



# Entwicklung von 2D- und 3D-zellbasierten Testsystemen für die Analyse von TRPV1-spezifischen Wirkstoffen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN  
(Dr. rer. nat.)

der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften  
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte  
DISSERTATION  
von

**M.Sc. Katharina Christine Jakob-Obeid**

aus  
Saarlouis

KIT-Dekan: Prof. Dr. Willem Klopper

Referent: Prof. Dr. Reinhard Fischer

Korreferent: Prof. Dr. Petra Kioschis

Tag der mündlichen Prüfung: 26.04.2017



Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons Namensnennung -  
Weitergabe unter gleichen Bedingungen 4.0 International Lizenz (CC BY-SA 4.0):  
<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/deed.de>

# INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis.....	1
Zusammenfassung .....	2
1. Einleitung.....	4
1.1 Die Familie der TRP-Ionenkanäle .....	4
1.2 Der polymodale TRPV1-Ionenkanal.....	6
1.2.1 Aufbau, Struktur und Lokalisation.....	6
1.2.2 TRPV1-Agonisten.....	8
1.2.3 TRPV1-Antagonisten.....	11
1.2.4 TRPV1 in Physiologie und Pathologie .....	12
1.2.4.1 TRPV-Ionenkanäle, $[Ca^{2+}]_i$ und Tumorentwicklung .....	13
1.2.4.2 Der TRPV1-Ionenkanal als pharmakologisches Zielmolekül .....	18
1.3 Entwicklung zellulärer Testsysteme für die Wirkstoffentwicklung.....	21
1.3.1 Zellmodelle mit Tetrazyklin-regulierbarer Genexpression.....	23
1.3.2 3D-Zellkulturen in der Wirkstoffentwicklung.....	25
1.6 Zielsetzung der Arbeit .....	29
2. Material & Methoden:.....	32
2.1 Materialien .....	32
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	40
2.3 Proteinanalytische Methoden.....	44
2.4 Zellbiologische Methoden .....	46
2.5 Fluoreszenzmikroskopische und Mikroplattenreader-basierte Methoden .....	50
2.6 Statistische Analyse .....	58
3. Ergebnisse.....	59
3.1 Tet-induzierbare Zelllinien mit Expression von humanem TRPV1 .....	59
3.2 Zellklone mit optimal regulierter TRPV1 Expression .....	60
3.3 Charakterisierung der generierten CHO- <sup>I-hTRPV1</sup> Zelllinie.....	65
3.3.1 Nachweis der Expression des Fusionsproteins mittels Western Blot .....	65
3.3.2 Intrazelluläre Lokalisation des hTRPV1-mCherry-Proteins.....	66
3.3.3 Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der induzierten hTRPV1-mCherry-Expression.....	67
3.3.4 Aktivierbarkeit und Inhibierbarkeit des TRPV1-mCherry-Ionenkanals.....	69
3.3.5 Hitzeaktivierung des hTRPV1-mCherry Ionenkanals.....	70
3.3.6 Einfluss der Expression und Aktivierung des hTRPV1-mCherry-Ionenkanals auf die Viabilität der CHO- <sup>I-hTRPV1</sup> -Zellen .....	71
3.4 Fluorimetrischer zellulärer Calcium-Assay für pharmakologische Analysen des TRPV1-Ionenkanals.....	74

3.4.1 Mikrotiterplatten-basierte Calcium-Assays zur Analyse selektiver TRPV1-Agonisten und -Antagonisten .....	74
3.4.2 Qualität des entwickelten Calcium-Assays .....	77
3.5 Pharmakologische Analyse von TRPV1-Agonisten und -Antagonisten.....	78
3.6 3D-Sphäroid-Zellmodell mit Tet-induzierbarer TRPV1-Expression .....	81
3.6.1 Doxyzyklin-abhängige Induktion der hTRPV1-mCherry-Expression im Sphäroid-Zellmodell.....	83
3.6.2 hTRPV1-mCherry-Expression im CHO <sup>-I-hTRPV1</sup> -Sphäroid-Zellmodell.....	84
3.6.3 Capsaicin-induzierte Erhöhung der [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> in Sphäroiden .....	85
3.7 Fluorimetrischer Calcium-Assay für pharmakologische Analysen im TRPV1-Sphäroid-Zellmodell .....	86
3.7.1 Messung der [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> in Sphäroiden im Plattenreader.....	86
3.7.2 Einfluss der Sphäroidgröße im fluorimetrischen Calcium-Assay .....	87
3.7.3 Qualität des Calcium-Assays für Analysen von CHO <sup>-I-hTRPV1</sup> -Sphäroiden	88
3.8 Pharmakologische Analyse von TRPV1-Agonisten und -Antagonisten im CHO <sup>-I-hTRPV1</sup> -Sphäroid-Zellmodell .....	89
3.9 Vergleich der pharmakologischen Aktivität der TRPV1-Wirkstoffe im Monolayer- und 3D-Sphäroid Zellmodell.....	91
3.10 Brustkrebs-Zellmodelle für die pharmakologische Untersuchung von TRPV1-spezifischen Wirkstoffen .....	95
3.10.1 TRPV1-vermittelte Calcium-Antwort in 2D-Brustkrebs-Zelllinien .....	96
3.10.2 Herstellung von 3D-Sphäroiden aus Brustkrebszelllinien .....	108
4. Diskussion .....	113
4.1 CHO-Zellmodell mit regulierter Expression des humanen TRPV1 .....	114
4.2 Entwicklung und Validierung des 2D-CHO <sup>-I-hTRPV1</sup> -Testsystems.....	117
4.3 Entwicklung und Validierung des 3D-CHO <sup>-I-hTRPV1</sup> -Testsystems .....	125
4.5 Krankheitsrelevante Zellmodelle mit endogener TRPV1-Expression .....	128
4.6 Schlussfolgerung .....	130
Literaturverzeichnis .....	131
Danksagung .....	151

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	intrazelluläre Calciumkonzentration
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
BCTC	N-(4-tertiarybutylphenyl)-4-(3-chloropyridin-2-yl)-tetrahydropyrazine-1 (2H)-carbox-amid
EC <sub>50</sub>	mittlere effektive Konzentration
HTS	Highthroughput Screening
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
MTP	Mikrotiterplatte
MW	Mittelwert
NADA	N-Arachidonoyl-dopamine
NOD	N-Octanyl-dopamine
RR	Ruthenium Red
RTX	Resiniferatoxin
SF	Standardfehler
Stabw	Standardabweichung
TRP	Transient Rezeptor Potenzial
TRPV1	Transient Rezeptor Potenzial Vanilloid 1
ULA	Ultra Low Attachment

## ZUSAMMENFASSUNG

TRPV1 ist ein polymodal aktivierbarer Kationenkanal, der neben der Nozizeption an vielen weiteren zellulären Prozessen beteiligt ist. Fehlfunktionen oder eine gestörte Regulation des TRPV1-Ionenkanals sind mit verschiedenen Krankheiten, wie beispielsweise Arthritis, Atemwegserkrankungen, Blasenfunktionsstörungen, Diabetes, entzündliche Darmerkrankungen und Tumoren assoziiert. Aufgrund seiner vielfältigen Funktionen in Physiologie und Pathophysiologie stellt der TRPV1-Ionenkanal ein attraktives pharmakologisches Zielmolekül für die Wirkstoffentwicklung dar. Für den TRPV1-Ionenkanal wurden bereits Agonisten und Antagonisten entwickelt, die jedoch aufgrund von Nebenwirkungen klinisch nicht einsetzbar sind. Die Nutzung des TRPV1-Ionenkanals als therapeutisches Zielmolekül bedingt daher die Entwicklung neuer TRPV1-spezifischer Wirkstoffe. Für die Identifizierung und Validierung werden geeignete Testsysteme benötigt, die eine hohe Aussagekraft hinsichtlich der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die *in vivo* Situation besitzen.

Dazu wurden in der vorliegenden Dissertation zellbasierte 2D-Monolayer und 3D-Sphäroid-Testsysteme entwickelt, mit denen pharmakologische Aktivitäten von neuen TRPV1-spezifischen Substanzen direkt im zellulären Kontext analysiert werden können. Für die Entwicklung der zellulären Assays wurde der humane TRPV1-Kanal als Fusionsprotein mit einem C-terminalen mCherry-Fluoreszenztag in einem Dozyklin-induzierbaren Expressionssystem (Tet-On 3G) in CHO-K1-Zellen stabil exprimiert (CHO<sup>-hTRPV1</sup>-Zellmodell). Die sehr gute Regulierbarkeit der TRPV1-Expressionshöhe wurde für verschiedene Dozyklin-Konzentration gezeigt. Die Wildtyp-CHO-K1-Zellen exprimieren keinen endogenen TRPV1-Ionenkanal, so dass TRPV1-vermittelte zelluläre Antworten auf den heterolog exprimierten, humanen TRPV1-Ionenkanal (hTRPV1) zurückgeführt werden konnten. Durch Aktivierung bzw. Inhibierung des TRPV1-Ionenkanals und der fluorimetrischen Messung der damit verbundenen Änderung der intrazellulären Calcium-Konzentration  $[Ca^{2+}]_i$  konnte nachgewiesen werden, dass der heterolog exprimierte hTRPV1-Ionenkanal im CHO-Zellmodell funktionell exprimiert wird. Die Calcium-Messungen wurden sowohl fluoreszenzmikroskopisch auf Einzelzellebene als auch in einem Mikroplattenreader-

basierten Assay durchgeführt. Mit Hilfe des mCherry-Fusionsproteins wurde gezeigt, dass der hTRPV1-Ionenkanals in den CHO-Zellen in der Plasmamembran sowie in Endomembranen lokalisiert, was der subzellulären Lokalisation des endogenen hTRPV1-Ionenkanals entspricht. Die Validierung der zellulären 2D- und 3D-CHO<sup>-I-hTRPV1</sup>-Testsysteme erfolgte über die Analyse von Dosis-Wirkungs-Beziehungen mit jeweils fünf bekannten Agonisten und Antagonisten des TRPV1-Ionenkanals. Die ermittelten pharmakologischen Eigenschaften des rekombinanten TRPV1-mCherry-Fusionsproteins sind mit in der Literatur beschriebenen Eigenschaften von endogen bzw. heterolog exprimierten TRPV1-Ionenkanälen vergleichbar. Im Vergleich der 2D- und 3D-Testsysteme wurden im Sphäroid-Zellmodell signifikant niedrigere EC<sub>50</sub>-Werte für die Agonisten Capsaicin, RTX und NOD, als auch eine höhere Maximalwirkung für NADA, RTX und NOD ermittelt. Zwei Antagonisten (SB-366791 und RR) zeigten im 3D-Sphäroid-Modell eine signifikant niedrigere inhibitorische Potenz als im Monolayer.

Zusätzlich zur pharmakologischen Validierung wurde durch die Bestimmung des Z'-Faktors das Potenzial der entwickelten 2D- und 3D-CHO<sup>-I-hTRPV1</sup>-Testsysteme für den Einsatz als Hochdurchsatz-Screening-System für die Wirkstoffsuche beurteilt. Für das 2D-Testsystem wurde ein Z'-Wert von  $0,66 \pm 0,09$  ermittelt, was den Assay als ein sehr gutes Testsystem für die Wirkstofffindung in Hochdurchsatzverfahren ausweist. Für das 3D-Testsystem wurde ein Z'-Faktor von  $0,45 \pm 0,05$  ermittelt, der zwar niedriger als der Z'-Faktor des 2D-Testsystems ist, aber noch die minimalen Anforderungen an ein Hochdurchsatz-Screening-Verfahren erfüllt. Zusammenfassend belegen die Ergebnisse, dass das hier entwickelte CHO<sup>-I-hTRPV1</sup>-Zellmodell in Verbindung mit der fluorimetrischen Messung der  $[Ca^{2+}]_i$  als sensitives 2D- und 3D-Testsystem für die pharmakologische Analyse von TRPV1-spezifischen Wirkstoffen entwickelt werden konnte.

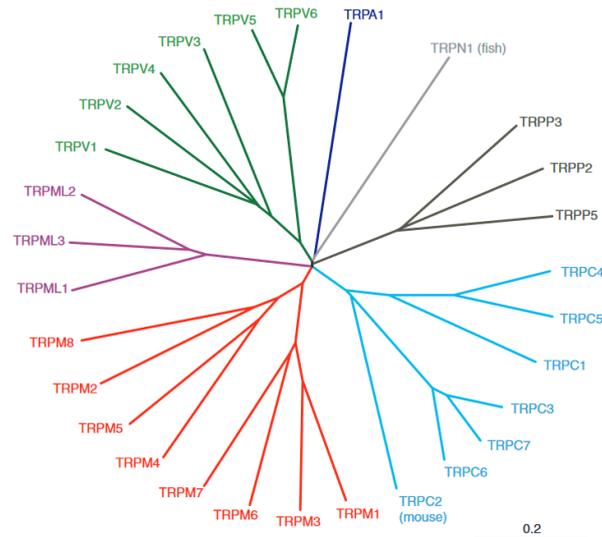
Für die Entwicklung krankheitsrelevanter TRPV1-Modelle wurden 2D- und 3D-Zellkulturmodelle von verschiedenen Brustkrebszelllinien etabliert und pharmakologisch hinsichtlich des TRPV1-Ionenkanals charakterisiert. Capsaicin-induzierte Calcium-Reaktionen konnten in allen getesteten Zelllinien nachgewiesen werden. Eine TRPV1-vermittelte Erhöhung der Viabilität wurde in zwei Brustkrebszelllinien unabhängig des Kultivierungssystems (2D vs. 3D) detektiert.

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Die Familie der TRP-Ionenkanäle

Der Transient Rezeptor Potenzial (TRP)-Kanal wurde im Jahr 1989 in Photorezeptorzellen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* identifiziert und kloniert (Montell & Rubin, 1989). Dort ist er in der Phototransduktion involviert und führt durch einen Phospholipase C (PLC)-abhängigen  $Ca^{2+}$ -Einstrom zu einem langanhaltenden Rezeptorpotenzial. Eine Mutante im *trp*-locus zeigte statt des langanhaltenden Rezeptorpotenzials nur einen transienten, worin der Name *transient receptor potential* begründet ist (Cosens & Manning, 1969).

