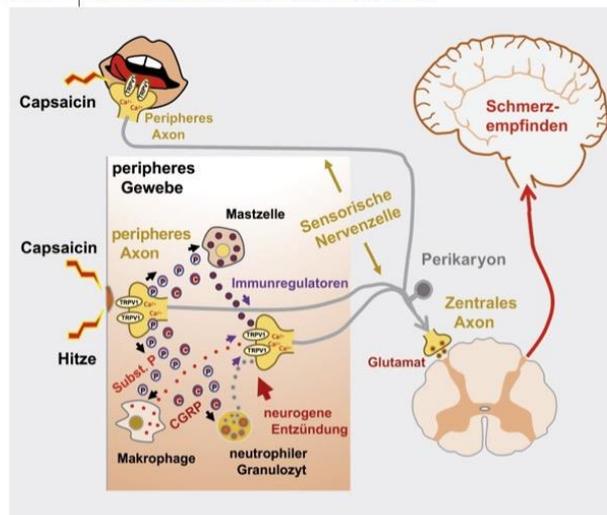
ABB. 3 | TRPV1-INDUZIERTE SIGNALKASKADE



Die Stimulation des TRPV1 Kanals bewirkt einen Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Zelle, die daraufhin Ca^{2+} - und Calmodulin-abhängige Proteinkinasen (CaM-Kinasen) und die Ca^{2+} - und Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin aktivieren. Die Ca^{2+} - und Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen (CaMK) phosphorylieren den Transkriptionsfaktor CREB, der daraufhin die Transkription solcher Gene stimuliert, die ein „cAMP response element“ (CRE) in ihren regulatorischen Regionen besitzen. Dies trifft beispielsweise für das Gen zu, das für das „Calcitonin Gene-Related Peptide“ (CGRP) kodiert. Die Proteinphosphatase Calcineurin katalysiert die Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors NFAT, der in der dephosphorylierten Form in den Zellkern transloziert und die Transkription NFAT-regulierter Gene fördert. Der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen durch den TRPV1-Kanal aktiviert die Ca^{2+} - und Lipid-abhängige Proteinkinase C, die über die Aktivierung der Proteinkinasen Raf und MEK1/2 eine Aktivierung der „extracellular signal-regulated protein kinase“ (ERK1/2) auslöst. ERK1/2 transloziert in den Zellkern und aktiviert die Transkriptionsfaktoren c-Fos und c-Jun, die zusammen den AP-1-Transkriptionsfaktor bilden.

zeitlich begrenzte Inaktivierung bzw. der Verlust TRPV1-exprimierender sensorischer Nervenzellen unterbricht die Signalweiterleitung und somit die Übertragung der „Schmerz“-Information zum Gehirn. Capsaicin-enthalten

ABB. 4 | BIOLOGISCHE FUNKTIONEN VON TRPV1



TRPV1-exprimierende sensorische Nervenzellen (Nozizeptoren) induzieren Schmerz und lösen eine neurogene Entzündung aus. Primäre sensorische Nervenzellen sind pseudounipolare Nervenzellen des peripheren Nervensystems, deren Perikaryen in den Ganglien lokalisiert sind. Die Nervenzellen werden durch schädliche (mechanische, chemische oder thermische) Stimuli aktiviert, die von Noziseptoren detektiert werden. Die TRPV1-Kanäle fungieren als Noziseptoren, um schädlichen Reize zu detektieren. Die Reize werden in Nervenimpulse übersetzt, die über Neurone des Rückenmarks das Gehirn erreichen und als Schmerz wahrgenommen werden. Inflammatorische Peptide wie Substance P und CGRP werden von den Synapsen der peripheren Axone freigesetzt und aktivieren Zellen des Immunsystems (Makrophagen, Mastzellen, neutrophile Granulozyten). Diese Zellen sezernieren eine ganze Reihe von Immunmediatoren (auch als „inflammatory soup“ bezeichnet), die letztlich eine neurogene Entzündung auslösen. Die Tatsache, dass Capsaicin sowohl eine Schmerzempfindung induziert als auch eine neurogene Entzündung auslösen kann, zeigt, dass der TRPV1-Kanal bei beiden Reaktionen eine zentrale Rolle einnimmt.

de Medikamente, Cremes oder Pflaster kommen daher bei chronischen Schmerzpatienten zur Anwendung, die z. B. an einer ▶ diabetischen Neuropathie, einer ▶ HIV-Polyneuropathie oder einer ▶ Post-Zoster-Neuralgie leiden. Capsaicin-haltige „Wärmepflaster“ helfen bei Zerrungen oder Rheuma. Injektionen von Resiniferatoxin wurden bei Krebspatienten als „molekulares Skalpel“ eingesetzt, um eine andauernde Schmerzlinderung (Analgesia) zu erzielen. Die selektive Abtötung TRPV1-exprimierender Nervenzellen ist als „molekulare Neurochirurgie“ beschrieben worden.

Warum lieben wir Scharfes?

Die *Capsicum annum*-Pflanzen synthetisieren Capsaicin als Schutzmaßnahme, um Säugetiere davon abzuhalten, ihre Früchte zu fressen. Nur Vögel, deren TRPV1-Kanal nicht durch Capsaicin stimuliert wird, können Capsaicin-

haltige Früchte zu sich nehmen und sorgen damit für die Verbreitung der Samen. Vogelfutter wird in einigen Ländern mit Capsaicin versetzt, um zu verhindern, dass Eichhörnchen davon fressen. Capsaicin ist auch der Hauptbestandteil des Pfeffersprays, das damit kein Pfeffer, sondern ein Capsaicinspray ist. Das Bundesinstitut für Risikobewertung betrachtet in einer Stellungnahme vom 18.11.2011 die Exposition von maximal 5 mg Capsaicin/kg Körpergewicht für Erwachsene als akzeptabel. Die Aufnahme höherer Konzentrationen von Capsaicin kann ernsthafte gesundheitliche Beeinträchtigungen zur Folge haben wie beispielsweise Erbrechen, Bluthochdruck und Übelkeit. Die Frage ist: Warum würzen Menschen in vielen Ländern, insbesondere in Mexiko, Indien und Thailand seit vielen hundert Jahren ihre Nahrung mit Capsaicin-haltigen Saucen? Ursprünglich stammt die scharfe Paprika aus Mittel- und Südamerika und wurde erst im 16. Jahrhundert nach Europa und später nach Asien gebracht. Heute konsumieren viele Millionen Menschen täglich Capsaicin-haltige Paprika oder ähnliche Speisen.

Es gibt zu dieser Frage verschiedene Antworten, die mehr oder weniger schlüssig sind. Diese Hypothesen postulieren u. a. einen antimikrobiellen, konservierenden Effekt von Capsaicin, einen möglicherweise kühlenden Effekt von Capsaicin-haltigen Speisen oder eine Freisetzung von Endorphinen im Gehirn nach dem Genuss von Chilischoten, die ein Wohlfühl auslösen. Letztlich sind alle Erklärungen mehr oder weniger unlogisch. Der Verzehr Capsaicin-haltiger Gerichte stellt unseres Erachtens eher ein kulturelles Phänomen dar, nach dem sich in einigen Ländern Capsaicin-haltige Saucen als ein bevorzugter Geschmack etabliert haben. Der Verzehr Capsaicin-enthaltender Speisen bewirkt einen gewünschten dosierten Schmerz (ein „schönes“ Brennen im Mund), der von vielen Menschen als angenehm empfunden wird. Ebenso lieben viele Menschen in Japan das leichte Kribbeln im Mundraum, wenn sie Kugelfisch (Fugu) essen, der das Neurotoxin Tetrodotoxin enthält.

Zusammenfassung

Seit hunderten von Jahren essen die Menschen scharfe Chilischoten, obwohl diese das Toxin Capsaicin enthalten. Diese Substanz bindet und aktiviert den TRPV1-Kationenkanal, der vor allem in sensorischen Nervenzellen exprimiert wird. Zusätzlich wird der TRPV1-Kanal durch Hitze, Protonen und verschiedene Toxine von Tieren aktiviert. Er dient daher als ein polymodaler Noziseptor für unterschiedliche schädliche Reize. Dafür wandelt er schädliche chemische oder thermische Stimuli in Nervenimpulse um. Die Blockade des TRPV1-Kanals kann daher die Schmerzempfindung vermindern bzw. unterbinden. Die Überaktivierung des TRPV1-Kanals kann das schmerzdetektierende System für eine Zeitlang unterbrechen bzw. bei höherer Konzentration des TRPV1-Aktivators die sensorischen Nervenzellen zerstören. Eine überzeugende Erklärung für die Vorliebe vieler Menschen für scharfe Speisen gibt es bisher nicht.

Summary**Some like it hot – and spicy: Chili and the capsaicin receptor TRPV1**

Since many hundred years, many people like to eat chili pepper containing the pungent ingredient capsaicin that is responsible for making the food hot and spicy. Capsaicin activates transient receptor potential TRPV1 channels that are predominantly expressed in sensory neurons involved in pain sensation. TRPV1 is a noxious heat sensor and can also

be activated by protons and several animal toxins. Thus, TRPV1 is a polymodal sensor of multiple noxious stimuli that cause pain. TRPV1 functions as a nociceptor that detects chemical and thermal stimuli and transduces this stimulation into sensory nerve impulses which leads to the perception of pain. Inhibition of TRPV1 reduces or abolishes pain sensation. A strong activation of TRPV1 induces a long-lasting refractory period of the pain-detecting system (desensitization) and may even lead to an irreversible loss of TRPV1-expressing sensory neurons. It still remains unclear why many people love hot and spicy food, accompanied by a burning sensation in the mouth.

GLOSSAR

CGRP: Das „Calcitonin Gene-Related Peptide“ ist ein Neuropeptid von 37 Aminosäuren, das als starker Vasodilatator zur Erweiterung der Blutgefäße führt. CGRP wird hauptsächlich von sensorischen Nervenendigungen freigesetzt und ist ein Bestandteil der Schmerzsensorik des Körpers. Seit kurzem wird ein Antikörper gegen CGRP eingesetzt, um die Schmerzattacken bei Migränepatienten zu reduzieren.

Diabetische Neuropathie: Nervenschäden aufgrund einer Diabetes mellitus-Erkrankung.

HIV-Polyneuropathie: Neurologische Erkrankung aufgrund einer HIV-Infektion.

Neuralgie: Neuropathischer Schmerz, brennend, stechend, oder dumpf, der durch eine Reizung oder Schädigung von Nervenzellen ausgelöst wird.

Neurogene Entzündung: Eine Entzündung, die auf der lokalen Freisetzung der Entzündungsmediatoren CGRP und Substance P beruht.

Nozizeption: Wahrnehmung von Schmerzen.

Nozizeptoren: Nervenzellen zur Detektion von gefährlichen mechanischen, chemischen und thermischen Reizen. Spezialisierte sensorische Nervenzellen des Rückenmarks detektieren diese Reize und wandeln sie in Nervenimpulse um, die über das Rückenmark zum Zentralnervensystem geleitet werden. Dort werden die Reize als „Schmerz“ wahrgenommen.

Post-Zoster-Neuralgie: Starke, anhaltende Nervenschmerzen als Folge einer Gürtelrose. Die Nervenzellen sind mit dem Varizella-Zoster-Virus infiziert.

Substance P: Ein Neuropeptid aus elf Aminosäuren, das den Neurokinin-1-Rezeptor aktiviert. Die Hemmung dieses Rezeptors konnte bei Nagetieren die nozizeptiven Antworten nach Nervenverletzungen oder Entzündungen unterdrücken. Antagonisten des Neurokinin-1-Rezeptors werden als potentiell schmerzlindernde Medikamente diskutiert. Bereits zugelassen sind Neurokinin-1-Rezeptor-Antagonisten als Antiemetikum, d. h. sie vermindern die akute und verzögerte Übelkeit und das Erbrechen nach einer Chemotherapie.

TRP: TRP („Transient receptor potential“)-Kanalproteine sind nicht-selektive Kationenkanäle, die einen ähnlichen modulären Aufbau besitzen, jedoch geringe Homologie untereinander aufweisen. Beim Menschen gibt es 28 TRP-Kanalproteine, die entweder selektiv für Ca²⁺- und Na⁺-Ionen oder für eines dieser Ionen sind. Viele verschiedene biologische Funktionen werden durch TRP-Kanäle reguliert, beispielsweise die Thermo- und Osmoregulation, die Geruchswahrnehmung, die Neurotransmission und die Genregulation. Einige TRP-Kanäle reagieren auf eine erhöhte oder erniedrigte Temperatur und werden deshalb als Thermo-TRPs bezeichnet.

Schlagworte

TRPV1, Schmerzdetektion, sensorische Nervenzellen, Chili

Literatur

- [1] M. J. Caterina, M.A. Schumacher, M. Tominago, T. A. Rosen, J. D. Levine, J. D., D. Julius, The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway, *Nature*, 1997, 389, 816.
- [2] S. Bevan, T. Quallo, D. A. Andersson, TRPV1, in *Mammalian transient receptor potential (TRP) cation channels* (Hrsg. B. Nilius B, V. Flockerzi), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Handbook of Exp. Pharmacol., 2014, 222, 207.
- [3] S.-E. Jordt, D. Julius, Molecular basis for species-specific sensitivity to “hot” chili peppers. *Cell*, 2002, 108, 421.
- [4] M. Tominaga, M. J. Caterina, A. B. Malmberg, T. A. Rosen, H. Gilbert, K. Skinner, B. E. Raumann, A. J. Basbaum, D. Julius, The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli, *Neuron*, 1998, 21, 531.
- [5] C. J. Bohlen, A. Priel, S. Zhou, D. King, J. Siemens, D. Julius, A bivalent tarantula toxin activates the capsaicin receptor, TRPV1, by targeting the outer pore domain, *Cell*, 2010, 141, 834.
- [6] G. Thiel, A. Lesch, S. Rubil, T. M. Backes, O. G. Rössler, Regulation of gene transcription following stimulation of transient receptor potential (TRP) channels, *Int Rev Cell Mol Biol*, 2018, 335, 167.
- [7] M. Nakanishi, K. Hata, T. Nagayama, T. Sakurai, T. Nishisho, H. Wakabayashi, T. Hiraga, S. Ebisu, T. Yoneda, Acid activation of Trpv1 leads to an up-regulation of calcitonin gene-related peptide expression in dorsal root ganglion neurons via the CamK-CREB cascade: A potential mechanism of inflammatory pain, *Mol Biol Cell*, 2010, 21, 2568.
- [8] T. M. Backes, O. G. Rössler, X. Hui, C. Grötzinger, P. Lipp, G. Thiel, Stimulation of TRPV1 channels activates the AP-1 transcription factor, *Biochem Pharmacol*, 2018, 150, 160.
- [9] A. I. Basbaum, D. M. Bautista, G. Scherrer, D. Julius, Cellular and molecular mechanisms of pain, *Cell*, 2009, 139, 267.
- [10] J. Vriens, B. Nilius, T. Voets, Peripheral thermosensation in mammals, *Nature Rev*, 2014, 15, 573.
- [11] R. J. Laing, A. Dhaka, (2016). ThermoTRP and pain. *The Neuroscientist* 22, 171.
- [12] I. Vandewauw, K. De Clerq, M. Mulier, K. Held, S. Pinto, N. Van Ranst, A. Segal, T. Voet, R. Vennekens, K. Zimmermann, J. Vriens, T. Voets, A TRP channel trio mediates acute noxious heat sensing, *Nature*, 2018, 555, 662.
- [13] J. Sousa-Valente, A. P. Andreou, L. Urban, I. Nagy, Transient receptor potential ion channels in primary sensory neurons as targets for novel analgesics, *Brit J Pharmacol*, 2014, 171, 2508.
- [14] M. M. Moran, A. Szallasi, A. Targeting nociceptive transient receptor potential channels to treat chronic pain: current state of the field, *Brit J Pharmacol*, 2018, 175, 2185.
- [15] M.-K. Chung, J. N. Campbell, Use of capsaicin to treat pain: Mechanistic and therapeutic considerations, *Pharmaceuticals*, 2016, 9, 66.

Die Autoren:



Prof. Dr. Gerald Thiel studierte Biologie, Chemie und Politik an der Universität Göttingen. Nach dem Diplom Promotion in der Abteilung Klinische Biochemie bei Prof. Söling. Von 1987–1990 Postdoktorand an der Rockefeller University, New York, im Labor von Paul Greengard und an der University of Texas im Labor von Thomas Südhof. Von 1991–1992 Assistant Professor for Molecular and Cellular Neuroscience an der Rockefeller University, New York. Von 1992–1997 Gruppenleiter und „Bayer International Investigator“ am Institut für Genetik der Universität zu Köln. 1995 Habilitation in Genetik. Seit 1997 Professor für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie an der Universität des Saarlandes. Forschungsschwerpunkte: Signaltransduktion, Rezeptoren, TRP-Kanäle, Transkriptionsfaktoren, Transkriptionsregulation in pankreatischen β -Zellen.



Dr. Oliver G. Rössler studierte Biologie an der Universität Konstanz mit dem Schwerpunkt Genetik und Biochemie. Nach Forschungsaufenthalten am Max-Planck-Institut für Terrestrische Mikrobiologie in Marburg/Lahn und an der Universität Konstanz erfolgte die Promotion an der Universität des Saarlandes, Fachrichtung Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, bei Prof. Hans Stahl. Seit Januar 2000 bis heute: wissenschaftlicher Assistent bei Prof. Gerald Thiel in der Medizinischen Biochemie und Molekularbiologie an der Universität des Saarlandes. Forschungsschwerpunkte: Funktion der Transkriptionsfaktoren Egr-1 und Elk-1 in den β -Zellen des Pankreas, Signaltransduktion, Genexpression, TRP-Ionenkanäle.



Tobias Maximilian Backes begann 2009 sein Studium der Human- und Molekularbiologie an der Universität des Saarlandes. Seine Bachelorarbeit fertigte er in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Manfred Schmitt im Bereich der Molekular- und Zellbiologie an. Das Masterstudium schloss er 2014 im Bereich der Medizinischen Biochemie und Molekularbiologie mit der Erforschung des TRPV1-Kanals in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Gerald Thiel ab. Im gleichen Jahr begann er mit der Arbeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter im selben Fachbereich an der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes. Aktuell befindet er sich in der Endphase seiner Doktorarbeit. Forschungsschwerpunkte: Genexpressionsregulation im Zusammenhang mit TRP-Kanälen und β -Zellen.

Korrespondenz

Prof. Gerald Thiel
 Fachrichtung Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
 Universität des Saarlandes
 Medizinische Fakultät, Gebäude 44
 D-66421 Homburg/Saar
 E-mail: gerald.thiel@uks.eu



Contents lists available at ScienceDirect

Pharmacological Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yphrs

Ternary complex factor regulates pancreatic islet size and blood glucose homeostasis in transgenic mice

Andrea Lesch^{a,1}, Tobias M. Backes^{a,1,2}, Daniel S. Langfermann^{a,1}, Oliver G. Rössler^{a,1}, Matthias W. Laschke^b, Gerald Thiel^{a,*}

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

^b Institute for Clinical and Experimental Surgery, Saarland University, D-66421, Homburg, Germany



ARTICLE INFO

Chemical compounds studied in this article:
 D-glucose, PubChem CID: 107526
 Doxycycline hyclat, PubChem CID: 54686183
 FPL 64176, PubChem CID: 3423
 4-Hydroxytamoxifen, PubChem CID: 449459
 KCl, PubChem CID: 4873
 Sucrose, PubChem CID: 5988

Keywords:

Islet size
 Glucose tolerance
 Elk-1, morphometry, caspase-3

ABSTRACT

A hallmark of diabetes mellitus is the inability of pancreatic β -cells to secrete sufficient amounts of insulin for maintaining normoglycemia. The formation of smaller islets may underlie the development of a diabetic phenotype, as a decreased β -cell mass will produce an insufficient amount of insulin. For a pharmacological intervention it is crucial to identify the proteins determining β -cell mass. Here, we identified the ternary complex factor (TCF) Elk-1 as a regulator of the size of pancreatic islets. Elk-1 mediates, together with a dimer of the serum-response factor (SRF), serum response element-regulated gene transcription. Elk-1 is activated in glucose-treated pancreatic β -cells but the biological functions of this protein in β -cells are so far unknown. Elk-1 and homologous TCF proteins are expressed in islets and insulinoma cells. Gene targeting experiments revealed that the TCF proteins show redundant activities. To solve the problem of functional redundancy of these homologous proteins, we generated conditional transgenic mice expressing a dominant-negative mutant of Elk-1 in pancreatic β -cells. The mutant competes with the wild-type TCFs for DNA and SRF-binding. Expression of the Elk-1 mutant in pancreatic β -cells resulted in the generation of significantly smaller islets and increased caspase-3 activity, indicating that apoptosis was responsible for the reduction of the pancreatic islet size. Glucose tolerance tests revealed that transgenic mice expressing the dominant-negative mutant of Elk-1 in pancreatic β -cells displayed impaired glucose tolerance. Thus, we show here for the first time that TCF controls important functions of pancreatic β -cells *in vivo*. Elk-1 may be considered as a new therapeutic target for the treatment of diabetes.

1. Introduction

Diabetes mellitus is a heterologous disease influenced by genetic and environmental factors. An impairment of the major β -cell function, the biosynthesis and secretion of insulin contributes to the pathogenesis of this disease. An inadequate mass of β -cells is one determinant underlying the development of a diabetic phenotype, because a reduced number of β -cells secrete insufficient amounts of insulin. Autopsy studies revealed that type 2 patients have a significant reduction in β -cell mass [1]. Likewise, an analysis of Japanese type II diabetic patients showed a significant reduction of total β -cell mass [2]. A recent study addressing the transcriptome profile of human pancreatic islets reported that three out of four type 2 diabetes mellitus patients analyzed in the study had decreased β -cell mass and significantly lower insulin mRNA levels [3]. These observations suggest that the formation of smaller islets and the development of the diabetic

phenotype are interdependent. An expansion of β -cell mass is, in contrast, a cellular adaption to maintain glycemic control *via* increased insulin biosynthesis and secretion. A pharmacological-induced increase in β -cell mass should increase insulin biosynthesis and secretion and, thus, counteracts the development of glucose intolerance. Therefore, the proteins regulating the proper size of pancreatic islets have to be identified in order to use them as possible therapeutic targets.

Here, we identified the transcription factor Elk-1 as a regulator of pancreatic islet size. Elk-1 interacts with DNA and forms together with a dimer of the serum response factor a ternary complex that binds to the serum-response element and activates transcription of those genes that contain SREs in their regulatory regions [4,5]. Elk-1 is also involved in the regulation of transcription *via* the transcription factor AP-1 and its binding site, the TPA-response element (TRE) [6–11]. Elk-1 is a major nuclear substrate for the MAP kinases extracellular signal-regulated

Abbreviations: Dox, doxycycline; SRE, serum response element; SRF, serum response factor; TCF, ternary complex factor; rtTA, reverse tetracycline transactivator

* Corresponding author at: Department of Medical Biochemistry and Molecular Biology, Saarland University, Building 44, D-66421, Homburg, Germany.

E-mail address: gerald.thiel@uks.eu (G. Thiel).

¹ These authors contributed equally to the study.

<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104983>

Received 24 January 2020; Received in revised form 5 May 2020; Accepted 29 May 2020

Available online 03 June 2020

1043-6618/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

protein kinase (ERK1/2), p38 and c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) [12,13]. Phosphorylation of Elk-1 by the MAP kinases connects stimulus-induced MAP kinase activation with gene transcription. In particular, phosphorylation of serine residues S383 and S389 is important for stimulus-transcription coupling. Mutation of these serine residues to alanine reduces SRE-dependent gene transcription [14].

The biological functions proposed to be regulated by Elk-1 include the regulation of proliferation of different cell types, the growth of prostate cancer cells, the development of thymocytes, and the regulation of cell migration [15–19]. Elk-1 target genes include SRE and TRE-containing genes, but an analysis of the Elk-1 target gene network revealed that Elk-1 broadly effects transcription by regulating core components of the gene regulatory machinery [20].