Seit der ersten Klonierung 1989 wurde eine große Anzahl weiterer Mitglieder der TRP-Familie beschrieben, die vor allem aufgrund von Aminosäuresequenz-Homologien identifiziert wurden und eine Superfamilie von nicht-selektiven Kationenkanälen bilden (Clapham, 2003). Alle Mitglieder der TRP-Kanal-Superfamilie sind durch sechs Transmembrandomänen charakterisiert, besitzen eine Porenregion zwischen dem fünften und sechsten Transmembransegment und weisen intrazelluläre C- sowie N-Termini auf. Bis heute sind insgesamt acht TRP-Familien bekannt, wovon sechs in Säugern exprimiert werden: TRPC (canonical oder classic), TRPA (ankyrin), TRPM (melastatin), TRPP (polycystin), TRPV (vanilloid), und TRPML (mucolipin) (Abb. 1). Die TRPN (NOMP-C homologues)-Familie wurde in Wirbellosen wie Fliegen und Würmer beschrieben (Walker, 2000), wie auch in Haarzellen des Gehörs des Vertebraten Zebrafisch (Sidi *et al.*, 2003). TRPY wird in Hefen und anderen Pilzen exprimiert (Palmer *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2005). Die einzelnen Klassen unterscheiden sich anhand ihrer Sequenzhomologien und Permeabilitäten für Kationen. Im Menschen sind 28 Mitglieder der humanen TRP-Kanalfamilie identifiziert, die in unterschiedlichen Geweben und Zelltypen exprimiert sind.

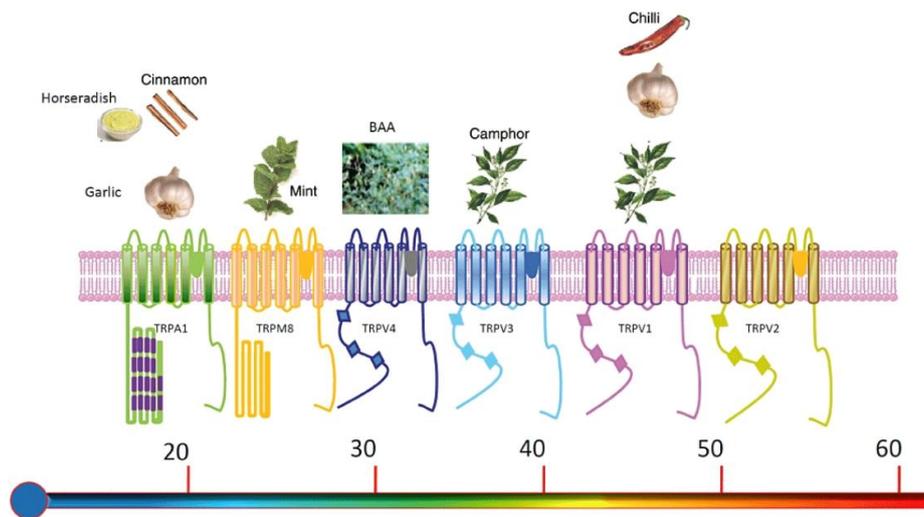


**Abbildung 1: Phylogenetischer Baum der TRP-Familie im Menschen.** Basierend auf Sequenzhomologien werden für den Menschen sechs Subfamilien klassifiziert. Innerhalb der jeweiligen Subfamilien bestehen sehr ähnliche Sequenzcharakteristika, die zwischen den Familien deutlich geringer sind. TRPC2 ist ein Pseudogen im Menschen. TRPNs sind in Säugetieren nicht vorhanden. Um die Sequenzverwandtschaften aller TRP-Subfamilien abzubilden, wurden in der Analyse diese beiden Gene mit dem murinen TRPC2 und dem Fisch-TRPN1 substituiert. Die Längen der Zweige sind in PAM (Point Accepted Mutations)-Einheiten dargestellt. Diese sind die Mittelwerte der Anzahl der Substitutionen auf 100 Aminosäuren. (Nilius & Owsianik, 2011)

TRP-Kanäle sind Sensoren unterschiedlicher Stimuli. Darunter gehören Licht (Montell & Rubin, 1989; Hardie & Minke, 1992; Xue *et al.*, 2011), Gerüche (Liman *et al.*, 1999; Kwon *et al.*, 2010), Geschmack (Zhang *et al.*, 2003; Jordt *et al.*, 2000), Temperatur (Caterina *et al.*, 1997; McKemy *et al.*, 2002), Schwerkraft (Sun *et al.*, 2009), akustische Reize (Sidi *et al.*, 2003) und mechanische Stimuli (Li *et al.*, 2011). Sie werden auch durch eine Reihe von Naturstoffen aktiviert. Beispielsweise wird TRPM8 durch Menthol, einem zyklischen Terpenalkohol in Minzblättern, aktiviert (McKemy *et al.*, 2002). Eugenol, Bestandteil des Gewürznelkenöls, aktiviert TRPV1 (Yang *et al.*, 2003), TRPV3 (Xu *et al.*, 2006), TRPM8 (Behrendt *et al.*, 2004) und TRPA1 (Bandell *et al.*, 2004). Der bekannteste TRPV1-Aktivator ist das Alkaloid Capsaicin, das in verschiedenen Paprika- und Chillisorten vorkommt (Caterina *et al.*, 1997). Auch Spinnengifte modulieren die Aktivität von TRP-Kanälen. TRPV1 kann durch sie aktiviert werden (Siemens *et al.*, 2006), während TRPA1 inhibiert wird (Gui *et al.*, 2014).

Ein Teil der TRP-Kanäle reagiert auf unterschiedliche Temperaturen und deshalb werden diese als Thermo-TRP-Kanalfamilie zusammengefasst. Dazu gehören TRPV1 (>43°C) (Caterina *et al.*, 1997), TRPV2 (>52°C) (Caterina *et al.*, 1999),

TRPV3 (32°C-39°C) (Xu *et al.*, 2002), TRPV4 (27°C-34°C) (Guler *et al.*, 2002), TRPM8 (25°C -34°C) (McKemy *et al.*, 2002) und TRPA1 (< 17°C) (Story *et al.*, 2003) (Abb. 2). In 2016 wurde von Song *et al.* der TRPM2 als weiterer Thermokanal beschrieben, der bei Temperaturen über 39°C in bestimmten Hirnarealen des Hippocampus aktiviert wird. Es wird vermutet, dass dieser Kanal die entsprechenden Mechanismen und Signalkaskaden zur Fiebersenkung auslöst (Song *et al.*, 2016).



**Abbildung 2: Übersicht über die Thermo-TRP-Kanäle.** Diese Kanäle werden durch unterschiedliche Temperaturen von extrem heiß bis kühl aktiviert. Einige Kanäle werden von bekannten Naturstoffen aktiviert, welche hier dargestellt sind. Die Kanäle werden in der Regel aus vier Monomeren aufgebaut, die jeweils sechs Transmembrandomänen (S1-S6) aufweisen. S5 und S6 bilden die Pore aus. Die N- und C-termini liegen intrazellulär und weisen in der Regel Bindungsdomänen für andere Proteine, sowie Agonisten und Antagonisten auf (Vay *et al.*, 2012). TRPM2 ist in dieser Abbildung nicht dargestellt.

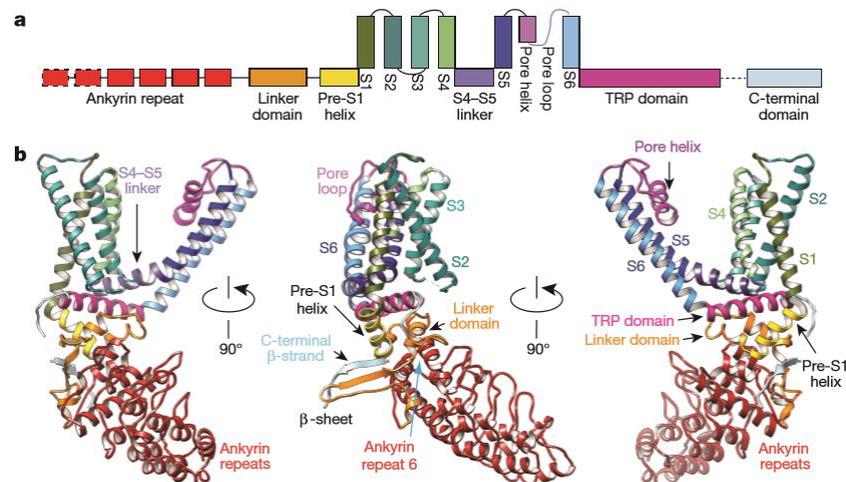
## 1.2 Der polymodale TRPV1-Ionenkanal

### 1.2.1 Aufbau, Struktur und Lokalisation

Im Jahr 2000 haben Hayes und Kollegen den humanen TRPV1-Ionenkanal identifiziert (Hayes *et al.*, 2000). Er ist der TRPV-Unterfamilie der Ionenkanäle zugeordnet, die insgesamt aus sechs Mitgliedern besteht: TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPV5 und TRPV6. Das humane *trpv1* Gen ist auf Chromosom 17p13 lokalisiert, beinhaltet 17 Exons und kodiert für ein 839 Aminosäuren großes Protein (Birbaumer *et al.*, 2003). Postrtranslationale Phosphorylierungen durch

Proteinkinasen spielen eine wichtige Rolle in der Sensibilisierung des TRPV1-Ionenkanal gegenüber Agonisten, Hitze und Protonen (Mandadi *et al.*, 2006).

TRPV1 ist ein tetramerer Ionenkanal, dessen Untereinheit aus sechs Transmembrandomänen (S1-S6) aufgebaut ist (Abb.3).



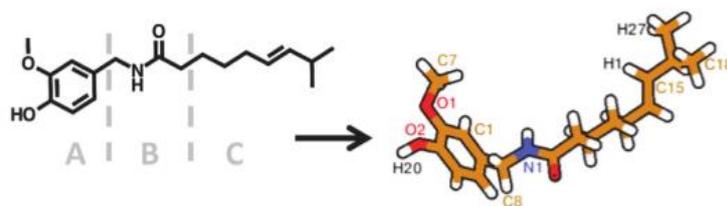
**Abbildung 3: Struktur und Aufbau des polymodalen Ionenkanals TRPV1.** a) Darstellung der wichtigsten strukturellen Domänen eines Monomers. b) Bändermodell eines Monomers aus drei verschiedenen Ansichten. Der Farbcode entspricht den in a) dargestellten Domänen. (Liao *et al.*, 2013)

Die N- und C-termini sind intrazellulär im Cytoplasma lokalisiert (Caterina *et al.*, 1997). Am N-terminus befindet sich eine Ankyrin Repeat Domäne, die sechs Ankyrin Repeats aus jeweils 33 Aminosäuren enthält. Die Domäne besitzt eine Multi-Liganden-Bindungsstelle für Calmodulin und ATP, die durch ihre Bindung die Sensitivität und Tachyphylaxie des Kanals beeinflussen (Lishko *et al.*, 2007). Der C-Terminus enthält die TRP-Domäne, die in der Tetramerisierung der Rezeptor-Untereinheiten zu einem funktionellen Ionenkanal involviert ist (Garcia-Sanz *et al.*, 2004). Die Segmente S5, S6 und die Porenschleife bilden im Tetramer die wassergefüllte Pore des Ionenkanals. Aminosäurereste in der S5 und S6 Region (Selektivitätsfilter) sind für die Ionenselektivität des Kanals verantwortlich (Liao *et al.*, 2013). Als nicht-selektiver Kationenkanal zeigt TRPV1 eine nahezu gleiche Durchlässigkeit für die monovalenten Kationen  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Li}^+$  und  $\text{Rb}^+$  (Oh *et al.*, 1996), wohingegen die Durchlässigkeit für divalente Kationen (wie Calcium und Magnesium) höher ist als die von Natrium, im Verhältnis von  $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} \approx 10$  und  $P_{\text{Mg}}/P_{\text{Na}} \approx 5$  (Caterina *et al.*, 1997). Der Ionenkanal verfügt über zwei Porenengstellen (Gate 1 und Gate 2), die allosterisch miteinander gekoppelt sind. Der obere Gate

(G1) liegt in der Nähe des Selektivitätsfilters im äußeren Bereich der Pore. Der untere Gate (G2) beschreibt eine weitere Engstelle, an der die S6-Helices der TRPV1-Untereinheiten eines Tetramers einen hydrophoben Bereich („seal“) bilden. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von TRPV1-Ionenkanälen mit großen strukturellen Änderungen der beiden Gates („duales gating“) einhergeht, was schließlich zum Ionentransport ins Cytoplasma führt (Liao *et al.*, 2013; Cao *et al.*, 2013). In Abhängigkeit von Zeit und Agonist-Konzentration führt die TRPV1-Aktivierung zu einer Änderung der relativen Permeabilität der Kanalpore („pore dilation“), so dass auch größere Kationen wie NMDG<sup>+</sup> (192,5Da) oder YO-PRO1 (376Da) ins Cytoplasma gelangen können (Chung *et al.*, 2008). Eine konstante Reizung des Ionenkanals sowie wiederholte Stimulation führen zur Desensibilisierung bzw. Tachyphylaxie. Als Folge kann der Kanal zeitweise weder durch Capsaicin noch durch andere chemische Agonisten aktiviert werden (Tominaga *et al.*, 1998; Schwarz *et al.*, 2000). TRPV1 Ionenkanäle lokalisieren in der Plasmamembran als auch in der Membran des endoplasmatischen Retikulums und in cytoplasmatischen Vesikeln (Gallego-Sandin *et al.*, 2009; Caterina *et al.*, 1997). Sie nehmen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der intrazellulären Calciumkonzentration ein.

### **1.2.2 TRPV1-Agonisten**

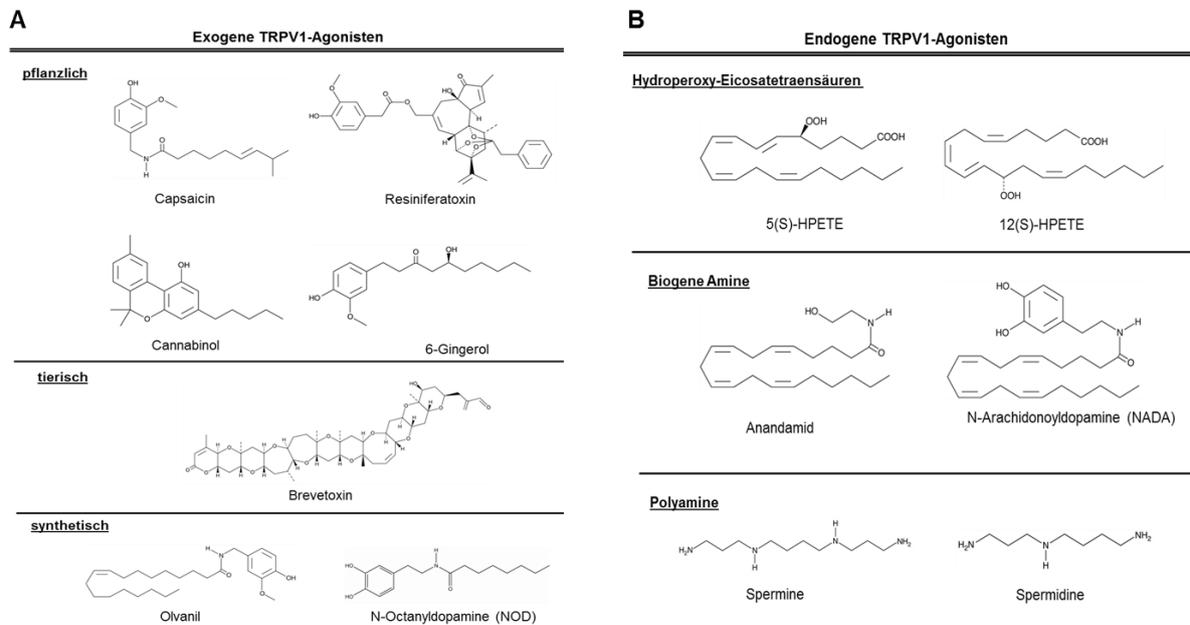
Als polymodaler Ionenkanal wird TRPV1 von unterschiedlichsten Stimuli aktiviert. Der bekannteste Agonist ist der scharfe Inhaltsstoff der Chillischote (Gattung *Capsaicum*), das Vanilloid Capsaicin. Capsaicin (8-Methyl-N-vanillyl-*trans*-6-nonenamid) besteht aus drei funktionellen Gruppen: ein aromatischer Ring (A), eine Amidbindung (B) und eine hydrophobische Seitenkette (C) (Abb.4) (Walpole *et al.*, 1993).



**Abbildung 4: Capsaicin-Strukturformel.** Das Molekül lässt sich in drei funktionelle Gruppen unterteilen: aromatischer Ring (A), eine Amidbindung (B) und eine hydrophobe Seitenkette (C) (Hanson *et al.*, 2015)

Durch Mutationsstudien und durch die Untersuchung von Cryo-elektronenmikroskopischer Strukturen wurde nachgewiesen, dass das lipophile Capsaicin an den Transmembrandomänen S3 und S4 in der sogenannten Vanilloid-Bindetasche an der intrazellulären Seite des Ionenkanals bindet (Cao *et al.*, 2013; Hanson *et al.*, 2015). Der aromatische Ring des Capsaicin-Moleküls interagiert dort mit dem Thyrosin 511 (Y511) des TRPV1 und die lipophile Seitenkette mit unspezifischen hydrophoben Aminosäureresten (Hanson *et al.*, 2015; Jordt & Julius, 2002).

Neben Capsaicin gibt es noch weitere sogenannte exogene Agonisten des TRPV1 Ionenkanals (Abb.5 A). Dazu gehören unter anderem Resiniferatoxin (RTX), ein Bestandteil des Wolfsmilchgewächses *Euphorbia resinifera* (Szallasi & Blumberg, 1989), Olvanil, ein synthetisch hergestelltes Capsaicin-Analog (Appendino *et al.*, 2005) und N-Octanyldopamin, ein N-Acyldopamin-Derivat (Tsagogiorgas *et al.*, 2012). Auch Substanzen tierischen Ursprungs aktivieren den Ionenkanal. Als Beispiele sind Brevetoxin, das Gift mariner Schalentiere, sowie Vanillotoxine verschiedener Spinnenarten zu nennen (Cuypers *et al.*, 2007; Siemens *et al.*, 2006). Es wurde nachgewiesen, dass diese Stoffe nicht in der Vanilloid-Bindetasche mit dem Ionenkanal interagieren, sondern an der extrazellulären Porenregion der Transmembrandomänen TM5 und TM6 (Bohlen *et al.*, 2010; Cao *et al.*, 2013).



**Abbildung 5: Strukturformeln exogener und endogener TRPV1-Agonisten.**

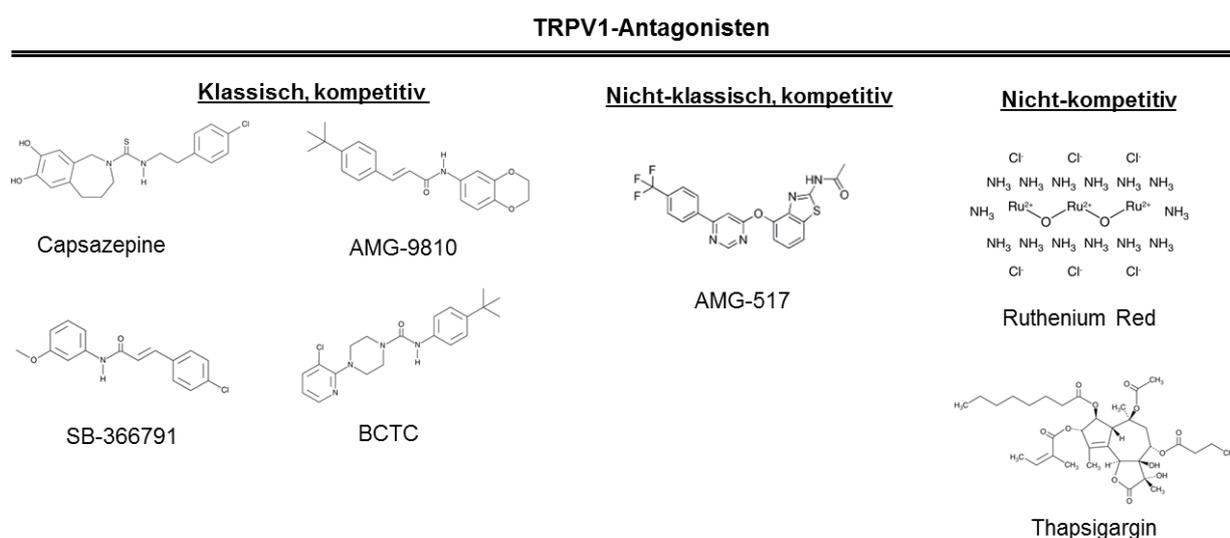
Des Weiteren wird TRPV1 von endogenen Substanzen (Endovanilloide) aktiviert (Abb.5 B). Anandamid (N-arachidonoyl Ethanolamine) und NADA (N-Arachidonoyldopamine) sind Derivate der Arachidonsäure und werden in Geweben des zentralen Nervensystems gebildet (Zygmunt *et al.*, 1999; Toth *et al.*, 2003). Lipoxygenasen wandeln Arachidonsäuren zu 5-(S), 8-(S), 12-(S) oder 15-(S)-Hydroperoxy-Eicosatetraensäuren (HPETEs), welche den Ionenkanal ebenfalls aktivieren (Hwang *et al.*, 2000). Daneben aktivieren weitere endogene Moleküle wie ATP, Spermin und Spermidine und Ammonium-Ionen den Ionenkanal (Vriens *et al.*, 2009).

Neben chemischen Reizen wird der TRPV1-Ionenkanal auch durch Protonen aktiviert (pH <5,3), durch eine Erhöhung der Temperatur (>43°C), dem intrazellulären Redox-Status und elektrische Ladungen (Veronesi, 2005). Die Bindestellen für Protonen liegen auf der extrazellulären Seite des Kanals an der Transmembrandomäne TM5 sowie der TM5 und TM6 verbindenden Porenschleife (Jordt *et al.*, 2000). Die strukturellen Mechanismen der Hitzeaktivierung sind noch nicht verstanden. Durch Mutationsstudien konnte allerdings nachgewiesen werden, dass der C-Terminus sowie die äußere Porenregion beteiligt sind (Grandl *et al.*, 2010; Brauchi *et al.*, 2006).

### 1.2.3 TRPV1-Antagonisten

Inhibitoren des TRPV1-Ionenkanals werden in kompetitive und nicht-kompetitive Antagonisten unterteilt. Erstere werden in klassische und nicht-klassische Antagonisten eingeteilt (Abb. 6) (Vriens *et al.*, 2009). Den klassischen Antagonisten ist eine Thiourea-, Urea-, Ester- oder Amid-Carbonylverbindung gemein. Bei den nicht-klassischen ist die Carbonylverbindung entweder als Teil eines heterozyklischen Rings nachzuweisen oder nicht detektierbar (Vriens *et al.*, 2009). Zu den klassischen Antagonisten gehören zum Beispiel Capsazepine, eine Thiourea-Carbonylverbindung (Bevan *et al.*, 1992), AMG-9810 (Gavva, Tamir & Qu *et al.*, 2005) und SB-366791 (Gunthorpe *et al.*, 2004), beides Cinnamide, sowie BCTC, eine Urea-Carbonylverbindung (Valenzano *et al.*, 2003). Capsazepine, der als erster TRPV1-Antagonist identifiziert wurde, ist kompetitiv gegenüber Capsaicin. Capsazepine stellt einen relativ unspezifischen Antagonisten dar, der auch spannungsaktivierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren blockiert, sowie den TRPM8-Ionenkanal. Zu den nicht-klassischen Antagonisten gehören einige Quinazol-Derivate, wie AMG-517 (Gavva, Tamir & Klionsky *et al.*, 2005) und Imidazol-Derivate, wie 4,5-Biarylimidazol (Gore *et al.*, 2007).

Nicht-kompetitive Antagonisten werden auch als Porenblocker bezeichnet. Dies sind beispielsweise Ruthenium Red (RR), ein Komplexsalz des Metalls Ruthenium (Dray *et al.*, 1990), die Spinnengifte AG-489 und AG-505 (Kitaguchi & Swartz, 2005) und Thapsigargin, ein Bestandteil der Pflanze *Thapsia garganica* (Toth *et al.*, 2002).



**Abbildung 6: Strukturformeln kompetitiver und nicht-kompetitiver TRPV1-Antagonisten.**

### 1.2.4 TRPV1 in Physiologie und Pathologie

TRP-Kanäle, darunter auch TRPV1, sind in freien Nervenendigungen der primären afferenten A $\delta$ - und C-Nervenfasern lokalisiert (Asbury, 1989; Caterina *et al.*, 1997). Sie sind für die Wahrnehmung noxischer Reize (chemisch, thermisch, mechanisch) verantwortlich und leiten diese Signale über das Spinalganglion und das Trigemininalganglion an das zentrale Nervensystem weiter. Kommt es zu einem noxischen Stimulus, beispielsweise einer Erhöhung der Temperatur auf über 43°C, öffnet sich der TRPV1-Ionenkanal und Calcium-Ionen strömen in das Cytosol. In sensorischen Neuronen kann dies das Membranpotenzial verändern, so dass spannungsabhängige Natriumkanäle aktiviert und Aktionspotenziale ausgelöst werden (Holzer, 1991). Des Weiteren können auch Neuropeptide, wie beispielsweise die Substanz P oder CGRP (Calcitonin-Gene-related-Protein), freigesetzt werden (Holzer, 1988) und so zu Vasodilatation und Plasmaextravasation führen (Lembeck, 1953). Die freigesetzten Neuropeptide aktivieren auch in der Nähe liegende Mastzellen und Granulozyten, was diese wiederum zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren veranlasst. Auf diese Weise kann eine neurogene Entzündung entstehen (Geppetti, 1996). Dabei können Entzündungsstoffe wie NGF (Nerve Growth Factor), Bradykinin, oder Prostaglandine verschiedene Rezeptoren der neuronal afferenten Fasern aktivieren, beispielsweise TrkA, B2 oder EP<sub>2</sub>, die wiederum Proteinkinasen aktivieren. Diese Proteinkinasen (PKA, PKC) phosphorylieren den TRPV1-Kanal und sensibilisieren ihn. Das führt zu einer Aktivierung des Kanals auch durch niedrigere Temperaturen als 43°C und es kommt erneut zur Auslösung von Aktionspotenzialen, welche den Entzündungsschmerz weiterleiten (Julius & Basbaum, 2001; Greffrath, 2006). Neben der Expression in peripheren Nervenfasern wurde die Expression von TRPV1 auch im zentralen Nervensystem nachgewiesen (Sanchez *et al.*, 2001; Toth & Boczan *et al.*, 2005). Dort hat die Sensibilisierung und Aktivierung von TRPV1 einen Einfluss auf die synaptische Übertragung (Sikand & Premkumar, 2007) und synaptische Plastizität in der Langzeit-Depression (LTD) und Langzeit-Potenzierung (LTP) (Li *et al.*, 2008; Gibson *et al.*, 2008).

Sensorische Nerven, die TRPV1 exprimieren, innervieren das Lungengewebe sowie respiratorische Zellen. In einem *in-vivo*-Asthma-Modell in Meerschweinchen wurde gezeigt, dass der TRPV1-Antagonist BCTC einen durch Allergene ausgelösten

Hustenreflex abschwächte (McLeod *et al.*, 2006). Auch die Harnwege sind von TRPV1-bildenden Nozizeptoren ausgekleidet, die die Blasenentleerung und Schmerzempfindung regulieren (Yiangou *et al.*, 2001).

Weiterhin spielt der TRPV1-Ionenkanal eine Rolle in der Regulierung der Körpertemperatur (Gavva *et al.*, 2007). Eine Inhibierung des Ionenkanals mit dem TRPV1-Antagonisten AMG 517 führte zur Ausbildung einer Hyperthermie, das heißt einem Anstieg der Körpertemperatur auf circa 40°C (Gavva *et al.*, 2008). Die genauen Mechanismen dieser Hyperthermie sind nicht vollständig geklärt.