It has been described that Elk-1 is rapidly phosphorylated in MIN6 insulinoma cells that had been stimulated with either epidermal growth factor, glucose or KCl. However, these experiments did not analyze endogenous Elk-1 but rather Elk-1 expressed from a transfected expression vector [21]. Previously, we have studied the stimulus-induced biosynthesis of the transcription factor Egr-1 in insulinoma cells. Egr-1 is encoded by an immediate-early gene that is mainly regulated by multiple SRE motifs. Our data showed that glucose, tolbutamide, KCl, or pregnenolone sulfate-induced upregulation of Egr-1 biosynthesis can be blocked by the expression of a dominant-negative mutant of Elk-1 [22,23]. These data indicate that Elk-1 plays a role in controlling immediate-early gene transcription in insulinoma cells. However, no data have so far been published describing the biological function of Elk-1 in pancreatic β -cells. The use of Elk-1-deficient mice to address this point is problematic, as compensatory activities by the Elk-1-related proteins SAP-1 and SAP-2 are likely to occur [24]. Therefore, we have generated a new mouse model that allows the doxycycline-dependent expression of a dominant-negative mutant of Elk-1 specifically in pancreatic β -cells of transgenic mice. The analysis of this mouse model revealed that the animals had significant smaller islets and increased caspase-3/7 activities, suggesting that apoptosis was responsible for the reduction of the islet size. Moreover, transgenic mice expressing the dominant-negative mutant of Elk-1 displayed impaired glucose tolerance. Together, our data show that TCFs are important regulators of β -cell function and may be considered as a new target for pharmacological intervention.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

The rat insulinoma cell line INS-1 832/13 was a kind gift of Hindrik Mulder, Lund University, Sweden, with the permission of Hans-Ewald Hohmeier and Christopher Newgard, Duke University, USA [25]. INS-1 Δ B-Raf:ER cells have been described [6]. INS-1 832/13 and INS-1 Δ B-Raf:ER cells were cultured and stimulated as described [22,26,27]. Both cell lines have been authenticated recently [27]. To stimulate NF- κ B in insulinoma cells, we added interleukin-1 β (PeproTech, Rocky Hills, USA, No. 200-01B#, final concentration 10 ng/mL, dissolved in phosphate-buffered saline supplemented with 0.1 % BSA) to the culture medium.

2.2. Lentiviral gene transfer and reporter assays

The lentiviral transfer vector pFUW-REST/Elk-1 Δ C has been described elsewhere [28]. The lentiviral reporter plasmids pFWEgr1.2.luc and pFW-HIVLTR.luc, used to measure Elk-1 and NF- κ B activity, respectively, have been described [29–31]. Infection of INS-1 832/13 and INS-1 Δ B-Raf:ER cells with recombinant lentiviruses were performed as described [22,26,27].

2.3. RT-PCR

Total RNA was isolated from insulinoma cells and pancreatic islets and reversely transcribed. The PCR reaction was performed with Taq DNA Polymerase (# M0267S, New England Biolabs, Frankfurt,

Germany, 1 U) using the following primers: Elk-1, 5'-CTCGGGCCTCT ATTCTACTT-3' and 5'-GCCTCTGGTGGGTTAGGATA-3', SAP-1, 5'-ATGGACCCACTGACGGTAGG-3' and 5'-CTGCTAGTTTTCCGCTGGAT-3', SAP-2, 5'-AGAGTGCAATCACGCTGTGG-3', and 5'-GCCCGATCAC TTTCTTGATGATG-3', and SRF, 5'-CCAGTGTGCGGAATCTGACAG-3' and 5'-GCTGACTTGCATGGTGGTAGA-3'. Primers specific for GAPDH (5'-TTGTGATGGGTGTAACAC-3' and 5'-GTCTTCTGGGTGGCAGTG ATG-3') were used as a loading control. To detect REST/Elk-1 Δ C expression in double transgenic RIP-rTA/[tetO]₂REST/Elk-1 Δ C mice, the primer pair 5'-CGATTACAAGGATGACGATGA-3' and 5'-TGCCATTTC TTTCCCGATTA -3' was used. The PCR products were separated by agarose gel electrophoresis and visualized with ethidium bromide.

2.4. Western blot analyses

Western blots were performed using antibodies directed against Egr-1 (Santa Cruz, Heidelberg, Germany, # sc-189) and c-Fos (Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main, Germany, # 2250). As a loading control, an antibody directed against HDAC1 (Santa Cruz, Heidelberg, Germany, # sc-81598) was used. An antibody against the FLAG epitope was purchased from Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany (# F1804). Immunoreactive bands were detected via enhanced chemiluminescence as described [23,32]. Uncropped images of the original Western blots are shown as supplementary file.

2.5. Generation of double transgenic RIP-rTA/[tetO]₂REST/Elk-1 Δ C mice

The generation of single transgenic [tetO]₂REST/Elk-1 Δ C mice has previously been described [33]. The transgenic mouse line [tetO]₂REST/Elk-1 Δ C #1 was crossed with RIP-rTA mice, generating double-transgenic RIP-rTA/[tetO]₂REST/Elk-1 Δ C mice. RIP-rTA mice expressing the reverse tetracycline transactivator (rtTA) under the control of 9.5 kb of the 5'-regulatory region of the rat insulin II gene [34] were obtained from Mehboob A. Hussain, Johns Hopkins University, Baltimore, USA. Transgenic RIP-rTA/[tetO]₂REST/Elk-1 Δ C mice and their control littermates received doxycycline (Sigma, 1 mg/mL) in 0.8 % sucrose *ad libitum* in the drinking water or 0.8 % sucrose (control) for 8–12 weeks after birth and were then used for the experiments. Mice were housed in a specific pathogen-free barrier facility, maintained on a 12-h light/dark cycle. The animals had free access to tap water and standard pellet food (Altromin, Lage, Germany). The experiments were conducted in accordance with the German legislation on protection of animals and the NIH Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication #85–23 Rev. 1985), and were approved by the local governmental animal protection committee.

2.6. Isolation of pancreatic islets

Pancreatic islets were isolated as described [35].

2.7. Immunohistochemistry and X-GAL histochemistry

Immunohistochemistry and X-GAL histochemistry were performed as described [35]. We used an antibody directed against cleaved caspase-3 (Cell Signaling, Frankfurt am Main, Germany, #9661) to detect active caspase-3.

2.8. Glucose tolerance test

Mice that were fasted for 6 h (drinking water was continuously accessible) were used for intraperitoneal glucose tolerance tests (IPGTT). The mice had been injected with 2 g glucose per kg of body weight, at the start of the measurements. The blood samples were collected from the caudal vein at the indicated time points and the glucose concentrations were determined using a glucometer (Accu-Chek Aviva; Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Germany).

2.9. Caspase-3/7-Activity

Caspase 3/7 activities of infected INS-1 832/13 cells were measured using the Caspase-Glo assay kit (Promega, Mannheim, Germany, # 88,091) as described [32,35,36].

2.10. Morphometry

Quantitative evaluation of the β -cell size was performed as described [35]. In brief, hematoxylin-stained sections from all parts of the pancreas were examined using a BZ-8000 microscope (Keyence, Osaka, Japan). Areas of pancreatic islets inside the pancreatic tissue were measured.

2.11. Statistics

Statistical calculations were performed using Microsoft Excel. Statistical analyses were done by using the two-tailed Student's *t*-test. Data shown are means \pm SD or \pm SEM, as indicated, from at least three independent experiments. Statistical probability is expressed as **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001. Values were considered significant when *P* < 0.05.

3. Results

3.1. Expression of TCF and SRF proteins in pancreatic islets and insulinoma cells

The SRF dimer binds to the consensus sequence CC[A/T]₆GG (the CarG box), which is part of the SRE. Adjacent to the CarG box, having the Ets consensus core sequence GGAA/T, is the binding site for the TCF proteins Elk-1, SAP-1, and SAP-2 (Fig. 1A). One of the TCF proteins together with the SRF dimer constitutes a functional ternary complex that allows the activation of gene transcription of those genes that contain SRE(s) in their regulatory region. The TCF proteins do not only interact with DNA, but they also bind with the B-domain to SRF. The connection between cellular stimulation and gene transcription is mediated by the phosphorylation of the TCF proteins by stimulus-induced MAP kinases [4,5]. Fig. 1B shows that all three TCF proteins Elk-1, SAP-1 and SAP-2 are expressed in pancreatic islets and insulinoma cells, together with SRF.

3.2. Expression of a dominant-negative mutant of Elk-1 blocks the stimulus-induced biosynthesis of Egr-1 in insulinoma cells

Gene targeting experiments showed that the loss of one of the TCF proteins can be compensated by other TCFs, indicating that the biological function of the TCFs is redundant [16,24,37,38]. The fact that all three TCF proteins are expressed in pancreatic islets and insulinoma cells precludes the use of single TCF knock-out mice to investigate the functions of TCFs in pancreatic β -cells. In addition, transgenic mice with inactivated Elk-1 and SAP-1 genes are infertile [16], making it difficult to generate double or triple TCF knockout mice. The problem associated with redundancy of functions between the TCF proteins was resolved by expressing a dominant-negative mutant of Elk-1 termed REST/Elk-1 Δ C. Fig. 2A shows the modular structure of Elk-1 and the dominant-negative REST/Elk-1 Δ C mutant. The mutant lacks the phosphorylation-regulated activation domain, but retains the binding domains to DNA and to the SRF dimer. Thus, the Elk-1 mutant blocks the Elk-1 DNA binding site and the binding site to SRF and, thus, interferes with the biological activity of SRF (Fig. 2B). Moreover, the expression of the truncated Elk-1 protein as a fusion protein with a transcriptional repression domain of REST ensured the recruitment of histone deacetylases and the subsequent chromatin compaction to the transcription units bound by REST/Elk-1 Δ C.

We tested the biological activity of REST/Elk-1 Δ C in insulinoma cells by studying the biosynthesis of the transcription factor Egr-1. The regulatory region of Egr-1 contains multiple SREs providing multiple binding sites for SRF and TCF proteins (Fig. 2C). Stimulation of ι -type Ca²⁺ channels activated the biosynthesis of Egr-1 in insulinoma cells (Fig. 2D). Expression of REST/Elk-1 Δ C completely blocked the stimulus-induced activation of Egr-1

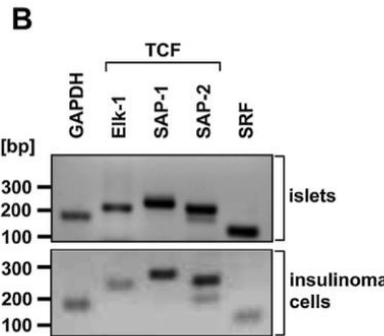
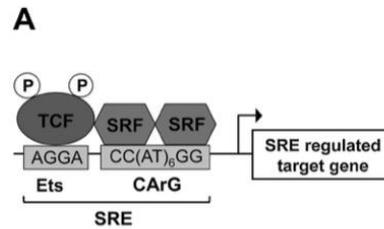


Fig. 1. Expression of SRF and TCF proteins in insulinoma cells and pancreatic islets. (A) Schematic representation of the SRE, consisting of binding sites for a dimer of SRF and an adjacent bound ternary complex factor such as Elk-1. Elk-1 is a substrate of different protein kinases. (B) Expression of Elk-1, SAP-1, SAP-2 and SRF in pancreatic islets and in INS-1 insulinoma cells. RNA was prepared from islets and INS-1 insulinoma cells. Expression of Elk-1, SAP-1, SAP-2 and SRF was monitored via RT-PCR using gene specific primers. As a control, expression of GAPDH was assessed. The RT-PCR reaction encompassed 28 (GAPDH) or 32 (SRF, TCFs) cycles.

biosynthesis (Fig. 2D). Likewise, the biosynthesis of Egr-1, induced by the expression of a conditionally active form of B-Raf in insulinoma cells, was inhibited in the presence of REST/Elk-1 Δ C (Figs. 2E, F).

3.3. Expression of a dominant-negative mutant of Elk-1 blocks the stimulus-induced biosynthesis of c-Fos in insulinoma cells

The Egr-1 gene is mainly controlled by multiple SREs. We asked whether the dominant-negative mutant of Elk-1 also interferes with expression of genes containing only one SRE. We analyzed expression of the c-Fos gene, which contains one SRE (Fig. 3A), but additional binding sites for the transcription factors CREB, STAT, and AP-1. Fig. 3B shows that c-Fos expression is upregulated in insulinoma cells following stimulation of ι -type Ca²⁺ channels (Fig. 3B). Expression of c-Fos was significantly reduced in insulinoma cells expressing the Elk-1 mutant REST/Elk-1 Δ C (Fig. 3B). Expression of c-Fos was strongly upregulated in insulinoma cells following activation of a conditionally active form of B-Raf (Fig. 3C). Expression of REST/Elk-1 Δ C almost completely inhibited the B-Raf-induced biosynthesis of c-Fos (Fig. 3C). We conclude that the Elk-1 mutant REST/Elk-1 Δ C is biologically active in blocking SRE-mediated gene transcription in insulinoma cells. Thus, the mutant can be used as a tool to block transcription mediated by TCFs.

3.4. Expression of a dominant-negative mutant of Elk-1 specifically blocks transcription of a SRE-controlled reporter gene

To confirm the previous results, we analyzed reporter gene transcription regulated by either SRE or κ B motifs. The reporter gene Egr1.2.luc contains the luciferase reporter gene controlled by 490 nucleotides of the human Egr-1 gene. Expression of the Elk-1 mutant REST/Elk-1 Δ C strongly reduced

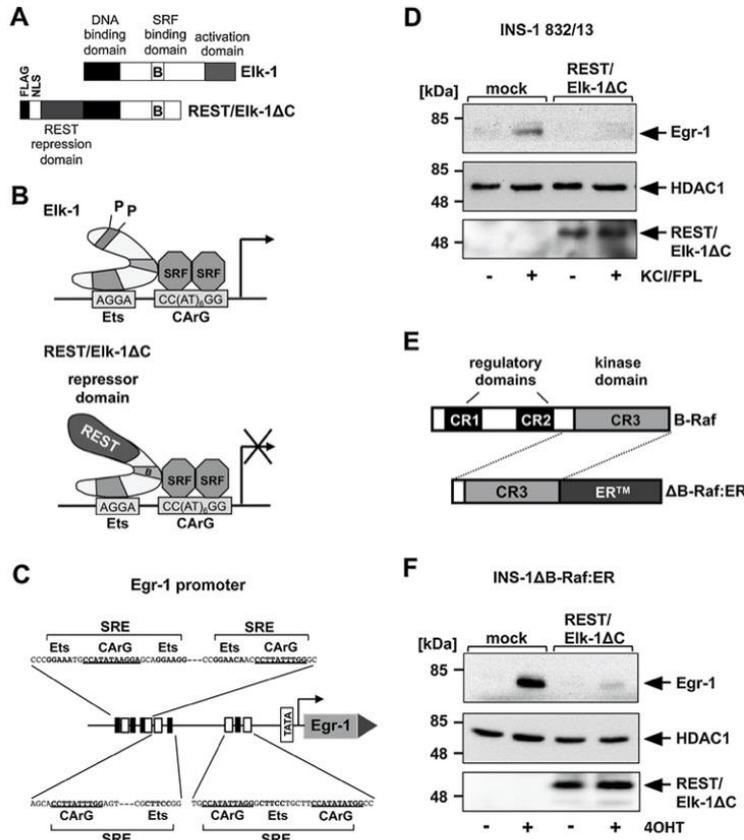


Fig. 2. The Elk-1 mutant REST/Elk-1ΔC inhibits stimulus-induced biosynthesis of Egr-1 in insulinoma cells.

(A) Modular structure of Elk-1 and REST/Elk-1ΔC. Elk-1 has a N-terminal DNA binding domain, a C-terminal transcriptional activation domain, and a binding domain for serum response factor (domain B). The activation domain, including the phosphorylation sites, is deleted in the mutant. (B) Mode of action of REST/Elk-1ΔC. The mutant blocks the binding of TCF transcription factors to their cognate DNA binding sites, it blocks the interaction with SRF, and it recruits histone deacetylases to the transcription unit. Phosphorylation sites of Elk-1 are depicted ("P"). (C) Schematic representation of the Egr-1 promoter. The SREs, consisting of CArG boxes and TCF binding sites, are indicated. (D) Expression of REST/Elk-1ΔC blocks the biosynthesis of Egr-1 in insulinoma cells following activation of L-type voltage-gated Ca²⁺ channels. INS-1 832/13 cells were either mock infected or infected with a recombinant lentivirus encoding REST/Elk-1ΔC. The cells were incubated in medium containing 0.5 % serum and 2 mM glucose for 24 h and then stimulated for 24 h with KCl (25 mM) and FPL 64176 6 (2.5 μM) to activate L-type voltage-gated Ca²⁺ channels. Nuclear extracts were prepared and subjected to Western blot analysis using an antibody directed against Egr-1. The antibody directed against HDAC1 was used as a loading control. An anti-FLAG-tag antibody was used to show the expression of REST/Elk-1ΔC. (E) Modular structure of B-Raf and ΔB-Raf:ER, a conditionally active form of B-Raf. (F) Expression of REST/Elk-1ΔC blocks the biosynthesis of Egr-1 in insulinoma cells following activation of B-Raf. Cells were either mock infected or infected with a recombinant lentivirus encoding REST/Elk-1ΔC. Cells were cultured for 16 h in medium containing 0.5 % serum and 2 mM glucose and then stimulated with 4OHT

(100 nM) as indicated. Nuclear extracts were prepared and subjected to Western blot analysis using an antibody directed against Egr-1. The antibody directed against HDAC1 was used as a loading control. Expression of REST/Elk-1ΔC was visualized with an antibody that detected the FLAG epitope of the fusion protein.

reporter gene expression in insulinoma cells that had been stimulated with KCl and the voltage-gated Ca²⁺ channel activator FPL 64176 (Fig. 4A). Activation of B-Raf strongly stimulated SRE-controlled reporter gene transcription in insulinoma cells. Again, expression of REST/Elk-1ΔC strikingly reduced reporter gene transcription (Fig. 4B). To show the specificity of REST/Elk-1ΔC-mediated transcriptional repression, we analyzed transcription induced by the transcription factor NF-κB. To measure the NF-κB activity in insulinoma cells, a luciferase reporter gene under the control of the HIV-1 long terminal repeat (LTR) was used (Fig. 4C). There are two copies of a NF-κB consensus motif in the HIV LTR. Fig. 4D reveals that expression of REST/Elk-1ΔC had no effect on the interleukin-1β-induced NF-κB activity in insulinoma cells.

We conclude that the Elk-1 mutant REST/Elk-1ΔC is biologically active in specifically blocking SRE-mediated gene transcription. Thus, the mutant can be used as a tool to block TCF-regulated transcription in transgenic mice.

3.5. Mouse design

We recently generated several transgenic mouse lines using the vector depicted in Fig. 5A [33]. In these lines the coding regions of REST/Elk-1ΔC and β-galactosidase are controlled by a bi-directional

tetracycline operator-based promoter [tetO]. We used the mouse line [tetO]₇REST/Elk-1ΔC #1 for breeding. The line [tetO]₇REST/Elk-1ΔC #5 showed higher levels of inducible transgene expression [33], but was difficult to breed. The mouse line [tetO]₇REST/Elk-1ΔC #1 was crossed with RIP-rTA mice that express the reverse tetracycline activator (rtTA) under the control of 9.5 kb of the 5'-flanking region of the rat insulin II (RIP) gene (Fig. 5B). The use of 9.5 kb of the regulatory sequence of the rat insulin II promoter restricts expression of the rTA transactivator exclusively to pancreatic β-cells, and no expression is observed in other tissues, including liver, spleen, kidney, lung, heart, thymus, and brain [39,40]. The crossing scheme is depicted in Fig. 5C.

3.6. Doxycycline-dependent expression of β-galactosidase and REST/Elk-1ΔC in pancreatic β-cells

Administration of the tetracycline analogue doxycycline allows rTA to bind to the tet operator sequence and to activate transcription of both β-galactosidase and REST/Elk-1ΔC encoding transgenes (Tet-On system). We used the expression of β-galactosidase to monitor the doxycycline-induced cell type-specific transgene expression. Fig. 6A (left pictures) shows that β-galactosidase was inducibly expressed in isolated islets derived from transgenic RIP-rTA/[tetO]₇REST/Elk-1ΔC mice that had received doxycycline in

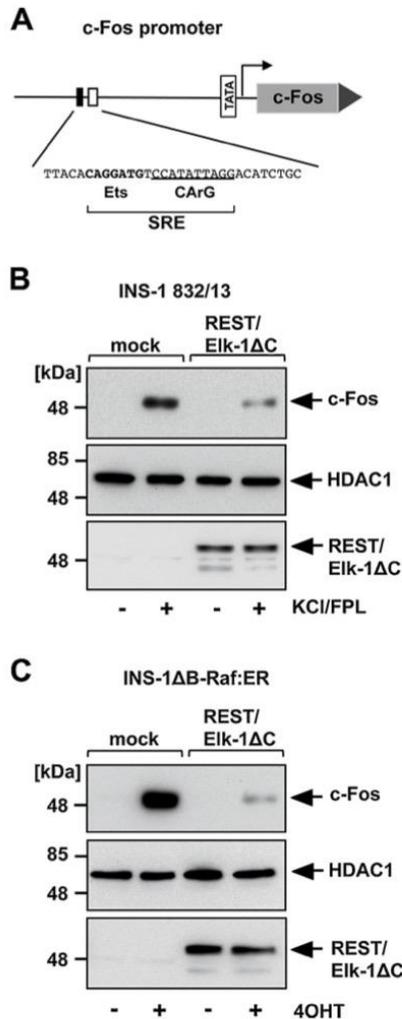


Fig. 3. Stimulus-induced expression of c-Fos is blocked in insulinoma cells expressing the Elk-1 mutant REST/Elk-1ΔC. (A) Schematic representation of the c-Fos promoter containing one SRE. (B) Expression of REST/Elk-1ΔC blocks expression of c-Fos in insulinoma cells following activation of L-type voltage-gated Ca²⁺ channels. INS-1 832/13 cells were either mock infected or infected with a recombinant lentivirus encoding REST/Elk-1ΔC. The cells were incubated in medium containing 0.5 % serum and 2 mM glucose for 24 h and then stimulated for 24 h with KCl (25 mM) and FPL 64176 6 (2.5 μM). Nuclear extracts were prepared and subjected to Western blot analysis using an antibody directed against c-Fos. The antibody directed against HDAC1 was used as a loading control. An anti-FLAG-tag antibody was used to show the expression of REST/Elk-1ΔC. (C) REST/Elk-1ΔC expression inhibits the biosynthesis of c-Fos in insulinoma cells following activation of B-Raf. Cells were either mock infected or infected with a recombinant lentivirus encoding REST/Elk-1ΔC. Cells were cultured for 24 h in medium containing 0.5 % serum and 2 mM glucose and then stimulated with 4OHT (100 nM) as indicated. Nuclear extracts were prepared and subjected to Western blot analysis using antibodies directed against c-Fos, HDAC1, and the FLAG epitope.

their drinking water. No X-GAL staining was seen in islets of control animals that did not receive doxycycline. The analyses of pancreas sections derived from double transgenic RIP-rTA/[tetO]₂REST/Elk-1ΔC mice revealed that β-galactosidase was expressed in islets when the mice received doxycycline in the drinking water (Fig. 6A, middle pictures). No expression of β-galactosidase was observed in the exocrine pancreas. We did not see any X-GAL staining in pancreatic sections from double transgenic RIP-rTA/[tetO]₂REST/Elk-1ΔC mice that had not received doxycycline in their drinking water. Furthermore, we did not see any X-GAL staining in the spleen of RIP-rTA/[tetO]₂REST/Elk-1ΔC mice that were maintained either with or without doxycycline in the drinking water (Fig. 6A, right pictures).

To verify expression of REST/Elk-1ΔC, we maintained double transgenic RIP-rTA/[tetO]₂REST/Elk-1ΔC mice for 8–12 weeks either in the presence or absence of doxycycline in the drinking water. Islets were isolated, RNA extracted and subjected to RT-PCR analysis. Fig. 6B (left picture) shows that the REST/Elk-1ΔC mRNA was detected in the islets derived from double transgenic RIP-rTA/[tetO]₂REST/Elk-1ΔC mice that had received doxycycline in the drinking water. No expression of REST/Elk-1ΔC was detected in islets from mice that did not receive doxycycline in their drinking water. As a control, expression of GAPDH was analyzed (Fig. 6B, right picture). A comparison of transgene expression with the endogenous expression of Elk-1 and other TCFs revealed that the Elk-1 mutant is moderately expressed in this mouse line. Thus, we can exclude that massive overexpression of the transgene leads to artificial interference of gene transcription.