Neben seiner Expression in neuronalen Geweben wird der Kanal auch in nicht-neuronalen Geweben bzw. Zellen exprimiert (Fernandes *et al.*, 2012). Die TRPV1-Expression wurde beispielsweise in Keratinozyten nachgewiesen (Inoue *et al.*, 2002), in dendritischen Zellen des Pankreas (Basu & Srivastava, 2005) sowie in insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen (Akiba *et al.*, 2004). Darüber hinaus wurde die Expression von TRPV1 in verschiedenen Krebstumoren nachgewiesen, wobei allerdings abhängig von Tumorart und Tumorstadium die TRPV1-Expression erhöht oder erniedrigt sein kann (White *et al.*, 2011).

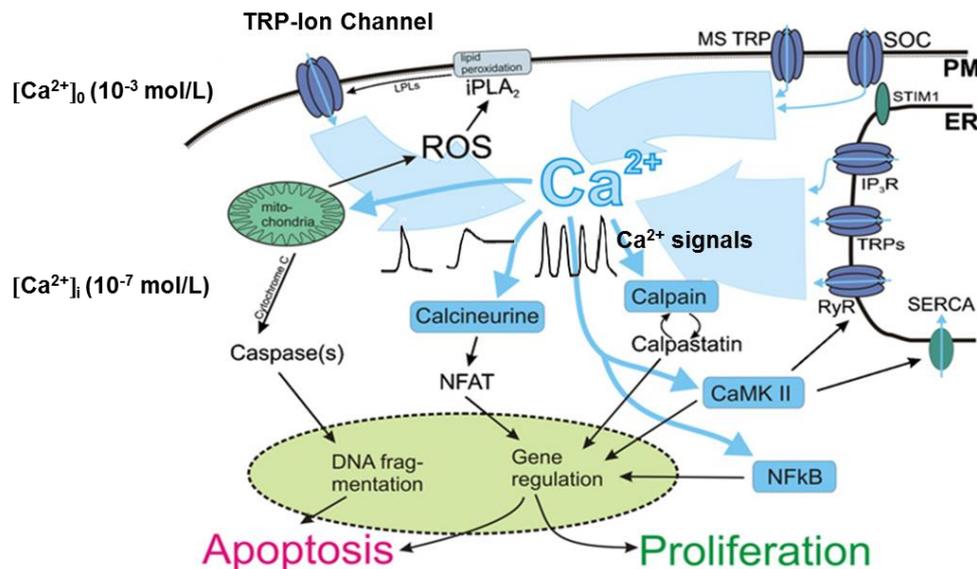
#### 1.2.4.1 TRPV-Ionenkanäle, $[Ca^{2+}]_i$ und Tumorentwicklung

Calcium-Ionen sind wichtige Regulatoren biologischer Funktionen, wie beispielsweise Zellproliferation, Differenzierung, Genexpression und Zelltod.  $Ca^{2+}$ -abhängige Signalwege sind für die Gewährleistung dieser Funktionen genau reguliert. Die Calcium-Kanäle, -Pumpen und -Transporter, die zur Calcium-Homöostase beitragen, sind in nahezu allen Zellen vorhanden.

In ruhenden Zellen ist die Calciumkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$  im Cytosol mit  $\sim 10^{-7}$  mol/L ( $\sim 100$ nM) ungefähr 10.000-20.000-fach niedriger als in der extrazellulären Flüssigkeit  $[Ca^{2+}]_o$  ( $\sim 10^{-3}$  mol/L; 1-2mM). Auch die Calciumkonzentration im Endoplasmatischen Retikulum (ER), das als intrazellulärer Calcium-Speicher dient, liegt mit  $\sim 10^{-5}$  mol/L deutlich über der  $[Ca^{2+}]_i$ . Der Konzentrationsunterschied zwischen der  $[Ca^{2+}]_i$  und der extrazellulären Flüssigkeit sowie den intrazellulären Organellen wird durch aktiven Transport mit Hilfe von  $Ca^{2+}$ -ATPasen, die in der Plasmamembran und u.a. in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert sind, gewährleistet. Bei

Änderung der intrazellulären Calcium-Konzentration, ausgelöst durch extrazellulären Influx oder Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus den intrazellulären Organellen, entstehen zeit- und orts aufgelöste Calcium-Signale mit verschiedenen Signalformen, wie beispielsweise Oszillationen oder Calcium-Wellen (Cui *et al.*, 2017). Der Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  kann stark ortsgebunden in Mikrodomänen beispielsweise am Inositol-1,4,5-Trisphosphat-Rezeptor ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) oder Kanälen des „store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry“ lokalisiert sein, aber auch als Calcium-Signalwelle die durch die gesamte Zelle diffundieren und an anderer Stelle  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Prozesse aktivieren. Die Zellen dekodieren die Information, die über Frequenz, Amplitude und Dauer der Calcium-Oszillationen und -Wellen vermittelt wird, über Effektorproteine, wie beispielsweise Calmodulin (CaM), Nuclear Factor of Activated T-cells (NFAT), Nuclear Factor- $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ), Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) und Calpain. Dadurch werden selektiv zelluläre Prozesse, wie Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, Zellproliferation und Migration reguliert (Abb. 8) (Cui *et al.*, 2017).

In vielen Tumoren ist die Expression von Ionenkanälen und damit die Calcium-Homöostase verändert (Zhu, 2011; Nilius *et al.*, 2007). Bei der Tumorentwicklung sind insbesondere die Prozesse der Proliferation und Apoptose beteiligt, beide sind Calcium-abhängig (Abb.8). Eine anhaltende Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration kann toxisch sein und Apoptose induzieren (Cui *et al.*, 2017). Alternativ kann die Überexpression von Calciumkanälen in der Plasmamembran und gleichzeitig reduzierte Expression von Calcium-Effluxpumpen oder -Austauschern aber auch zu einer erhöhten intrazellulären Calcium-Konzentration führen, durch die dann Calcium-regulierte Signalwege der Proliferation aktiviert werden (Monteith *et al.*, 2007; Shapovalov *et al.*, 2011).



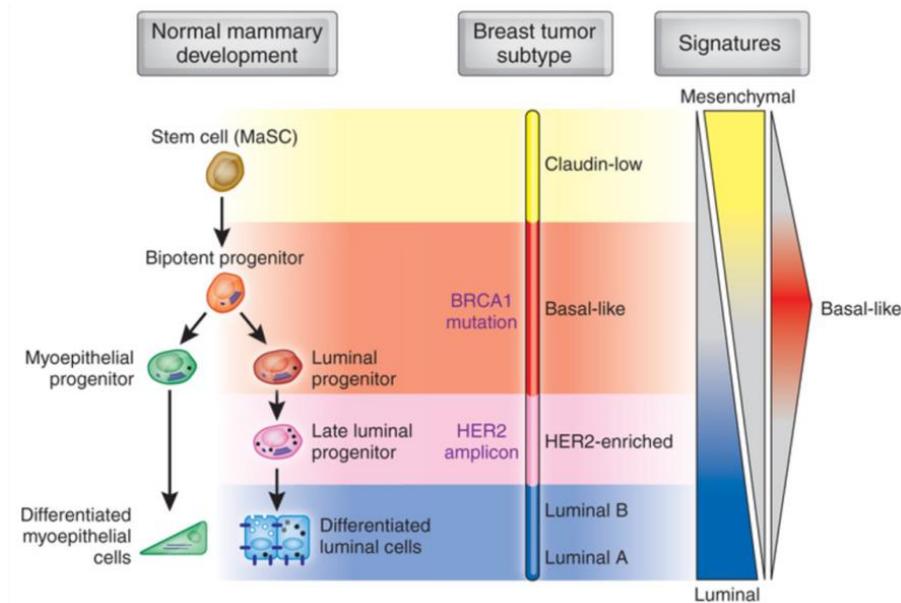
**Abbildung 8: Schematische Darstellung der Interaktion von TRP-Kanälen mit nachgeschalteten Regulationsmechanismen von Proliferation und Zelltod.** Hellblaue Pfeile: Strömung von  $\text{Ca}^{2+}$  bzw. dessen Einfluss auf calciumsensitive Proteine. Schwarze Pfeile: Nachgeschaltete Regulationsmechanismen, die pro-apoptotische oder pro-proliferative Effekte auslösen (verändert nach Shapovalov *et al.*, 2011).

In einigen Tumorarten ist die Expression von TRP-Kanälen erhöht, wie beispielsweise TRPM8 in Prostata- (Fuessel *et al.*, 2003), Pankreas- (Yee *et al.*, 2010) oder Brustkrebs (Dhennin-Duthille *et al.*, 2011) sowie TRPV6 in Brustkrebs (Bolanz *et al.*, 2008). Im Gegensatz dazu ist die Expression der Ionenkanäle in anderen Tumorarten verringert, wie beispielweise TRPM1 im Melanom (Duncan *et al.*, 1998) oder TRPV1 in Urothelkarzinom (Lazzeri *et al.*, 2005). Dabei können dieselben Kanäle in verschiedenen Tumorarten unterschiedlich reguliert sein. Während die Expression von TRPV1 im Urothelkarzinom erniedrig ist, ist sie unter anderem in Prostata- (Sanchez *et al.*, 2005; Czifra *et al.*, 2009), Pankreas- (Hartel *et al.*, 2006), Darm- (Domotor *et al.*, 2005) und Brustkrebs (Pecze & Josvay *et al.*, 2016) erhöht. Im Urothelkarzinom wird ein fortschreitender Verlust der TRPV1-Expression als negativer Prognosemarker diskutiert, da in invasiven Tumorzellen die Expression des TRPV1 auf mRNA- sowie auf Protein-Ebene deutlich niedriger ist als in nicht-invasiven Tumorzellen (Lazzeri *et al.*, 2005; Amantini *et al.*, 2009). In „low-grade“, nicht-invasiven Zellen des Urothelkarzinoms bewirkte die Behandlung mit Capsaicin einen TRPV1-abhängigen G0/G1-Zellzyklus-Arrest und die Induktion der extrinsischen und intrinsischen Apoptose-Signalwege (Amantini *et al.*, 2009). Dagegen zeigten Zellen des invasiven Urothelkarzinoms mit geringer bzw. keiner detektierbaren TRPV1-Expression keine Änderungen der intrazellulären Calcium-

Konzentration nach Behandlung mit Capsaicin und waren resistent gegenüber der Capsaicin-vermittelten Apoptose.

Im Gegensatz dazu wurde in Studien zum Prostatakarzinom eine Überexpression der TRPV1-mRNA und des kodierten Proteins direkt mit einem höheren Tumorgrad korreliert (Sanchez *et al.*, 2005). In Gewebeproben von Prostatakarzinomen als auch in etablierten Tumorzelllinien, in der Androgen-sensitiven Zelllinie LNCaP und der Androgen-insensitiven Linie PC3, wurde ein Dosis-abhängiger Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration nach Behandlung der Zellen mit TRPV1-spezifischen Agonisten beschrieben. Dieser Effekt wurde nach Behandlung der Tumorzellen mit dem Antagonisten Capsazepine aufgehoben (Sanchez *et al.*, 2005). Weitere Studien zeigten, dass durch eine endogene Aktivierung von TRPV1 in Prostatakrebszellen Calcium-Oszillationen ausgelöst werden, die zu erhöhter Zellproliferation führen (Pecze & Blum *et al.*, 2016).

Im Mammakarzinom wurde im Vergleich zu Nicht-Tumorgewebe ein hohes Expressionsniveau verschiedener TRP-Kanäle, wie beispielsweise TRPC1, TRPC6, TRPM7, TRPM8, und TRPV6, detektiert und mit einer erhöhten Proliferation und Migration der Tumorzellen korreliert (Dhennin-Duthille *et al.*, 2011; Ouadid-Ahidouch *et al.*, 2013). In einer Hochdurchsatz-RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) von 11 verschiedenen Brusttumor-Gewebeproben sowie einer Transkriptomanalyse von 49 Brustkrebszelllinien wurde die Expressionshöhe des TRPV1-Ionenkanals in den verschiedenen Proben analysiert und in die fünf verschiedenen Brustkrebs-Subtypen eingeordnet (Weber *et al.*, 2016). Brustkrebs wird anhand von Gen- und Proteinexpressionsprofilen in fünf verschiedene Subtypen für Mammakarzinome klassifiziert: (i) *Luminal A*, *Luminal B*, (ii) *Basal-like (BL)*, (iii) *HER2-enriched*, (iv) *Claudin-low (CL)* und (v) *normal-like* (Prat & Perou, 2009) (Abb.9). Der TRPV1- und der TRPM7-Ionenkanal waren die einzigen Kanäle, die in allen getesteten Proben bzw. in allen Subtypen exprimiert waren. Die höchste Expression von TRPV1 wurde in „dreifach negativen“ Tumoren (TNBC = triple negative breast cancer; entweder *BL* oder *CL*) detektiert; das sind ca. 15%-20% aller Brustkrebserkrankungen. Im Vergleich dazu war in den Luminal-Subtypen die TRPV1-Expression etwas geringer und in den *basal-like* / BRCA1 (Breast Cancer 1)-mutierten Tumorzellen um mehr als 50% niedriger (Weber *et al.*, 2016).