3.7. Doxycycline-stimulated RIP-rTA/[tetO]₂REST/Elk-1ΔC mice have significantly smaller islets

A morphological inspection of RIP-rTA/[tetO]₂REST/Elk-1ΔC mice that had received doxycycline in the drinking water revealed that the pancreatic islets were smaller. Fig. 7A shows an example of islets found in double transgenic RIP-rTA/[tetO]₂REST/Elk-1ΔC mice that received or did not receive doxycycline with the drinking water. The reduced size of the islets is obvious. We performed a morphometric analysis of the islet size, comparing the size of pancreatic islets derived from all parts of the pancreas. The results revealed that the islets of RIP-rTA/[tetO]₂REST/Elk-1ΔC mice that had received doxycycline, were approximately 50 % smaller in comparison to the islet size of RIP-rTA/[tetO]₂REST/Elk-1ΔC mice that did not receive doxycycline (Fig. 7B). Thus, Elk-1 is required for the generation of islets of adequate size.

3.8. Expression of a dominant-negative mutant of Elk-1 increases caspase-3/7 activity in insulinoma cells

A reduction of β-cell mass in type 2 diabetes patients has been attributed to an increase in β-cell apoptosis [1,41]. Thus, the development of smaller islets in RIP-rTA/[tetO]₂REST/Elk-1ΔC mice may result from increased apoptosis. We therefore assessed whether caspase-3/7-activity was changed in insulinoma cells expressing the dominant-negative mutant of Elk-1. Caspases-3/7 play a critical role in the execution phase of apoptosis. INS-1 832/13 cells were either mock infected or infected with a lentivirus expressing REST/Elk-1ΔC. Caspase-3/7 activity was measured biochemically. Fig. 8A shows that expression of the dominant-negative mutant of Elk-1 strongly activated caspase-3/7.

Next, we used immunohistochemistry to analyze double transgenic RIP-rTA/[tetO]₂REST/Elk-1ΔC mice, employing an antibody that detects activated caspase-3. Fig. 8B shows that caspase-3 activity was detected only in islets derived from RIP-rTA/[tetO]₂REST/Elk-1ΔC mice that had received doxycycline in the drinking water. We did not detect any activated caspase-3 in islets from RIP-rTA/[tetO]₂REST/Elk-1ΔC control mice that did not receive doxycycline. Therefore, we conclude that expression of dominant-negative mutant of Elk-1 induces an apoptotic signaling cascade *in vivo*, involving caspase-3. These data suggest that the reduction of islet size is the result of enhanced apoptosis of β-cells induced by the expression of the dominant-negative mutant of Elk-1.

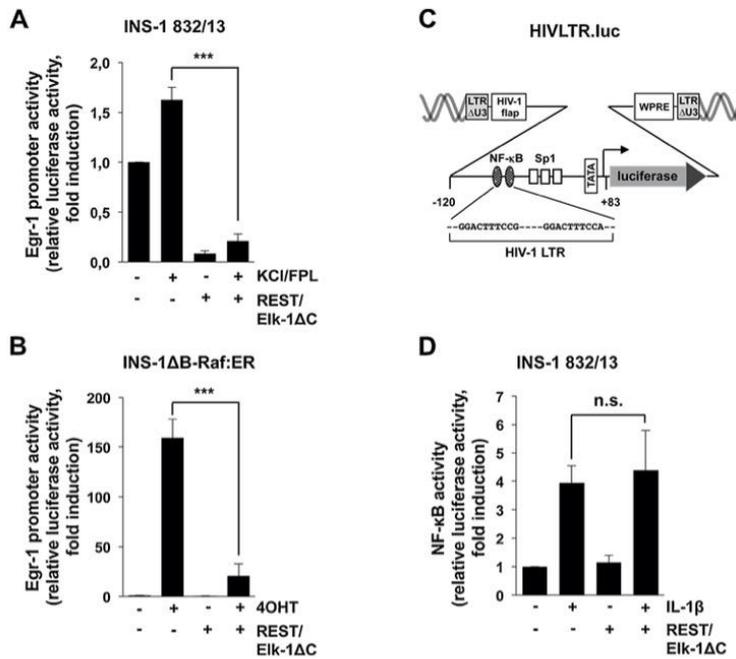


Fig. 4. The Elk-1 mutant REST/Elk-1ΔC specifically inhibits SRE-regulated gene transcription.

(A) INS-1 832/13 cells were infected with the recombinant lentivirus containing the Egr-1 promoter/luciferase reporter gene. In addition, cells were either mock infected or infected with a recombinant lentivirus encoding REST/Elk-1ΔC. The cells were incubated in medium containing 0.5 % serum and 2 mM glucose for 24 h and then stimulated for 24 h with KCl (25 mM) and FPL 64176 (2.5 μM). Cell extracts were prepared and analyzed for luciferase activities. Data shown are mean ± SD of three independent experiments performed in quadruplicate (***, $P < 0.001$). (B) INS-1ΔB-Raf:ER cells were infected with a recombinant lentivirus encoding the Egr-1 promoter/luciferase reporter gene Egr1.2.luc. In addition, cells were either mock infected or infected with a recombinant lentivirus encoding REST/Elk-1ΔC. The cells were incubated in medium containing 0.5 % serum and 2 mM glucose for 24 h and then stimulated for 24 h with 4OHT (100 nM). Cell extracts were prepared and analyzed for luciferase activities. Data shown are mean ± SD of three independent experiments performed in quadruplicate (***, $P < 0.001$). (C) Schematic representation of the integrated provirus encoding a HIV-1 LTR/luciferase reporter gene (HIVLTR.luc), used as a sensor for detecting NF-κB activity. (D) INS-1 832/13 cells were infected with a recombinant lentivirus containing the HIVLTR.luc reporter

gene. In addition, cells were either mock infected or infected with a recombinant lentivirus encoding REST/Elk-1ΔC. The cells were incubated in medium containing 0.5 % serum and 2 mM glucose for 24 h and then stimulated for 24 h with Interleukin-1β (10 ng/mL). Cell extracts were prepared and analyzed for luciferase activities. Data shown are mean ± SD of three independent experiments performed in quadruplicate (n.s., not significant).

3.9. Transgenic mice expressing a dominant-negative mutant of Elk-1 in pancreatic β-cells show impaired glucose tolerance

It has been reported that a reduction of β-cell size by 65 % results in pancreatic diabetes, while impaired glucose tolerance was already observed by a relative β-cell loss of 21 % [42]. We therefore analyzed the dynamics of glucose response in double-transgenic RIP-rTA/[tetO]₂-REST/Elk-1ΔC mice that had received doxycycline in the drinking water to induce transgene expression. For the control mice, doxycycline was omitted. Single transgenic [tetO]₂-REST/Elk-1ΔC mice served as an additional control. The results, shown in Figs. 9A and 9B, revealed that double-transgenic RIP-rTA/[tetO]₂-REST/Elk-1ΔC mice that expressed the Elk-1 mutant in pancreatic β-cells showed impaired glucose tolerance, exhibiting a higher glucose concentration over 120 min following the injection of glucose. Quantification of serum glucose concentrations at multiple time points, calculated by integrating the area under the curve (AUC), indicated significantly higher glucose levels at an early (0–60 min) and late phase (60–120 min) following glucose challenge (Fig. 9B). In contrast, blood glucose levels were similar in single transgenic [tetO]₂-REST/Elk-1ΔC mice either in the presence or absence of doxycycline treatment of the mice (Figs. 9C, D). Thus, attenuation of Elk-1 activity interfered with the fundamental function of β-cells, the regulation of glucose homeostasis.

4. Discussion

Diabetes mellitus is a metabolic disease characterized by elevated glucose concentration in the blood of patients. A progressive reduction of β-cell mass and β-cell function is a hallmark of both type 1 and type 2 diabetes mellitus [43]. The formation of smaller pancreatic islets has been correlated with the development of a diabetic phenotype, because a reduced number of β-cells secrete insufficient amounts of insulin. This correlation has been confirmed

by the analysis of diabetic patients that had decreased β-cell mass and significantly lower insulin mRNA levels [1–3], supporting the view that the formation of smaller islets and the development of a diabetic phenotype are interdependent. A pharmacological induced increase in β-cell mass should result in increased insulin biosynthesis and secretion and should counteract the development of glucose intolerance. Thus, the identification of regulators that are crucial for maintaining an adequate β-cell mass is a key goal of diabetes research. Experimentally, it has been shown that transgenic mice overexpressing the Akt substrate glycogen synthase kinase-3β in β-cells had reduced β-cell mass [44]. A reduction in β-cell size has also been observed in transgenic mice with a disruption of the gene encoding acetyl-CoA carboxylase-1 in β-cells [45]. In contrast, an increase in β-cell mass was observed in transgenic mice expressing a constitutively active mutant of protein kinase Akt in β-cells [46]. Likewise, a selective deletion of the gene encoding the lipid phosphatase PTEN in transgenic mice led to the generation of larger islets with a significant increase of the β-cell mass [47]. The orphan nuclear receptor Nor1/Nr4a2 has been identified to function as a negative regulator of β-cell mass. Accordingly, Nor1-deficient mice had an increased β-cell mass that was accompanied by improved glucose tolerance [48].

In a previous study, we analyzed a transgenic mouse line expressing a dominant-negative mutant of the zinc finger protein Egr-1 in pancreatic β-cells. These mice developed smaller pancreatic islets in comparison to control mice and showed dysregulated glucose homeostasis [35]. As Egr-1 expression is regulated by the ternary complex factor Elk-1, we asked whether an inhibition of Elk-1 in pancreatic β-cells results in the generation of smaller islets and an impaired glucose tolerance. Elk-1 is phosphorylated and activated in glucose-stimulated MIN6 insulinoma cells [21]. However, the Elk-1 protein analyzed in this study was not endogenously expressed, but rather expressed from a transfected expression vector. We had shown in previous publications that a dominant-negative mutant of Elk-1 interfered with the stimulus-induced biosynthesis of Egr-1 [22,23], but these data did not reveal

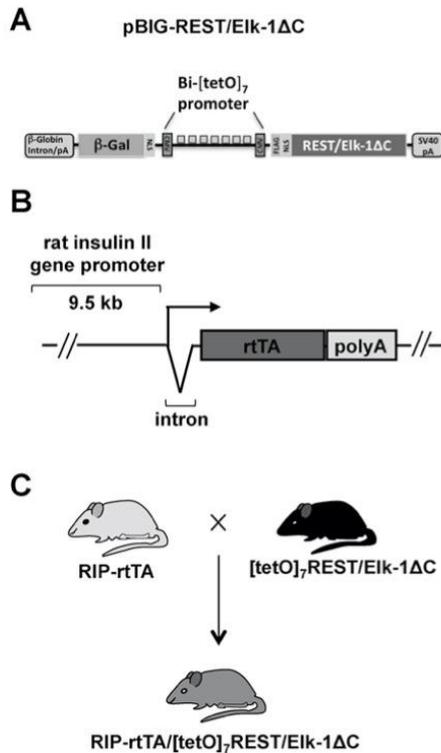


Fig. 5. Design and generation of double transgenic RIP-rTA/[tetO]₇REST/Elk-1ΔC mice.

(A) Diagram showing a portion of the vector pBIG-REST/Elk-1ΔC used for transgenesis. The bidirectional tetO promoter allows the expression of both transgenes REST/Elk-1ΔC and β-galactosidase following binding of the reverse tetracyclin transactivator rTA to the bidirectional tetO promoter. (B) Expression unit of rTA in RIP-rTA mice. (C) Generation of double transgenic mice by crossing [tetO]₇REST/Elk-1ΔC mice with RIP-rTA mice.

any further insight in the biological function of Elk-1 in pancreatic β-cells. The objective of this study was to investigate the biological role of Elk-1 in pancreatic β-cells of transgenic mice *in vivo*. As Elk-1 belongs, together with SAP-1 and SAP-2, to the TCF family of proteins, sharing redundant functions [16,24,37,38], gene targeting technology of a single TCF was not useful for investigating TCF functions in pancreatic β-cells. Moreover, the fact that double transgenic Elk-1^{-/-}/SAP-1^{-/-} mice are infertile [16], precluded the generation of triple transgenic Elk-1^{-/-}/SAP-1^{-/-}/SAP-2^{-/-} mice to assess the role of TCF proteins in the endocrine pancreas. Instead, we conditionally expressed a dominant-negative mutant of Elk-1, REST/Elk-1ΔC, in pancreatic β-cells that should suppress gene transcription regulated by all TCF proteins, due to the structural homology between these proteins. We used an established strategy to interfere with the activity of closely related proteins showing redundant activities. Experimentally, dominant-negative mutants of the transcription factors C/EBP, CREB, c-Fos, Egr-1, and Maf have been successfully expressed in various tissues of transgenic mice [35,49–53]. In addition, nature has developed dominant-negative transcription factor mutants such as ICER or CHOP to regulate the transcriptional activity of transcription factors with redundant function. Experiments involving insulinoma cells showed the specificity of the dominant-negative Elk-1 mutant in repressing stimulus-induced activation of the Egr-1 gene that is controlled

by multiple SRE motifs.

Transgenic mice were generated that contained the coding region for the dominant-negative mutant of Elk-1, REST/Elk-1ΔC, and that of β-galactosidase under the control of a bi-directional tetracycline operator-based promoter. This mouse line was crossed with RIP-rTA mice that express the reverse tetracycline activator (rTA) under the control of 9.5 kb 5' regulatory sequence of the rat insulin II promoter (RIP), thus generating double transgenic RIP-rTA/[tetO]₇REST/Elk-1ΔC mice. It has been shown that the use of 9.5 kb of the regulatory sequence of the rat insulin II promoter restricts expression of the rTA transactivator exclusively to pancreatic β-cells. No expression was observed in other tissues, including liver, spleen, kidney, lung, heart, thymus, and brain [34,35,39,40]. This 9.5 kb sequence of the rat insulin II promoter has been used in other studies to express transgenes specifically in pancreatic β-cells, including the expression of diphtheria toxin, a dominant-negative mutant of the transcription factor Egr-1, or a mutant of IκB [35,39,40,54]. Thus, we can exclude that the observed phenotype of RIP-rTA/[tetO]₇REST/Elk-1ΔC mice results from transgene expression in tissues other than the endocrine pancreas. In contrast, a short insulin II promoter fragment (~ 670 bp) directs expression not only in β-cells, but also in other cell types [55], resulting in ectopic leaky expression.

Transgenic mice expressing a dominant-negative mutant of Egr-1 in pancreatic β-cells had smaller pancreatic islets in comparison to control mice and had increased caspase-3/7 activities [35]. As Elk-1 is the major regulator of Egr-1 expression, we hypothesized that inhibition of Elk-1 activity in β-cells may also result in the generation of smaller islets. The morphometric analysis revealed that the islets of RIP-rTA/[tetO]₇REST/Elk-1ΔC mice were approximately 50 % smaller, when the transgene (REST/Elk-1ΔC) was expressed. Thus, a TCF regulated gene expression program is required for the generation of islets of adequate size. The reduction of the β-cell mass in diabetes patients has been attributed to an increased apoptosis of β-cells [1]. In fact, in transgenic mice expressing the dominant-negative mutant of Egr-1, an increased caspase-3/7 activity could be measured [35]. Experiments performed with insulinoma cells and RIP-rTA/[tetO]₇REST/Elk-1ΔC mice revealed that REST/Elk-1ΔC expression also increased caspase-3/7 activity, indicating that attenuation of TCF activity promotes apoptosis. Interestingly, another transgenic mouse model showed a very similar phenotype. Expression of a constitutively active mutant of the protein phosphatase calcineurin in β-cells resulted in decreased β-cell mass, hyperglycemia and enhanced apoptosis [56]. As Elk-1 is a major substrate of calcineurin, this phenotype may be explained by a calcineurin-induced inactivation (i.e. dephosphorylation) of Elk-1 in pancreatic β-cells.

Maintaining blood glucose tolerance is achieved by hormones of the islets of Langerhans. It has been reported that impaired glucose tolerance was observed by a relative β-cell loss of 21 % [42]. The fact that the islets of RIP-rTA/[tetO]₇REST/Elk-1ΔC mice were approximately 50 % smaller suggested a possible defect in the regulation of glucose homeostasis. A functional analysis revealed a disruption of glucose tolerance in RIP-rTA/[tetO]₇REST/Elk-1ΔC mice expressing the dominant-negative mutant of Elk-1. The mice have higher blood glucose concentrations over 120 min following the injection of glucose in an intraperitoneal glucose tolerance test. Thus, attenuation of TCF activity interfered with the fundamental function of β-cells, the regulation of glucose homeostasis. This is the first time that a prominent role is attributed to TCF proteins in regulating glucose homeostasis *in vivo*.

5. Conclusion

In this study, we identified the TCF transcription factors as crucial proteins for the formation of pancreatic islets of adequate size. Furthermore, we showed that an interference with the biological activity of Elk-1 increased caspase-3/7 activities in islets, suggesting that apoptosis is responsible for the reduction of the islet size. Moreover, a reduction of Elk-1 activity led to an impairment of glucose tolerance in transgenic mice. Together, we provide here the first *in vivo* evidence of the critical role of TCF proteins in the regulation of islet cell mass and glucose homeostasis.

Pancreatic β-cells secrete insulin in response to elevated glucose

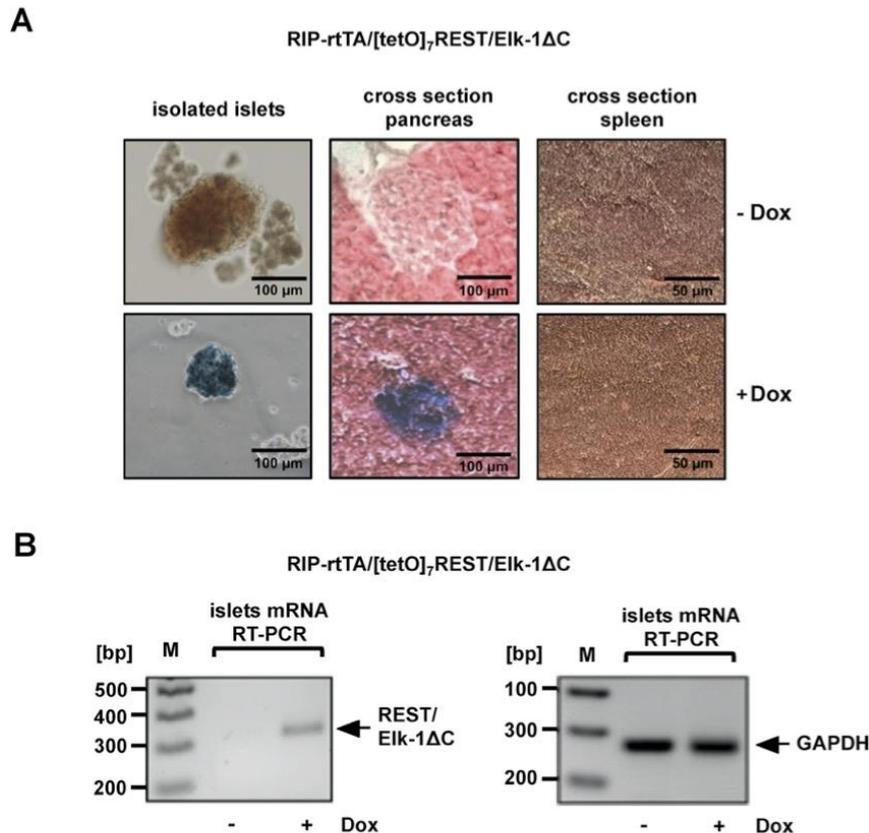


Fig. 6. Transgene expression in double transgenic RIP-rtTA/[tetO]₂REST/Elk-1ΔC mice. (A) Histochemical analysis of β-galactosidase expression in isolated islets, pancreatic and spleen tissues derived from transgenic RIP-rtTA/[tetO]₂REST/Elk-1ΔC mice. Left pictures: X-Gal histochemistry of islets isolated from RIP-rtTA/[tetO]₂REST/Elk-1ΔC mice that were maintained in the presence or absence of doxycycline (Dox) in the drinking water. Middle pictures: X-Gal histochemistry of pancreas sections derived from RIP-rtTA/[tetO]₂REST/Elk-1ΔC mice that were maintained in the presence or absence of doxycycline (Dox) in the drinking water. Right pictures: X-Gal histochemistry of sagittal sections of the spleen of transgenic RIP-rtTA/[tetO]₂REST/Elk-1ΔC mice that were maintained in the presence or absence of doxycycline (Dox) in the drinking water. Scale bars, 50 or 100 μm. (B) Expression of REST/Elk-1ΔC in islets of double transgenic RIP-rtTA/[tetO]₂REST/Elk-1ΔC mice that had been treated with or without doxycycline. As a control, the expression of GAPDH was assessed. Transgene expression was detected via RT-PCR.

concentrations in the blood, and thus regulate glucose homeostasis. Millions of people worldwide suffer from diabetes mellitus, having high blood glucose levels, due to insufficient insulin secretion or peripheral insulin resistance. β-cells are a predominant target of pharmacological approaches to treat diabetes mellitus, aiming to improve insulin secretion. Sulfonylureas, for instance, induce a closure of K_{ATP} channels, and thus stimulate insulin release. Likewise, glucagon-like peptide receptor agonists promote insulin release. However, prolonged treatments may damage β-cells and increase cell death. A decrease in β-cell mass, due to an increased β-cell apoptosis, has frequently been observed in diabetic patients. Thus, a pharmacological intervention in diabetes mellitus should not only focus on stimulating insulin secretion, but should also address interventions that increase the number of β-cells in diabetic patients [57]. In this context, it is interesting that treatment with the glucagon-like peptide receptor agonist exenatide has been shown not only to increase insulin secretion, but also increases islet cell replication and decreases β-cell apoptosis [58]. To address the regulation of β-cell mass, regulatory proteins have to be identified and analyzed as druggable targets. In this study, we showed that TCF transcription factors are required for the

formation of pancreatic islets of adequate size. Transcription factors have often been viewed as undruggable targets. In particular, TCF proteins have to be phosphorylated and transported into the nucleus to be biologically active, making a pharmacological interference difficult. Targeting microRNAs, short, non-coding RNAs, has been suggested as a tool to induce β-cell proliferation. These RNAs bind to the 3'-untranslated region of target mRNAs via Watson-Crick base-pairing and induce mRNA degradation. The highly expressed miRNA in pancreatic islets, miR-375, has been shown to be necessary for maintaining pancreatic β-cells mass [59]. Interestingly, the miRNA miR-143 targets the Elk-1 mRNA 3'-untranslated region, leading to a translational repression of Elk-1 expression. Accordingly, inhibition of miR-143 in smooth muscle cells induces an upregulation of Elk-1 expression and an induction of proliferation [60]. However, many technical challenges remain. Addressing β-cell proliferation with small molecules has to be β-cell-specific, making it difficult to use miR-143 as a target. Moreover, an intervention in the control mechanisms of β-cell proliferation has been associated with increased risk of tumor development.