**Abbildung 9: Korrelation der Entwicklungsstadien der Brustdrüsenzellen mit verschiedenen Brustkrebssubtypen.** Links ist die Entwicklung der normalen Brustdrüsenzellen gezeigt. Die Mitte zeigt die korrelierenden Brustkrebs-Subtypen. Die Expressionsmuster (*luminal*, *claudin-low* bzw. *mesenchymal* und *basal-like*) sind als Gradienten auf der rechten Seite der Abbildung dargestellt. Dreifach negative Karzinome (TNBC = triple negative breast cancer) werden auf molekularer Ebene mehrheitlich den Subgruppen der *basal-like* (BL)- und *Claudin-low* (CL)-Mammakarzinome zugeordnet. TNBC zeigen keine HER2-Überexpression, keine Östrogen- und Progesteron-Rezeptorexpression, hohe Proliferationsraten und Metastasierung. 60 bis 80% der CL- bzw. BL-Mammakarzinome sind dreifach negativ. (Prat & Perou, 2009)

Die in der Literatur beschriebenen Unterschiede der TRPV1-Expression in den verschiedenen Brustkrebs-Subtypen weisen auf die Möglichkeit hin, den TRPV1-Kanal selektiv als Zielmolekül für die Behandlung von Tumoren mit erhöhter TRPV1-Expression zu nutzen. Allerdings hat der TRPV1-Agonist Capsaicin in einigen Tumorzellen die Tumorprogression verstärkt, während in anderen Tumorzellen Apoptose und Zellzyklusarrest ausgelöst wurde. Diese unterschiedlichen Effekte könnten zum einen auf den oben genannten, verschiedenen Expressionshöhen des TRPV1-Kanals in Tumorzellen beruhen. Abhängig von der Expressionshöhe des TRPV1-Ionenkanals und der zugegebenen Konzentration von TRPV1-Agonisten bzw. -Antagonisten des TRPV1 könnten verschiedene zelluläre Signalwege beeinflusst werden, die dann entweder zu stärkerer Proliferation oder Apoptose in den Tumorzellen führen könnten. Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass Capsaicin auch unabhängig von der Aktivierung des TRPV1-Ionenkanals in Tumorzellen einen Wachstumsarrest und Apoptose induziert als auch den EGFR/HER-2-Signalweg inhibiert, der bei erhöhter Aktivierung mit zunehmender Proliferation und Metastasierung von Tumorzellen assoziiert ist (Thoennissen *et al.*, 2010). Für eine

therapeutische Nutzung des TRPV1-Ionenkanals ist es daher essentiell, die Wirkung von Modulatoren des TRPV1-Ionenkanals auf zelluläre Prozesse umfassend aufzuklären und dabei die spezifische TRPV1-Expressionshöhe von Tumorzellen zu berücksichtigen.

#### 1.2.4.2 Der TRPV1-Ionenkanal als pharmakologisches Zielmolekül

Der TRPV1-Ionenkanal spielt eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der körpereigenen Antwort auf verschiedenste Schmerzreize und wird daher zurzeit überwiegend als Zielmolekül für die Entwicklung von Schmerzmitteln adressiert. Mit zunehmenden Wissen der Funktion von TRPV1-Ionenkanälen über die Schmerzvermittlung hinaus gewinnt der TRPV1-Kanal in der Wirkstoffentwicklung allerdings auch für die Behandlung von Atemwegserkrankungen, Hautkrankheiten, entzündlichen Darmerkrankungen, Diabetes und Blasenfunktionsstörungen an Bedeutung (Tab.1). In der Schmerzmittelentwicklung konnten bisher nur capsaicinhaltige Cremes und Hautpflaster für die klinische Anwendung entwickelt werden, die bei Patienten mit chronischen Schmerzen eingesetzt werden, beispielsweise bei rheumatischer Arthritis, Muskelzerrung, Rückenschmerzen oder Schmerzen aufgrund diabetischer Nervenschäden (Knotkova *et al.*, 2008; Baranidharan *et al.*, 2013).

**Tabelle 1: TRP-spezifische Wirkstoffe in klinischen Studienphasen (Kaneko & Szallasi, 2014).**

Action	Drug	Company	Therapy Area	Highest development status	ClinicalTrials.gov identifier
TRPV1 agonist	capsaicin	Not Assigned	Pain	Launched	
TRPV1 agonist	NGX-4010	Acorda Therapeutics Inc/Astellas Pharma Inc	Postherpetic neuralgia	Launched	
TRPV1 agonist	ZUCAPSALCID	Sanofi-Aventis Canada Inc	Osteoarthritis	Registered	
TRPV1 agonist	ZUCAPSALCID	Winston Pharmaceuticals Inc	Cluster headache	Phase 3	NCT00033839
TRPV1 agonist	MCP-101 (resoliferatoxin)	Mt Cook Pharma	Overactive bladder	Phase 2	N/A
TRPV1 antagonist	DWP-05195	Daewoong Pharmaceutical Co Ltd	Neuropathic pain	Phase 2	NCT01557010
TRPV1 antagonist	XEN-D0501	Provesica Ltd	Overactive bladder	Phase 2	N/A
TRPV1 siRNA	SYL-1001	Sylentis, Saa	Ocular pain	Phase 2	NCT01776658
TRPV1 antagonist	Mavarep	Johnson & Johnson Pharmaceutical Research & Development LLC	Osteoarthritis/Pain	Phase 1	NCT00933582 NCT01006304
TRPV1 antagonist	PHE-377	PharmEste SRL	Neuropathic pain	Phase 1	N/A
TRPV1 antagonist	MR-1817	Mochida Pharmaceutical Co Ltd	Pain	Phase 1	NCT00960180
TRPV1 antagonist	PAC-14028	Pacific Pharmaceuticals Co Ltd	Atopic dermatitis/IBD	Phase 1	NCT01638117
TRPV1 antagonist	SB-705498	GlaxoSmithKline plc	Pruritus	Phase 1	NCT01673529
TRPV3 antagonist	GRC-15300	Glenmark Pharmaceuticals Ltd/Sanofi	Neuropathic pain/Osteoarthritis	Phase 2	NCT01463397
TRPM8 agonist	Menthol	Not assigned	Carpal tunnel syndrome/Neck pain	N/A	NCT01716767 NCT01542827
TRPM8 agonist	D-3263	Dendreon, Corp	Cancer	Phase 1	NCT00839631
TRPA1 antagonist	GRC-17536	Glenmark Pharmaceuticals Ltd	Diabetic peripheral neuropathy/Respiratory disorders	Phase 2	NCT01726413
TRPA1 antagonist	CB-625	Cubist Pharmaceuticals/Hydra Biosciences	Inflammatory disease/ Pain	Phase 1	N/A

Die intravenöse Gabe von Capsaicin zeigte im Tiermodell eine Reihe von Nebenwirkungen auf die Herzschlagrate, Blutdruck, Atmung und andere Reflexwege, weshalb keine weiteren, klinischen Studien durchgeführt wurden und Capsaicin nur ektoderm als Analgetikum angewendet wird (Wong & Gavva, 2009). Der Agonist Resiniferatoxin befindet sich aktuell in klinischen Studien zur Behandlung von krebsassoziierten chronischen Schmerzen (NCT00804154). Ein großer Nachteil von TRPV1-Agonisten in der Schmerztherapie ist die Auslösung eines Initialschmerzes, da die Ionenkanäle zunächst mit einer Schmerzweiterleitung auf die Agonisten reagieren und erst im Anschluss die Desensibilisierung zur Linderung führt (Cui *et al.*, 2016). Neben TRPV1-Agonisten wurde daher ebenso eine Reihe von niedermolekularen Substanzen als potenzielle TRPV1-Antagonisten entwickelt und deren Einsatz als Analgetika getestet. Die verschiedenen Antagonisten, beispielsweise SB-705498 (GlaxoSmithKline), AMG517 (Amgen), AZD1386 (AstraZeneca), GRC-6211 (Lilly/Glenmark), MK-2295 (Merck/Neurogen), ABT-102 (Abbott) and PHE377 (PharmEste) wurden in den klinischen Phasen I und II validiert, zeigten aber zum Teil nicht akzeptable Nebenwirkungen wie Fieber oder verzögerte Hitzesensibilität, die das Risiko von Verbrühungen stark erhöhte (Moran *et al.*, 2011; Brederson *et al.*, 2013). Die Weiterentwicklung dieser Antagonisten führte zwar zu einer reduzierten Hyperthermie, eine klinische Anwendung konnte aber bisher nicht erreicht werden (Carnevale & Rohacs, 2016). Das synthetisch hergestellte Capsazepine zeigte im Tiermodell eine schmerzlindernde Wirkung, allerdings war insgesamt die Potenz und die Spezifität für TRPV1 zu gering (Docherty *et al.*, 1997; Liu & Simon, 1997; Cui *et al.*, 2016).

Die funktionellen Eigenschaften der TRP-Ionenkanäle und ihre Assoziation mit erhöhter oder verringerter Expression in verschiedenen Tumoren eröffnen verschiedene Möglichkeiten, die Ionenkanäle zukünftig auch für pharmakologische Strategien in der Krebstherapie zu nutzen. Eine Strategie beruht in der Aktivierung von Ionenkanälen, um über einen  $\text{Ca}^{2+}$ - bzw.  $\text{Na}^{+}$ -Influx die intrazelluläre Calcium- bzw. Natriumkonzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ;  $[\text{Na}^{+}]_i$ ) in den Tumorzellen dauerhaft zu erhöhen, was zu Apoptose und Nekrose der Zellen führt. Für diese Strategie kommen allerdings nur Tumoren in Betracht, die eine tumorspezifische Expression bzw. Aktivierbarkeit eines bestimmten TRP-Ionenkanals aufweisen. Eine über selektive Aktivierung von Ionenkanälen induzierbare Apoptose wäre therapeutisch wertvoll, da

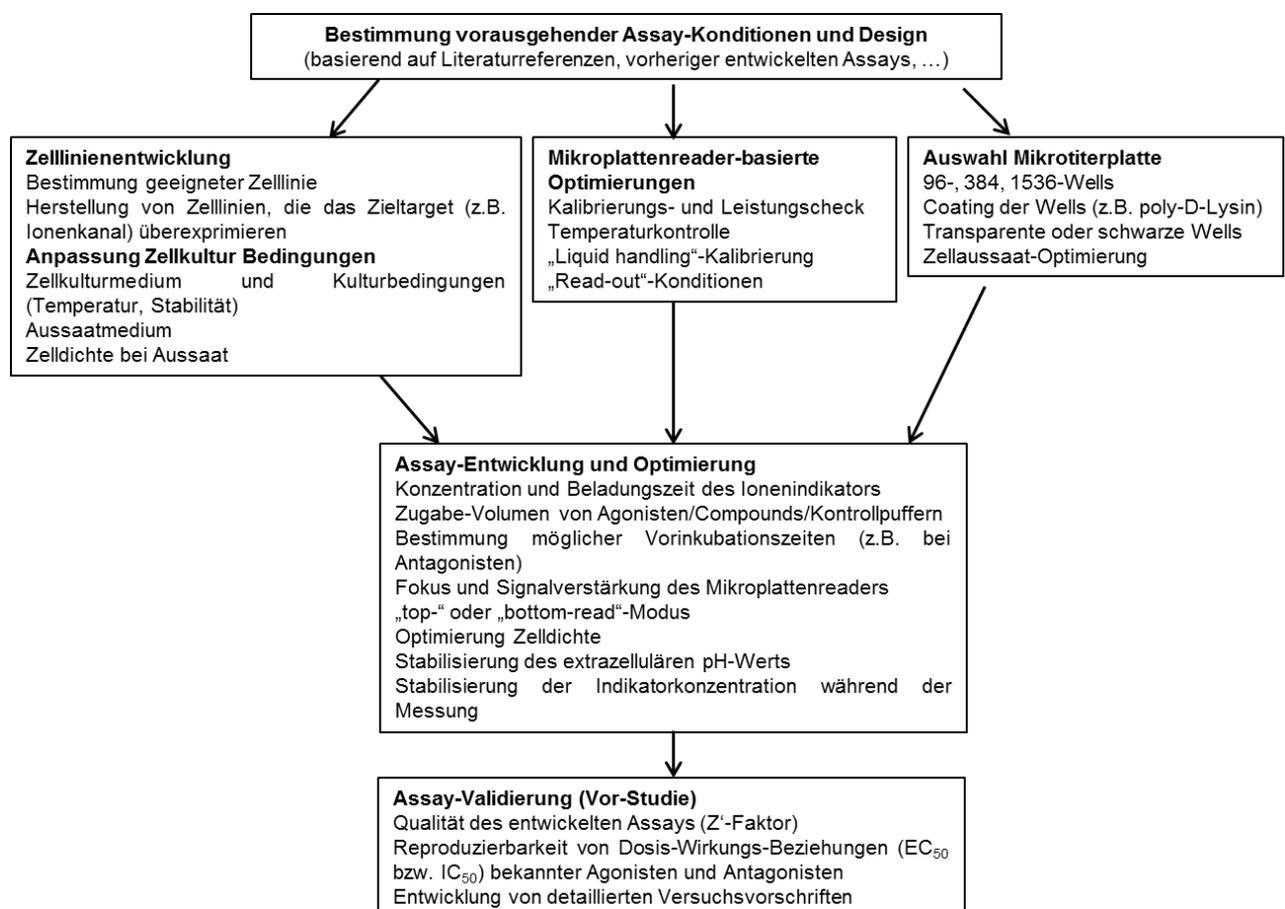
in vielen Tumorarten, beispielsweise in androgen-insensitiven Prostatakarzinomen, die normalen apoptotischen Signalwege inhibiert sind. In diesem Zusammenhang konnte in Zellen des Pankreaskarzinoms durch Behandlung mit dem TRPV1-spezifischen Agonisten Resiniferatoxin eine dauerhafte Erhöhung von  $[Ca^{2+}]_i$  und  $[Na^+]_i$  erreicht werden, was zu einer Hemmung der mitochondrialen Funktionen sowie Induktion von Apoptose in den Tumorzellen führte (Hartel *et al.*, 2006).

Ein anderer pharmakologischer Ansatz verfolgt das Ziel, die selektiv erhöhte Expression einiger Ionenkanäle in Tumorzellen therapeutisch zu nutzen. Über diese Kanäle können gezielt chemotherapeutische Wirkstoffe in die Zellen eingeschleust werden, die direkt zum Zelltod führen. Die Bindung der Wirkstoffe an das TRP-Protein kann über die Kopplung an einen starken Agonisten oder einen spezifischen anti-TRP-Antikörper erreicht werden. Diese Strategie wurde in „Triple Negative“ Brustkrebszellen, die den TRPV2-Ionenkanal erhöht exprimieren, angewendet. Über die Aktivierung des TRPV2-Kanals wurde eine verbesserte Aufnahme des Chemotherapeutikums Doxorubicin in den Tumorzellen erreicht, was in einer erhöhten Apoptoserate resultierte (Elbaz *et al.*, 2016). Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Nutzung aktivierter Kanäle zur gezielten Einschleusung von Wirkstoffen in die Krebszellen. QX-314, ein Natriumkanalblocker, wurde durch die Aktivierung von TRPV1 mit Capsaicin durch die Kanalpore in das Zellinnere geschleust. Spannungsabhängige Natriumkanäle wurden blockiert und die Entstehung von Aktionspotenzialen inhibiert (Puopolo *et al.*, 2013).