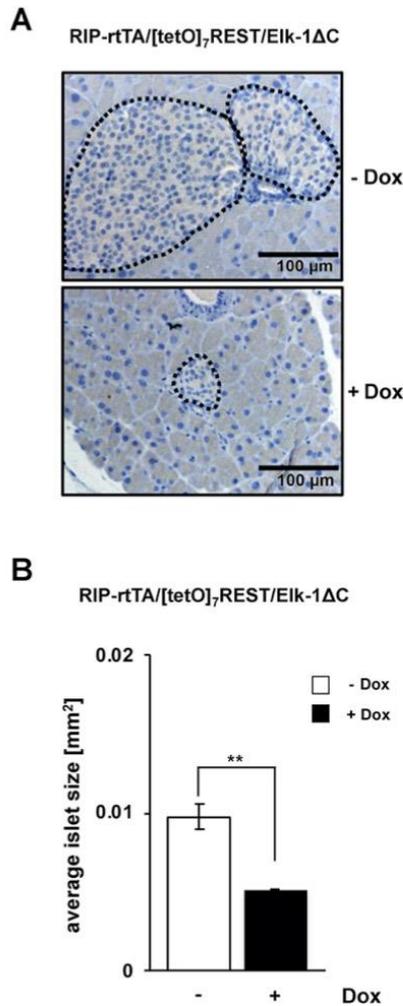


Fig. 7. Reduced size of pancreatic islets in transgenic mice expressing a dominant-negative mutant of Elk-1. (A) Hematoxylin-stained sagittal sections of pancreata derived from double transgenic RIP-rtTA/[tetO]₇/REST/Elk-1ΔC mice that had received doxycycline supplementation in the drinking water as indicated. (B) Reduced islet size in double transgenic RIP-rtTA/[tetO]₇/REST/Elk-1ΔC mice that expressed the REST/Elk-1ΔC transgene. The bar graph shows the mean pancreatic islet size of 8–12-week old transgenic RIP-rtTA/[tetO]₇/REST/Elk-1ΔC mice that were maintained in the presence or absence of doxycycline (Dox) in the drinking water as measured by morphometric analysis of 76 islets (control) and 132 islets (doxycycline) (**, $P < 0.01$).

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

We thank Mehboob A. Hussain (Johns Hopkins University,

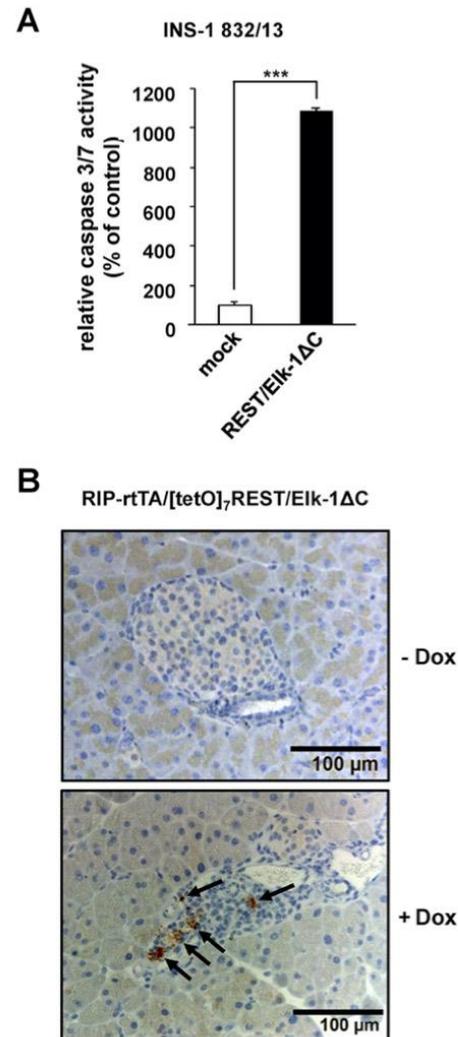


Fig. 8. Expression of a dominant-negative mutant of Elk-1 activates caspase-3 *in vitro* and *in vivo*.

(A) INS-1 832/13 cells were either mock infected or infected with a recombinant lentivirus encoding REST/Elk-1ΔC. The cells were incubated in DME medium containing 0.5 % serum and 2 mM glucose for 48 h. The caspase-3/7 activity was determined with the "CaspaseGlo-Substrate" (n = 3). (B) Immunohistochemistry of sagittal sections of pancreata derived from double transgenic RIP-rtTA/[tetO]₇/REST/Elk-1ΔC mice that had either received doxycycline in the drinking water or were kept without doxycycline supplementation. Activated caspase-3 was visualized with an antibody directed against the active form of caspase-3.

Baltimore, USA) for providing RIP-rtTA mice, and Libby Guethlein (Stanford University, USA) for critical reading of the manuscript. This study was supported by the Saarland University (Zentrale Forschungskommission # T6 03 1600-03 and LOM-T201000492), Deutsche Forschungsgemeinschaft (# TH 377/12-1), and Deutsche

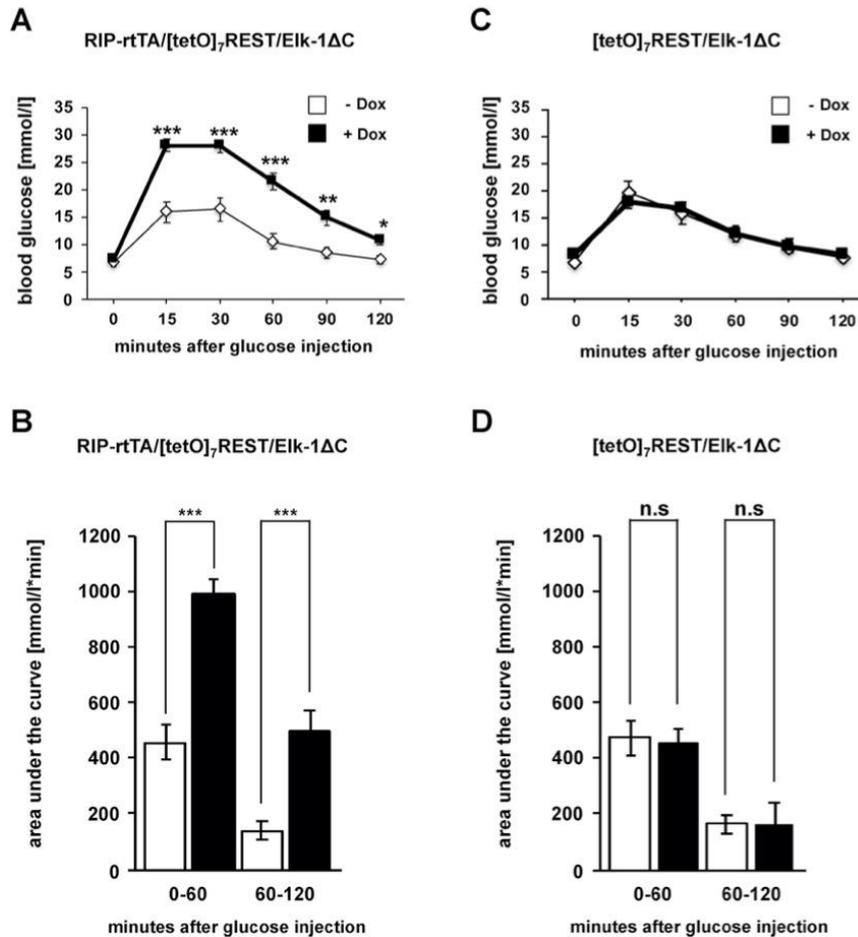


Fig. 9. Impaired glucose tolerance in transgenic mice expressing REST/Elk-1ΔC in pancreatic β-cells. Glucose tolerance test performed with 10 week-old double transgenic RIP-rtTA/[tetO]₇,REST/Elk-1ΔC mice (A, B) or, as a control, with single transgenic [tetO]₇,REST/Elk-1ΔC mice (C, D) that were maintained either in the presence or absence of doxycycline in the drinking water. The animals were injected with glucose (2 g/kg body weight) and blood glucose levels were measured at different time points. Blood glucose concentrations (A, C) and area under the curve (AUC) for blood glucose (B, D) were determined (data shown are mean ± SEM (A, C) or ± SD; (B, D), *, p < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001; n = 15).

Diabetes Stiftung (# 305/12/11).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104983>.

References

- [1] A.E. Butler, J. Janson, S. Bonner-Weir, R. Ritzel, R.A. Rizza, F.C. Butler, β-cell deficit and increased β-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes, *Diabetes* 52 (2003) 102–110.
- [2] H. Sakuraba, H. Mizukami, N. Yagihashi, R. Wada, C. Hanyu, S. Yagihashi, Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese type II diabetic patients, *Diabetologia* 45 (2002) 85–96.
- [3] A. Segerstolpe, A. Palasantza, P. Eliasson, E.-M. Andersson, A.-C. Andréasson, X. Sun, S. Picelli, A. Sabirsh, M. Clausen, M.K. Bjursell, D.M. Smith, M. Kasper, C. Ammälä, R. Sandberg, Single-cell transcriptome profiling of human pancreatic islets in health and type 2 diabetes, *Cell Metabol.* 24 (2016) 593–607.
- [4] A.D. Sharrocks, The ETS-domain transcription factor family, *Nat. Mol. Cell. Biol.* 2 (2001) 827–837.
- [5] P.E. Shaw, J. Saxton, Ternary complex factors: prime nuclear targets for mitogen-activated protein kinases, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35 (2003) 1210–1226.
- [6] I. Müller, T. Endo, G. Thiel, Regulation of AP-1 activity in glucose-stimulated insulinoma cells, *J. Cell. Biochem.* 110 (2010) 1481–1494.
- [7] G. Thiel, A. Lesch, A. Keim, Transcriptional response to calcium-sensing receptor stimulation, *Endocrinology* 153 (2012) 4716–4728.
- [8] A. Kaufmann, A. Keim, G. Thiel, Regulation of immediate-early gene transcription following activation of Gαq-coupled designer receptors, *J. Cell. Biochem.* 114 (2013) 681–696.
- [9] G. Thiel, O.G. Rössler, Resveratrol stimulates AP-1-regulated gene transcription, *Mol. Nutr. Food Res.* 58 (2014) 1402–1413.
- [10] G. Thiel, O.G. Rössler, Hyperforin activates gene transcription involving transient receptor potential C6 channels, *Biochem. Pharmacol.* 129 (2017) 96–107.
- [11] T.M. Backes, O.G. Rössler, X. Hui, C. Grötzinger, P. Lipp, G. Thiel, Stimulation of TRPV1 channels activates the AP-1 transcription factor, *Biochem. Pharmacol.* 150 (2018) 160–169.
- [12] A.J. Whitmarsh, S.H. Yang, M.S.S. Su, A.D. Sharrocks, R.J. Davis, Role of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in the activation of ternary complex factors,