Trotz der Entwicklung und Synthese vieler TRPV1-Modulatoren sind bis auf capsaicin-haltige Cremes und Pflaster bisher keine TRPV-spezifischen Wirkstoffe für die klinische Routine einsetzbar. Da der TRPV1-Ionenkanal über seine Rolle bei der Schmerzempfindung hinaus in vielen Krankheiten, wie beispielsweise Krebs, Diabetes, Inkontinenz, und Arthritis, involviert ist, stellt der Ionenkanal weiterhin ein attraktives pharmakologisches Zielmolekül für die Identifizierung und Validierung neuer Aktivatoren und Inhibitoren dar. Dazu werden zellbasierte Assays und Zellmodelle benötigt, mit denen sowohl auf Einzelzellebene als auch im Hochdurchsatzverfahren neue TRPV1-Wirkstoffe identifiziert und validiert werden können. Der Einsatz von 3D-Zellkulturmodellen kann dabei eine *in-vivo*-nähere Validierung potenzieller Wirkstoffe unterstützen.

### 1.3 Entwicklung zellulärer Testsysteme für die Wirkstoffentwicklung

Für die Entwicklung eines zell-basierten Assay-Systems muss das Zellmodell das pharmakologische Zielmolekül funktionell exprimieren. Zusätzlich kann das Zellmodell so gewählt werden, dass die *in-vivo*-Situation möglichst gut abgebildet wird. Darüber hinaus müssen die Zellmodelle für eine Anpassung an HTS-Verfahren geeignet sein, beispielsweise an Mikrotiterplatten-Formate ( $\geq 96$  Wells), mit denen umfangreich Substanzbibliotheken von bis zu  $10^6$  Proben analysiert werden können (Abb. 10) (Sittampalam *et al.*, 2004; Chen, 2010).



**Abbildung 10: Schematische Darstellung der Entwicklung eines fluoreszenzbasierten zellulären Assays** (modifiziert nach Arkin *et al.*, 2004)

Ionenkanäle sind aufgrund ihrer physiologischen Funktionen attraktive Zielmoleküle für die Wirkstoffentwicklung (Curran & Mohler, 2015; Yu *et al.*, 2016). Sie gehören zu der drittgrößten Zielgruppe für die Entwicklung pharmakologischer Wirkstoffe. Zu den Vorteilen, Ionenkanäle als Therapieziele zu nutzen, zählen ihre leichte Zugänglichkeit

(die meisten Ionenkanäle sind von der Außenseite der Zellen zugänglich), die Existenz in der Natur vorkommender selektiver Blocker, die als Modellstrukturen für Therapeutika dienen können, und die Möglichkeit, ihre Funktion äußerst genau, d.h. auf der Ebene eines einzelnen Moleküls, und in Echtzeit über elektrophysiologische Verfahren messen zu können.

In der Entwicklung pharmakologischer, zellbasierter Testsysteme für Ionenkanäle sind verschiedene Technologien etabliert, um Änderungen der intrazellulären Ionenkonzentrationen nach Aktivierung der Kanäle durch potenzielle Wirkstoffe zu messen.

Die elektrophysiologisch-basierte Patch Clamp-Technik wird als „Gold Standard“ der Ionenkanal-Forschung beschrieben, da damit direkt Ionenkanalströme einzelner Zellen als auch einzelner Ionenkanäle gemessen werden können (Yajuan *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2016). Aufgrund niedriger Durchsatzraten bei hohem Zeitaufwand und damit verbundenen Personalkosten gilt sie aber als ungeeignet für Hochdurchsatz-Verfahren (HTS, *High Throughput Screening*). Fluoreszenzbasierte Methoden messen dagegen entweder Membranpotenzial- oder Ionenkonzentration-abhängige Änderungen der Fluoreszenzeigenschaften von Indikatormolekülen (Yu *et al.*, 2016). Die Verwendung von Ionen-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen in Verbindung mit geeigneten Zellmodellen ermöglicht eine zielgerichtete Entwicklung von zellbasierten Assays für Wirkstoffentwicklung in hohem Durchsatz (Yu *et al.*, 2016; Heusinkveld & Westerink, 2011). Zellbasierte Assays werden eingesetzt, um Substanzbibliotheken nach neuen Ionenkanal-Modulatoren zu durchmustern sowie identifizierte Substanzen als potentielle Wirkstoffe zu validieren. Beispielsweise wurde mit einem FLIPR (Fluorimetric Imaging Plate Reader)-Assay unter Verwendung einer humanen Zelllinie, HEK293 mit konstitutiver TRPV1-Expression, aus einer Substanzbibliothek der TRPV1-Antagonist SB-366791 identifiziert und charakterisiert (Gunthorpe *et al.*, 2004).

Insgesamt stellen zellbasierte Testsysteme biologische Mechanismen im zellulären Kontext realistischer nach als zellfreie Systeme und erlauben dadurch Wirkstoff-Screening-Verfahren nahe der *in-vivo*-Situation.

### 1.3.1 Zellmodelle mit Tetrazyklin-regulierbarer Genexpression

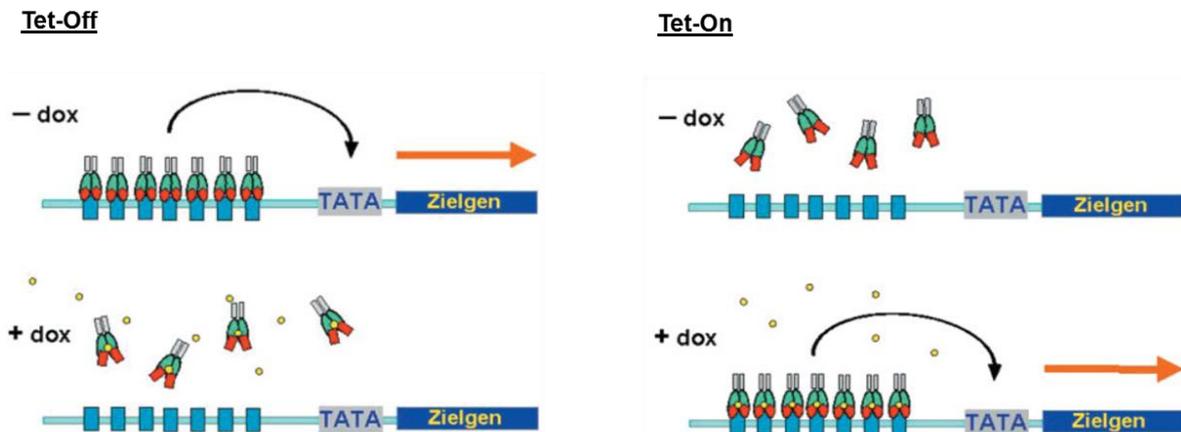
Die heterologe Expression eines Zielmoleküls kann transient, konstitutiv oder regulierbar erfolgen. Heterologe, regulierbare Expressionssysteme haben den Vorteil, dass die Transkription eines Zielmoleküls gewebe- und zeitabhängig gesteuert werden kann. Somit kann ein Zielmolekül in der Zelle beliebig aktiviert oder deaktiviert werden, wodurch beispielsweise Informationen über zusammenhängende Funktionsnetzwerke von Proteinen und deren Ansprechen auf einen Wirkstoff erhalten werden können. Die regulierbare Expression ermöglicht darüber hinaus auch die Expression von Proteinen, die für die Wirtszelle toxisch sind.

In einem standardisierten zellbasierten Testsystem für Wirkstoffe ist es vorteilhaft ein Regulationssystem zu nutzen, das (i) keine endogen kodierten Gene aktiviert, (ii) bei maximal induzierter Expression möglichst keine bzw. nur eine geringe Basalexpression besitzt, (iii) einen universell zellgängigen Induktor mit hoher Affinität und Spezifität einsetzt und (iv) effizient in verschiedenen Zelltypen und Organismen zu induzieren ist. Es sind verschiedene Expressionssysteme entwickelt, die eine regulierbare Expression von Transgenen in Säugetierzellen erlaubt. Alle Systeme beruhen auf der Induktion einer Transkriptions-Aktivierungsdomäne durch chemische Moleküle, wie beispielsweise dem Antibiotikum Tetrazyklin im Tet-On/Tet-Off-System, dem Insekten-Steroid Ecdyson im Ecdyson-reguliertem Expressionssystem „Complete Control“, dem Antiprogesteron Mifepriston im GeneSwitch™ oder dem Antibiotikum Rapamycin im iDimerize™ System (Clackson, 2000).

Regulierbare Expressionssysteme werden umfassend in Studien der funktionellen Genomik (Welman *et al.*, 2007), der Gentherapie (Goverdhana *et al.*, 2005), in Tiermodellen oder Zellmodellen humaner Krankheiten (Rios *et al.*, 2014) oder in der Produktion biopharmazeutischer Proteine (Jones *et al.*, 2005) eingesetzt. Eine weltweit genutzte und über Jahrzehnte weiterentwickelte Technologie zur regulierten Genexpression in Säugerzellen ist das tetrazyklin-abhängige Regulationssystem (Tet-System). Aufgrund seiner hohen Effizienz in vielen Zelltypen und Organismen, seiner geringen Basalexpression, starker induzierter Expression, sowie zeitlicher und quantitativer Modulierbarkeit der Expression gehört es zu den weitverbreitetsten Genexpressionssystemen.

Die Komponenten des Tet-Systems stammen aus dem Tetrazyklin-Operon des Enterobakteriums *Escherichia coli* (Gossen & Bujard, 1992). In Abwesenheit des Antibiotikums Tetrazyklin bindet ein Repressorprotein TetR an die Operatorsequenz (*tetO*) in der Promotorregion des Resistenzgens *tetA*, wodurch die Expression des Resistenzgens inhibiert wird. Die Diffusion des Tetrazyklins in das Cytoplasma des Bakteriums führt zur Bildung eines Tetrazyklin-TetR-Komplexes. Daraus resultieren die Konformationsänderung des Repressors und der Verlust der Operatorbindefähigkeit. In Folge dessen wird *tetA* exprimiert und der produzierte membranständige Antiporter schleust das Antibiotikum im Austausch gegen ein Proton aus dem Bakterium (Abb. 11) (Hillen & Berens, 1994; Saenger *et al.*, 2000).

Die hohe Bindspezifität des prokaryotischen Repressors an die Operatordomänen und die damit verbundene geringe Basalexpression des Resistenzgens bildeten die Grundlage zur Entwicklung eines induzierbaren Genexpressionssystems in Eukaryoten. Der TetR-Repressor wurde mit der VP-16-Transaktivierungsdomäne des Herpes Simplex Virus 1 fusioniert, um einen eukaryotischen Transaktivator tTA zu entwickeln. Zur Herstellung von Promotoren, die von dem Transaktivator tTA aktiviert werden können, wurde die Enhancer-Region des humanen Cytomegalovirus Promotors deletiert und mehrere *tetO*-Sequenzen eingefügt (Gossen & Bujard, 1992). In Abwesenheit von Tetrazyklin bindet der Transaktivator spezifisch an die *tetO*-Sequenzen des minimalen Promotors und eine Transkription des nachgeschalteten Gens findet statt. Ist Tetrazyklin vorhanden, bildet es einen Komplex mit dem Transaktivator, wodurch dieser seine Bindefähigkeit an die Operator-Sequenzen verliert und ein Transkriptionsstopp resultiert. Dieses 1992 von Gossen und Bujard entwickelte tetrazyklin-induzierbare Expressionssystem wird heute als Tet-Off-System bezeichnet (Abb. 11, links). Vier Punktmutationen innerhalb der TetR-Untereinheit des Transaktivators führten zu einer kompletten Umkehrung des *tetO*-Bindungsverhaltens. Die Zugabe von Tetrazyklin resultierte in der spezifischen Bindung des rtTA-Transaktivators an die *tetO*-Sequenzen und in der Transkription, wohingegen die Abwesenheit von Tetrazyklin zu einem Transkriptionsstopp führt (Gossen *et al.*, 1995). Dieses System wird als Tet-On-System bezeichnet (Abb. 11, rechts).



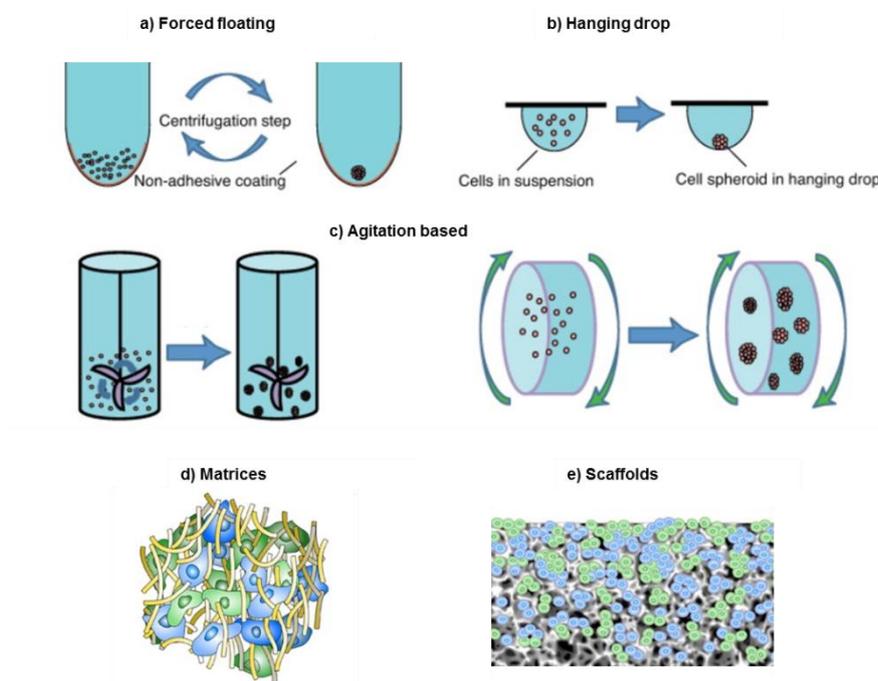
**Abbildung 11: Schematische Darstellung der Regulation der Genexpression in Tet-Off- und Tet-On-Systemen (Hillen & Berens, 2002)** Links Tet-Off-System: In Abwesenheit von Doxyzyklin, einem stabileren Tetrazyklin-Derivat, (gelbe Kreise) bindet der tTA Transaktivator (rot-grün-grauer Komplex aus TetR, Bindedomäne und Aktivierungsdomäne) an die *tetO*-Sequenzen (blaue Rechtecke) stromaufwärts der TATA-Box und die Transkription wird gestartet. Nach Zugabe von Doxyzyklin bindet dieses an tTA und der Komplex löst sich vom Operator. Eine Transkription findet nicht statt. Rechts Tet-On-System: rtTA bindet in Anwesenheit von Doxyzyklin an die *tetO*-Sequenzen und die Gentranskription startet. Ohne Doxyzyklin bindet der Transaktivator nicht an die Promotorregion und es findet keine Transkription statt.

Weitere genetische Modifikationen des rtTA-Transaktivators sowie des Minimalpromotors führten zur Entwicklung des Tet-On 3G-Systems, welches in dieser Arbeit zur Herstellung induzierbarer Zellmodelle genutzt wurde. Der Tet-On 3G-Transaktivator ist ein Fusionsprodukt des genetisch modifizierten bakteriellen TetR-Repressors mit drei Minimal-VP-16-Transaktivierungsdomänen. Dies ermöglicht eine sehr hohe maximale Expression bei gleichzeitig sehr geringer Doxyzyklin-Zugabe im Vergleich zu Vorgänger-Systemen (Zhou *et al.*, 2006). Der induzierbare Minimalpromotor pTRE3G enthält sieben Wiederholungen der 19bp langen *tetO*-Operatorsequenzen, die stromaufwärts eines genetisch modifizierten CMV-Minimalpromotors lokalisiert sind. Durch die Mutationen des Promotors können endogene Transkriptionsfaktoren der Säugetierzellen schlecht bzw. gar nicht binden, wodurch die Basalexpression auf ein Minimum reduziert wird (Loew *et al.*, 2010).

### 1.3.2 3D-Zellkulturen in der Wirkstoffentwicklung

Der Großteil heutiger *in-vitro*-Modelle basiert auf Zellen, die als zweidimensionale (2D) Monolayer in planaren Glas- oder Plastikgefäßen kultiviert werden (Edmondson *et al.*, 2014). In Geweben sind Zellen von anderen Zellen und extrazellulärer Matrix

(ECM) umgeben. 2D-kultivierte Zellen adhären dagegen auf einem festen Untergrund und werden von dem umgebenden Medium gleichmäßig mit Nährstoffen und Wachstumsfaktoren versorgt (Tibbitt & Anseth, 2009). Durch den regelmäßigen Medienwechsel in der 2D-Zellkultur werden nekrotische vom Untergrund abgelöste Zellen entfernt, wodurch die Population vorwiegend aus proliferierenden Zellen besteht (Edmondson *et al.*, 2014). Die Zellmorphologie zweidimensional kultivierter Zellen weist eine flache Form auf, wodurch der Aufbau des Zytoskeletts und die Form des Nukleus verändert sein kann und dies zu einer Modifikation der Genexpression und Proteinsynthese führt (Vergani *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2002). Eine Kultivierung der Zellen in dreidimensionalen (3D)-Zellkultursystemen reflektiert die physiologischen *in-vivo*-Bedingungen besser als die traditionellen 2D-Kultursysteme. Die Zellen bilden Zell-Zell- und Zell-ECM-Kontakte und wachsen als Aggregate oder kompakte Sphäroide. Sie entwickeln ihre natürliche Morphologie entsprechend der Zellmorphologie im Gewebe oder Organ. 3D-Zellkulturen finden in der Wirkstoffentwicklung eine immer breitere Anwendung. Zur Herstellung von 3D-Kulturen werden verschiedene Techniken angewandt (Abb.12).

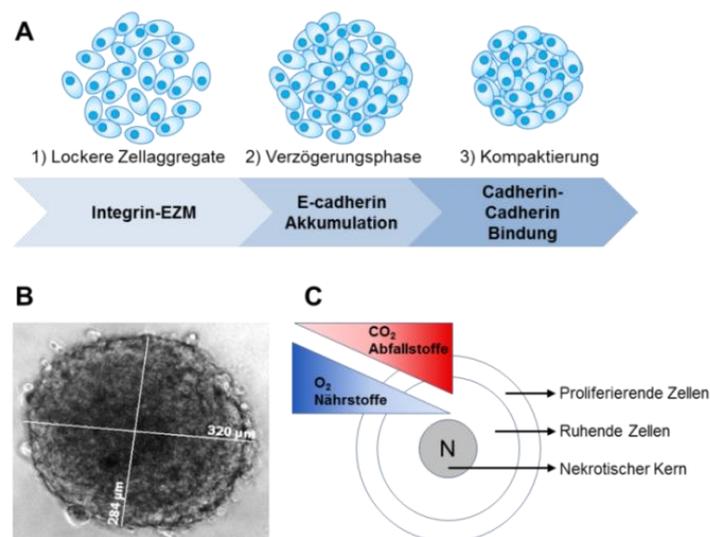


**Abbildung 12: Methoden zur 3D-Kultivierung von Zellen.** (Knight & Przyborski, 2015; Breslin & O'Driscoll, 2013)

Der hauptsächliche methodische Unterschied bei der 3D-Zellkultivierung beruht darin, ob die Zellen in einer dreidimensionalen Trägerstruktur (Scaffold) angesiedelt

oder ohne Trägermaterial zu einem hochdichten dreidimensionalen Zellaggregat bzw. Sphäroid geformt werden.

Bei den „forced-floating“-Techniken (Abb.12a) werden Einzelzellsuspensionen in Kulturgefäßen mit spezieller Oberflächenbeschichtung ausgesät, die eine Adhärenz der Zellen verhindert. Nach einem Zentrifugationsschritt bilden sich Zell-Zell-Kontakte aus, wodurch Zellaggregate bzw. Sphäroide (Abb.13) resultieren (Ivascu & Kubbies, 2006). Eine Beschichtung der Mikrotiterplatten mit dem Polymer Poly-HEMA oder mit Agarose verhindert die Adhäsion von Zellen (Friedrich *et al.*, 2009; Ivascu & Kubbies, 2007). ULA-(Corning)- oder Lipidure-COAT-(AmsBIO)-Platten sind durch die Beschichtung mit hydrophilen, zellabweisenden Polymeren gekennzeichnet. Durch die Aussaat bestimmter Zellzahlen pro Well ist die Größe der Sphäroide modulierbar als auch reproduzierbar.



**Abbildung 13: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Sphäroids.** A) Unterteilung der Sphäroid-Bildung in drei Phasen: 1) Generierung von lockeren Zellaggregaten über Integrin-ECM-Bindung, 2) Cadherin-Expression und -Akkumulation, 3) Formierung eines kompakten Sphäroids durch Cadherin-Cadherin Wechselwirkung. B) Größenbestimmung eines Sphäroids. C) Aufgrund der Diffusionsgradienten entsteht ein nekrotischer Kern, umgeben von lebenden ruhenden Zellen und einer äußeren Schicht proliferierender Zellen (verändert nach Lin & Chang, 2008).

Die Sphäroide sind leicht zugänglich für Einzelsphäroid-Untersuchungen und können gleichzeitig in Mikrotiterplatten-basierten Hochdurchsatz-Verfahren genutzt werden (Friedrich *et al.*, 2009; Breslin & O'Driscoll, 2013).

Die „hanging-drop“-Methode (Abb.12b) ist eine weitere Technik zur Generierung von Sphäroiden. Einzelzellen werden in einem Tropfen Zellkulturmedium an den Deckel

einer Zellkulturschale platziert, dieser wird vorsichtig umgedreht. In Folge der Schwerkraft akkumulieren die Zellen am tiefsten Punkt des Tropfens und bilden Sphäroide (Kelm *et al.*, 2003). Mit dieser Technik kann ebenfalls in Abhängigkeit der eingesetzten Zellzahl die Sphäroidgröße variiert werden. Ein Nachteil dieser Methode ist die Schwierigkeit, Medienwechsel durchzuführen und die maximale Größe des Tropfens von circa 50µl (Kurosawa, 2007).

Bei der Anwendung von „Agitation-based“-Techniken (Abb.12c) wird die Einzelzellsuspension in ständiger Rotation und Bewegung gehalten, so dass die Zellen in Suspension bleiben und dabei Zell-Zell-Kontakte ausbilden können. Diese führen zur Generierung einer großen Anzahl nicht gleichförmiger Sphäroide. Aufgrund der ständigen Rotation sind die Zellen Scherkräften ausgesetzt, die sich auf die Zellphysiologie auswirken können (Lin & Chang, 2008).

Eine weitere 3D-Kultivierungsmethode beruht auf der Einbettung der Zellen in Matrices, die ECM-ähnliche Eigenschaften und -Proteinzusammensetzung aufweisen (Abb.12d). Die Zellen organisieren sich in gewebetypischen Strukturen (Kleinman & Martin, 2005). Die Matrices können aus natürlichen Biomaterialien wie Collagen oder Fibrin bestehen (Baharvand *et al.*, 2006; Willerth *et al.*, 2006). Natürliche Biomaterialien sind biologisch abbaubar, was vorteilhaft im Bereich des Tissue-Engineering ist, in der *in-vitro*-Forschung allerdings unerwünscht sein kann (Knight & Przyborski, 2015). Ein Nachteil sind die Qualitätsschwankungen und die Möglichkeit, dass Matrices tierischen Ursprungs mit Viren kontaminiert sein können. Beim Einsatz synthetischer Matrices ist die chemische Zusammensetzung genau definiert und die mechanischen Eigenschaften modulierbar. Durch das Fehlen von Adhäsionsmolekülen ist eine zusätzliche Beschichtung mit ECM-Proteinen nötig (Knight & Przyborski, 2015).

Alternativ werden 3D-Zellkulturen auch mit Hilfe von festen Trägerstrukturen (Scaffolds) generiert (Abb.12e). Die Scaffolds sind porös oder faserig und werden unter anderen aus Bioglas, Biokeramik oder Titan hergestellt (van den Dolder *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2003). Die Zellen werden in die Gerüste eingesät und wachsen zu gewebe-ähnlichen Strukturen heran. Spezielle Mikrostrukturen für die 3D-Zellkultivierung können Laser-basiert hergestellt werden, in denen Einzelzellen unter *in-vivo*-ähnlichen Bedingungen kultiviert werden können (Klein *et al.*, 2010).

In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass im Gegensatz zu 2D-Zellkulturen Zellen in 3D-Kultur in vielen Aspekten ihre gewebephysiologischen Eigenschaften beibehalten, beispielsweise hinsichtlich Morphologie, Genexpression, Signaltransduktion, Polarisierung, Apoptose, Migration und Proliferation sowie Sensitivität gegenüber Wirkstoffen (Pampaloni *et al.*, 2007; Shield *et al.*, 2009; Zietarska *et al.*, 2007). Beispielsweise zeigten 3D-Sphäroide des Ovarialkarzinoms nach Behandlung mit Paclitaxel eine Überlebensrate von 40-60%. In Monolayer-Zellen wurde dagegen eine Überlebensrate von 20% detektiert (Loessner *et al.*, 2010). Bei einer Analyse von sechs anti-Tumor-Wirkstoffen in Darmkrebszellen zeigten die 3D-Sphäroide ebenfalls eine höhere Resistenz gegenüber den Substanzen als die Monolayer-Zellen (Karlsson *et al.*, 2012). In zellbasierten Assays, die zur Wirkstoffprüfung und Screenings neuer Medikamente verwendet werden, könnte der Einsatz von 3D-Kultursystemen die Effizienz der Identifizierung geeigneter Moleküle und Wirkstoffe im Vergleich zur 2D-Kultur erhöhen (Breslin & O'Driscoll, 2013).

## **1.6 Zielsetzung der Arbeit**

TRPV1-Ionenkanäle sind zelluläre Sensoren und Effektoren, die eine Vielzahl von zellulären Signalkaskaden steuern. Pathologisch veränderte TRPV1-Funktionen stehen offensichtlich mit verschiedenen menschlichen Erkrankungen, wie beispielsweise Atemwegserkrankungen, Diabetes, Hautkrankheiten, entzündliche Darmerkrankungen, Blasenfunktionsstörungen und Tumoren im Zusammenhang. Daher wurde der TRPV1-Ionenkanal jenseits seiner Bedeutung für die Entwicklung neuer Analgetika auch als vielversprechende therapeutische Zielstruktur für weitere Erkrankungen identifiziert. Haupthindernisse in der Entwicklung erfolgreicher TRPV1-spezifischer Medikamente beruhen bisher in nicht tolerierbaren pharmakologischen Nebenwirkungen der identifizierten Agonisten und Antagonisten als auch in einer zu geringen TRPV1-Selektivität. Aufgrund dessen stehen zurzeit weder TRPV1-spezifische Analgetika noch TRPV1-Modulatoren für die klinische Routineanwendung zur Verfügung. Die Identifizierung und Validierung neuer TRPV1-spezifischer, pharmakologisch aktiver Substanzen ist daher essentiell, um das

therapeutische Potenzial des TRPV1-Ionenkanals zukünftig nutzen zu können. Dazu eignen sich insbesondere Screening-Verfahren mit zellbasierten Testsystemen, in denen das Zielprotein funktionell exprimiert ist und die Zellreaktion auf pharmakologisch aktive Substanzen direkt analysiert werden kann.