- Mol. Cell. Biol. 17 (1997) 2360–2371.
- [13] S.H. Yang, A.J. Whitmarsh, R.J. Davis, A.D. Sharrocks, Differential targeting of MAP kinases to the ETS-domain transcription factor Elk-1, *EMBO J.* 17 (1998) 1740–1749.
- [14] R. Janknecht, W.H. Ernst, V. Pingoud, A. Nordheim, Activation of ternary complex factor Elk-1 by MAP kinases, *EMBO J.* 12 (1993) 5097–5104.
- [15] S.I. Mayer, O.G. Rössler, T. Endo, P. Charnay, G. Thiel, Epidermal growth factor-induced proliferation of astrocytes requires Egr transcription factors, *J. Cell. Sci.* 122 (2009) 3340–3350.
- [16] P. Costello, R. Nicolas, J. Willoughby, B. Wasyluk, A. Nordheim, R. Treisman, Ternary complex factors SAP-1 and Elk-1, but not Net, are functionally equivalent in thymocyte development, *J. Immunol.* 185 (2010) 1082–1092.
- [17] Z. Odrowaz, A.D. Sharrocks, ELK1 uses different DNA binding modes to regulate functionally distinct classes of target genes, *PLoS Genet.* 8 (2012) e1002694.
- [18] M. Patki, V. Chari, S. Sivakumaran, M. Gonit, R. Trumbly, M. Ratnam, The ETS domain transcription factor ELK1 directs a critical component of growth signaling by the androgen receptor in prostate cancer cells, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 11047–11055.
- [19] F. Gualdrini, C. Esnault, S. Horswell, A. Stewart, N. Matthews, R. Treisman, SRF Co-factors control the balance between cell proliferation and contractility, *Mol. Cell* 64 (2016) 1048–1061.
- [20] J. Boros, L.J. Donaldson, A. O'Donnell, Z.A. Odrowaz, L. Zeef, M. Lupien, C.A. Meyer, X.S. Liu, M. Brown, A.D. Sharrocks, Elucidation of the ELK1 target gene network reveals a role in the coordinate regulation of core components of the gene regulation machinery, *Genome Res.* 19 (2009) 1963–1973.
- [21] E. Bernal-Mizrachi, W. Wen, S. Srinivasan, A. Klenk, P. Cohen, M.A. Permutt, Activation of Elk-1, an Ets transcription factor, by glucose and EGF treatment of insulinoma cells, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 281 (2001) E1296–E1299.
- [22] S.I. Mayer, G. Thiel, Calcium influx into MIN6 insulinoma cells induces expression of Egr-1 involving extracellular signal-regulated protein kinase and the transcription factors Elk-1 and CREB, *Eur. J. Cell Biol.* 88 (2009) 19–33.
- [23] S.I. Mayer, I. Müller, S. Mannebach, T. Endo, G. Thiel, Signal transduction of pregnenolone sulfate in insulinoma cells, Activation of Egr-1 expression involving TRPM3, voltage-gated calcium channels, ERK, and ternary complex factors, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 10084–10096.
- [24] F. Cesari, S. Brecht, K. Vintersten, L.G. Vuong, M. Hofmann, K. Klingel, J.J. Schnorr, S. Arsenian, H. Schild, T. Herdegen, F.F. Wiebel, A. Nordheim, Mice deficient for the Ets transcription factor Elk-1 show normal immune responses and mildly impaired neuronal gene activation, *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 294–305.
- [25] H.E. Hohmeier, H. Mulder, G. Chen, R. Henkel-Rieger, M. Prentki, C.B. Newgard, Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive K⁺ channel-dependent and -independent glucose-stimulated insulin release, *Diabetes* 49 (2000) 424–430.
- [26] I. Müller, O.G. Rössler, G. Thiel, Pregnenolone sulfate activates basic region leucine zipper transcription factors in insulinoma cells: role of voltage-gated Ca²⁺ channels and transient receptor potential melastatin 3 channels, *Mol. Pharmacol.* 80 (2011) 1179–1189.
- [27] D.S. Langfermann, O.G. Rössler, G. Thiel, Stimulation of B-Raf increases c-Jun and c-Fos expression and upregulates AP-1-regulated gene transcription in insulinoma cells, *Mol. Cell. Endocrinol.* 472 (2018) 126–139.
- [28] L. Stefano, J. Al Sarraj, O.G. Rössler, C. Vinson, G. Thiel, Up-regulation of tyrosine hydroxylase gene transcription by tetradecanoylphorbol acetate is mediated by the transcription factors Ets-like protein-1 (Elk-1) and Egr-1, *J. Neurochem.* 97 (2006) 92–104.
- [29] O.G. Rössler, I. Henß, G. Thiel, Transcriptional response to muscarinic acetylcholine receptor stimulation: regulation of Egr-1 biosynthesis by ERK, Elk-1, MKP-1, and calcineurin in carbachol-stimulated human neuroblastoma cells, *Arch. Biochem. Biophys.* 470 (2008) 93–102.
- [30] M. Ekcici, A. Keim, O.G. Rössler, M. Hohl, G. Thiel, Chromatin structure and expression of the AMPA receptor subunit GluR2 in human glioma cells: major role of REST and Sp1, *J. Cell. Biochem.* 113 (2012) 528–543.
- [31] G. Thiel, M. Ulrich, N. Mukaida, O.G. Rössler, Resveratrol stimulation induces interleukin-8 gene transcription via NF- κ B, *Pharmacol. Res.* 134 (2018) 238–245.
- [32] D. Spohn, O.G. Rössler, S.E. Philipp, M. Raubuch, S. Kitajima, D. Griesemer, M. Hoth, G. Thiel, Thapsigargin induces expression of activating transcription factor 3 in human keratinocytes involving Ca²⁺ ions and c-Jun N-terminal protein kinase, *Mol. Pharmacol.* 78 (2010) 865–876.
- [33] O.G. Rössler, A. Lesch, G. Thiel, Combining fibroblast isolation with lentiviral gene transfer to validate transgene expression in mice following pronucleus injection, *Transgenic Res.* 25 (2016) 839–846.
- [34] D. Milo-Landesman, M. Surana, I. Berkovich, A. Compagni, G. Christofori, N. Fleischer, S. Efrat, Correction of hyperglycemia in diabetic mice transplanted with reversibly immortalized pancreatic β cells controlled by the tet-on regulatory system, *Cell Transplant.* 10 (2001) 645–650.
- [35] I. Müller, O.G. Rössler, C. Wittig, M.D. Menger, G. Thiel, Critical role of Egr transcription factors in regulating insulin biosynthesis, blood glucose homeostasis and islet size, *Endocrinology* 153 (2012) 3040–3053.
- [36] A. Keim, O.G. Rössler, T.L. Rothhaar, G. Thiel, Arsenite-induced apoptosis of human neuroblastoma cells requires p53 but occurs independently of c-Jun, *Neuroscience* 206 (2012) 25–38.
- [37] A.H. Ayadi, H. Zheng, P. Sobieszczuk, G. Buchwalter, P. Moerman, K. Alitalo, B. Wasyluk, Net-targeted mutant mice develop a vascular phenotype and up-regulate egr-1, *EMBO J.* 20 (2001) 5139–5152.
- [38] P.S. Costello, R.H. Nicolas, Y. Watanabe, I. Rosewell, R. Treisman, Ternary complex factor SAP-1 is required for Erk-mediated thymocyte positive selection, *Nat. Immunol.* 5 (2004) 289–298.
- [39] R. Eldor, A. Yeffe, K. Baum, V. Doviner, D. Amar, Y. Ben-Neriah, G. Christofori, A. Peled, J.C. Carel, C. Boitard, T. Klein, P. Serup, D.L. Eizirik, D. Melloul, Conditional and specific NF- κ B blockade protects pancreatic beta cells from diabetogenic agents, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (2006) 5072–5077.
- [40] D. Sever, R. Eldor, G. Sadoun, L. Amior, D. Dubois, C. Boitard, C. Afalo, D. Melloul, Evaluation of impaired beta-cell function in nonobese-diabetic (NOD) mouse model using bioluminescence imaging, *FASEB J.* 25 (2011) 676–684.
- [41] P. Marchetti, S. Del Guerra, L. Marselli, R. Lupi, M. Masini, M. Pollera, M. Bugliani, U. Boggi, F. Vistoli, F. Mosca, S. Del Prato, Pancreatic islets from type 2 diabetic patients have functional defects and increased apoptosis that are ameliorated by metformin, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89 (2004) 5535–5541.
- [42] J.J. Meier, T.G.K. Breuer, R.C. Bonadonna, A. Tannapfel, W. Uhl, W.E. Schmidt, H. Schrader, B.A. Menge, Pancreatic diabetes manifests when beta cell area declines by approximately 65% in humans, *Diabetologia* 55 (2012) 1346–1354.
- [43] J.J. Meier, Beta cell mass in diabetes: a realistic therapeutic target? *Diabetologia* 51 (2008) 703–713.
- [44] Z. Liu, K. Tanabe, E. Bernal-Mizrachi, M.A. Permutt, Mice with beta cell over-expression of glycogen synthase kinase-3 β have reduced beta cell mass and proliferation, *Diabetologia* 51 (2008) 623–631.
- [45] J. Cantley, A. Davenport, L. Vetterli, N.J. Nemes, P.T. Withworth, E. Boslem, L.M. Thai, N. Mellett, P.J. Meikle, K.L. Hoehn, D.E. James, T.J. Biden, Disruption of beta cell acetyl-CoA carboxylase in mice impairs insulin secretion and beta cell mass, *Diabetologia* 62 (2019) 99–111.
- [46] E. Bernal-Mizrachi, W. Wen, S. Stahlhut, C.M. Welling, M.A. Permutt, Islet β cell expression of constitutively active Akt1/PKB α induces striking hypertrophy, hyperplasia, and hyperinsulinemia, *J. Clin. Invest.* 108 (2001) 1631–1638.
- [47] B.L. Stiles, C. Kuralwala-Martinez, W. Guo, C. Gregorian, Y. Wang, J. Tian, M.A. Magnuson, H. Wu, Selective deletion of *Pten* in pancreatic β cells leads to increased islet mass and resistance to STZ-induced diabetes, *Mol. Cell. Biol.* 26 (2006) 2772–2781.
- [48] A.-F. Close, N. Dadheech, B.S. Vilella, C. Rouillard, J. Buteau, The orphan nuclear receptor Nor1/Nr4a3 is a negative regulator of β -cell mass, *J. Biol. Chem.* 294 (2019) 4889–4897.
- [49] J. Moitra, M.M. Mason, M. Olive, D. Krylov, O. Gavrilova, B. Marcus-Samuels, L. Feigenbaum, E. Lee, T. Aoyama, M. Eckhaus, M.L. Reitman, C. Vinson, Life without white fat: a transgenic mouse, *Genes Dev.* 12 (1998) 3168–3181.
- [50] C. Ménard, P. Hein, A. Paquin, A. Savelson, X.M. Yang, D. Lederfein, F. Barnabé-Heider, A.A. Mir, E. Sterneck, A.C. Peterson, P.F. Johnson, C. Vinson, F.D. Miller, An essential role for a MEK-C/EBP pathway during growth factor-regulated cortical neurogenesis, *Neuron* 36 (2002) 597–610.
- [51] L. Qi, M. Saberi, E. Zmuda, Y. Wang, J. Altarejos, X. Zhang, R. Dentin, S. Hedrick, G. Bandyopadhyay, T. Hai, M. Montminy, Adipocyte CREB promotes insulin resistance in obesity, *Cell Metabol.* 9 (2009) 277–286.
- [52] U.S. Jhala, G. Canetti, R.A. Sreanion, R.N. Kulkarni, S. Krajewski, J. Reed, J. Walker, X. Lin, M. White, M. Montminy, cAMP promotes pancreatic beta-cell survival via CREB-mediated induction of IRS2, *Genes Dev.* 17 (2003) 1575–1580.
- [53] H. Nomoto, T. Kondo, H. Miyoshi, A. Nakamura, Y. Hida, K.-i. Yamashita, A.J. Sharma, T. Atsumi, Inhibition of small maf function in pancreatic β -cells improves glucose tolerance through the enhancement of insulin gene transcription and insulin secretion, *Endocrinology* 156 (2015) 3570–3580.
- [54] T. Nir, D.A. Melton, Y. Dor, Recovery from diabetes in mice by β cell regeneration, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 2553–2561.
- [55] B. Wicksteed, M. Brissova, W. Yan, D.M. Opland, J.L. Plank, R.B. Reinert, L.M. Dickson, N.A. Tamarina, L.H. Philipson, A. Shostak, E. Bernal-Mizrachi, L. Elghazi, M.W. Roe, P.A. Labosky, M.G.M. yers Jr., M. Gannon, A.C. Powers, P.J. Depsey, Conditional gene targeting in mouse pancreatic β -cells: analysis of ectopic Cre transgene expression in the brain, *Diabetes* 59 (2010) 3090–3098.
- [56] E. Bernal-Mizrachi, C. Cras-Méneur, B.R. Ye, J.D. Johnson, M.A. Permutt, Transgenic overexpression of active calcineurin in β -cells results in decreased β -cell mass and hyperglycemia, *PLoS One* 5 (2010) e11969.
- [57] A. Vetere, A. Choudhary, S.M. Burns, B.K. Wagner, Targeting the pancreatic β -cell to treat diabetes, *Nature Rev. Drug Discov.* 13 (2014) 278–289.
- [58] T.V. Fiorentino, F. Casiraghi, A.M. Davalli, G. Finzi, S. La Rosa, P.B. Higgins, G.A. Abrahamian, A. Marando, F. Sessa, C. Peregó, R. Guardado-Mendoza, S. Kamath, A. Ricotti, P. Fiorina, G. Daniele, A.M. Paez, F. Andreozzi, R.A. Bastarrachea, A.G. Comuzzie, A. Gastaldelli, A.O. Chavez, E.S. Di Cairano, P. Frost, L. Luzi, E.J. Dick, G.A. Half, R.A. DeFronzo, F. Folli, Exenatide regulates pancreatic islet integrity and insulin sensitivity in the nonhuman primate baboon *Papio hamadryas*, *J. Clin. Invest.* 129 (2019) e93091.
- [59] M.N. Poy, J. Hausser, M. Trajkovski, M. Braun, S. Collins, P. Rorsman, M. Zavalan, M. Stoffel, miR-375 maintains normal pancreatic α - and β -cell mass, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (2009) 5813–5818.
- [60] K.R. Cordes, N.T. Sheehy, M.P. White, E.C. Berry, S.U. Morton, A.N. Muth, T.-H. Lee, J.M. Miano, K.N. Ivey, D. Srivastava, miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity, *Nature* 460 (2009) 705–710.

11. Lebenslauf

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

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