In diesem Zusammenhang war das Ziel der vorliegenden Dissertation die Entwicklung von zellbasierten Testsystemen (zelluläre Assays), die für eine zielgerichtete Wirkstofffindung und –validierung von neuen, potenziellen Modulatoren des humanen TRPV1-Ionenkanals genutzt werden können. Der zelluläre Assay für die Wirkstofffindung sollte für Einzelzellanalysen als auch Hochdurchsatz-Screening-Verfahren einsetzbar sein und dazu folgende Anforderungen umsetzen: (i) das Zielmolekül hTRPV1 sollte in CHO-K1-Zellen regulierbar exprimiert werden, um unterschiedliche Expressionshöhen von hTRPV1-Ionenkanälen in den Zellen darstellen und davon beeinflusste Wirkungseffekte analysieren zu können, (ii) das hTRPV1-Gen sollte als fluoreszentes Fusionsprotein exprimiert werden, um die Expression als auch die Lokalisation der TRPV1-Kanäle überprüfen und quantifizieren zu können, (iii) die pharmakologische Wirksamkeit getesteter Substanzen zur Aktivierung bzw. Inhibierung der TRPV1-Kanäle sollte schnell und direkt über eine Fluoreszenz-basierte Messmethode erfasst werden, die eine Quantifizierung der intrazellulären Calciumkonzentration ermöglicht, (iv) der zelluläre Assay sollte in 96-Well-Mikrotiterplatten etabliert werden und einen Z'-Faktor aufweisen, der einen sinnvollen Einsatz in Hochdurchsatzverfahren erlaubt. Der zweite Teil der Arbeit zielte auf die Etablierung eines krankheitsrelevanten, zellulären Testsystems für Brustkrebs, das eine Bewertung der biologischen Aktivität von selektionierten TRPV1-Agonisten und -Antagonisten in Brustkrebszelllinien mit endogener TRPV1-Expression ermöglichen sollte. Die Wirksamkeit der getesteten Substanzen sollte über die Änderung der intrazellulären Calcium-Konzentration gemessen werden. Die Analyse sollte in verschiedenen Zelllinien erfolgen, die die verschiedenen Brustkrebs-Subtypen repräsentieren. Damit einhergehend sollte der TRPV1-Ionenkanal als potenzielles therapeutisches Zielmolekül für Brustkrebs verifiziert werden.

Beide zellulären Testsysteme, der CHO-Assay mit heterologer als auch der Brustkrebs-Assay mit endogener TRPV1-Expression, sollten als 2D- und 3D-Zellkultursysteme entwickelt werden. 3D-Zellkulturmodelle eröffnen im Vergleich zu Monolayer-Zellmodellen neue Möglichkeiten, aussagekräftigere *in-vitro*-Testsysteme

für die Wirkstoffentwicklung und Substanzprüfung zur Verfügung zu stellen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten Sphäroid-Kulturen als 3D-Zellmodelle im 96-Well-Mikrotiterplatten-Format entwickelt und eine dafür geeignete Analysemethode etabliert werden, mit der Effekte von TRPV1-spezifischen Wirkstoffen auf die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration direkt im intakten Sphäroid messbar sind. Der Vergleich von 2D-Monolayer-Zellmodell und 3D-Sphäroidmodell sollte anhand von Wirksamkeitsanalysen bekannter Agonisten und Antagonisten erfolgen.

## 2. MATERIAL & METHODEN:

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte

Tabelle 2: Geräteliste

Name	Hersteller
Autoklav VX-150 und 2540 EL	Systec GmbH, Wettenberg
Axio Cam HRm Kamera	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Begasungsbrutschrank HERAccl	Thermos Fisher Scientific, USA
Eismaschine ZBE 30-10	Ziegra, Hannover
EL800 Absorbance Microplate Reader	Bio-Tek Instruments, USA
Elektrophorese Power Supply PowerPACTM	BioRad, München
Elektrophorese System Mini-PROTEAN®	BioRad, München
Feinwaage Kern 770	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Geldokumentationssystem, Gel Doc 1000	BioRad, München
Grobwaage Kern 440-47	Kern & Sohn GmbH, Balingen
ImagEM C9100-13, EM-CCD Camera	Hamamatsu Photonics, Japan
Inverses Mikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Inverses Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Kryobehälter ARPEGE 110	Air Liquide, Düsseldorf,
Kryostat Leica CM3050 S	Leica, Wetzlar
Kühl -und Gefrierschrank (+4°C, -20°C)	Liebherr, Nürnberg
Kühl-Standzentrifuge ZK 380	Hermle Labortechnik, Wehingen
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Lumi Imager-F1TM	Roche Diagnostics, Schweiz
Magnetrührer IKA MAGRH	IKA Labortechnik, Staufen,
Mikroplatten-Reader CLARIOstar®	BMG Labtech, Ortenberg
Multifuge 3SR+	Heraeus Instruments, Hanau
pH-Meter 765 Calimatic	Knick GmbH & CO. KG, Berlin

Reinstwasseranlage Milli-Q®	Merck Millipore, Darmstadt
Spectrophotometer, Nanodrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific, USA
Sterilwerkbank HERAsafe®	Thermo Fisher Scientific, USA
Thermal Cycler	Techne Inc., USA
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühlschrank (-80°C)	Sanyo, Osaka, Japan

## 2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Benötigte Chemikalien und Reagenzien

Name	Hersteller
Agarose	Electran, USA
29% Acryl- 1% Bisacrylamid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
AMG-9810	Cayman Chemical, USA
APS	Applichem, Darmstadt
BCTC	Cayman Chemical, USA
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
CaCl <sub>2</sub> • 6 H <sub>2</sub> O	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Capsaicin	Cayman Chemical, USA
Capsazepine	Cayman Chemical, USA
CAPSO	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
D-Glukose, Monohydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
DMSO	Applichem, Darmstadt
dNTPs	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Doxyzyklin	PAA Laboratories, Egelsbach
EDTA	Sigma Aldrich, München
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
FCS	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund
Fluo-8®-AM	AAT-Bioquest, USA

FuGene HD	Promega, Mannheim
Gefriereinbettmedium OCT	Leica, Wetzlar
GelRed	Biotium, USA
Geneticin (G418)	PAA Laboratories, Egelsbach
Glycin	Applichem, Darmstadt
Glycerin	Applichem, Darmstadt
HEPES	Applichem, Darmstadt
Hoechst33342	Life Technologies, Carlsbad
Hygromycin B	PAA Laboratories, Egelsbach
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
KCl	Applichem, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
MgCl <sub>2</sub> • 6 H <sub>2</sub> O	Applichem, Darmstadt
Magermilchpulver	Applichem, Darmstadt
Mowiol	Sigma Aldrich, München
NaCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
NaOH	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
NOD	Sigma Aldrich, München
Nonidet® P40	Sigma Aldrich, München
PFA	Sigma Aldrich, München
Pfusion Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
PMSF	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Probenecid	Sigma Aldrich, München
Propidium Iodid	Sigma Aldrich, München
Resiniferatoxin	Enzo Life Sciences, Lörrach
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Ruthenium Red	Biomol, Hamburg
SB-366791	Biomol, Hamburg

SDS	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
TEMED	Applichem, Darmstadt
Tet-approved FCS	Biological Industries, Israel
Tris-Base	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris-HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Triton X-100	Applichem, Darmstadt
Tween 20	Applichem, Darmstadt

### 2.1.3 Antikörper

Es wurden die in Tabelle 4 aufgeführten Antikörper benutzt.

**Tabelle 4: Liste der genutzten Antikörper**

Name	Hersteller
Kaninchen anti-TRPV1, # NB100-98899	Novus Biologicals, Wiesbaden
Ziege anti-mCherry, # AP32117PU-S	Acris Antibodies GmbH, Herford
Maus anti-GAPDH, #MA5-15738	Thermo Fisher Scientific, USA
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)-HRP, #111-035-045	Dianova, Hamburg
Ziege anti-Maus IgG (H+L)-HRP, #DAB-87598	Dianova, Hamburg
Maus anti-Ziege/Schaf IgG-Peroxidase, #A-9452	Sigma-Aldrich, München

### 2.1.4 Verbrauchsmaterial und Zubehör

Alle in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien und Zubehör, falls nicht anders angegeben, stammten von folgenden Herstellern und Lieferanten:

- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Greiner Bio-One, Frickenhausen
- Milli-Pore GmbH, Dramstadt
- Carl Zeiss AG, Oberkochen
- Sigma Aldrich, München
- VWR GmbH, Bruchsal
- Thermo Fisher Scientific, USA
- Eppendorf, Hamburg

### 2.1.5 Objektive und Filter

Alle Objektive und Filtersätze stammten von Carl Zeiss AG aus Oberkochen und sind in Tabelle 5 und 6 aufgelistet.

**Tabelle 5: Auflistung der Objektive**

Objektiv	Referenz
EC Plan-Neofluar 10x/0.3 Ph1	440331-9902-000
EC Plan-Neofluar 20x/0.5 Ph2	440341-9904-000
LD Plan-Neofluar 20x/0.40 Korr	441340-9970-000
LD Plan-Neofluar 40x/0.60 Korr	441350-9970-000
Plan-Neofluar 63x/1,25 Oil Ph3	440461-0000-000

**Tabelle 6: Auflistung der genutzten Filter am Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M**

Filter	Referenz
Filtersatz 46 YFP shift free (E) EX BP 500/20, BS FT 515, EM BP 535/30	000000-1196-681
Filtersatz 49 DAPI shift free (E) EX G 365, BS FT 395, EM BP 445/50	488049-9901-000
Filtersatz 45 HQ TexasRed, d=25 shift free (E) EX BP 560/40, BS FT 585, EM BP 630/75	000000-1114-462

### 2.1.6 Kommerzielle Kits

**Tabelle 7: Auflistung der genutzten Kits**

Name	Hersteller
EndoFree Plasmid Maxi Kit (10), #12362	Quiagen, Hilden
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, #740609.250	Machery-Nagel, Düren
Pierce™ BCA Protein Assay Kit, #23225	Thermo Fisher Scientific, USA
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay, #G8080	Promega, Mannheim

### 2.1.7 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide stammten von Sigma-Aldrich in München.

Fwrđ E2 Crimson: 5'—TAGGCATATGCCACTAGTCGCCACCATGGA—3'

Rev E2 Crimson: 5'—GATCGGATCCCGCTACTGGAACAGGTGG—3'

Fwrđ mCherry: 5'—TAGGCATATGCCACCGGTGCGCCACC—3'

Rev mCherry: 5'—GATCGGATCCCCTCTACAAATGTGGTATGGC—3'

### 2.1.8 Plasmide

Die in dieser Arbeit genutzten und generierten Plasmide sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

**Tabelle 8: Auflistung der Plasmide**

Plasmid	Herkunft
pMK-RQ-hTRPV1	Life Technologies, Carlsbad
pm-Cherry-N1	Clontech, Frankreich
pE2-Crimson-N1	Clontech, Frankreich
pCMV-Tet3G	Clontech, Frankreich
pTRE3G	Clontech, Frankreich
pTRE3G-hTRPV1	Diese Arbeit
pTRE3G-hTRPV1-E2-Crimson	Diese Arbeit
pTRE3G-hTRPV1-mCherry	Diese Arbeit

## 2.1.9 Zelllinien und Medien

Die verwendeten Zelllinien und dazugehörige spezifische Medien sind in Tabelle 9 aufgeführt.

**Tabelle 9: Verwendete Zelllinien und Zellkulturmedien**

Name	Beschreibung	Herkunft	Medium
CHO-K1	Subklon der Ovarialzelllinie CHO (Chinese Hamster Ovary), epithelial	ATCC	Ham's F12 +10% FCS +100U/ml Penicillin +0.1mg/ml Streptomycin
CHO-3G	Mit Tet-On 3G-Transaktivator (Clontech) stabil transfizierte CHO-K1 Zelllinie, epithelial	Markus Worf	Ham's F12 +10% FCS +100U/ml Penicillin +0.1mg/ml Streptomycin +200µg/ml Gentamicin
CHO <sup>I-hTRPV1</sup> <sub>-10-14</sub>	Mit TRPV1-mCherry stabil transfizierte CHO-Tet-On 3G Zelllinie, epithelial	diese Arbeit	Ham's F12 +10% Tet-approved FCS +100U/ml Penicillin +0.1mg/ml Streptomycin +20mM Hepes pH 7.4 +200µg/ml Gentamicin +100µg/ml Hygromycin B
BT-474	Duktales Adenokarzinom-Brust, epithelial	Cell Lines Services	DMEM/F12 1:1 + 10% FCS + 5µg/ml Insulin
MDA-MB-231	Adenokarzinom-Brustdrüse, epithelial	Cell Lines Services	DMEM/F12 1:1 + 5% FCS
MDA-MB-468	Adenokarzinom-Brustdrüse, epithelial	Cell Lines Services	DMEM/F12 1:1 + 5% FCS
MDA-MB-436	Adenokarzinom-Brustdrüse, epithelial	Cell Lines Services	DMEM/F12 1:1 + 10% FCS
HCC1500	Duktales Karzinom-Brust, epithelial	ATCC	RPME-1640 +10% FCS
HCC38	Duktales Karzinom-Brust, epithelial	ATCC	RPME-1640 +10% FCS
T47D	Duktales Karzinom-Brust, epithelial	ATCC	RPME-1640 +10% FCS
MCF7	Adenokarzinom-Brustdrüse, epithelial	ATCC	Eagle's MEM +10% FCS +0.01mg/ml Insulin
SkBr3	Adenokarzinom-Brustdrüse, epithelial	Cell Lines Services	DMEM +10% FCS
MCF10A	Brustdrüse, epithelial	ATCC	DMEM/F12 1:1 +20 ng/ml Human epidermal growth factor +100 ng/ml cholera toxin +0.01 mg/ml Insulin +500 ng/ml hydrocortisone, +5% Donor Horse Serum
MCF12A	Brustdrüse, epithelial	ATCC	DMEM/F12 +20 ng/ml Human epidermal growth factor +100 ng/ml cholera toxin +0.01 mg/ml Insulin +500 ng/ml hydrocortisone, +5% Donor Horse Serum

### 2.1.10 Bakterien

Die genutzten Bakterien stammten von der Firma Life Technologies in Carlsbad.

➤ E.coli Top 10

Genotyp: *F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str<sup>R</sup>) endA1 λ<sup>-</sup>*

➤ DH10B

Genotyp: *F- endA1 deoR+ recA1 galE15 galK16 nupG rpsL Δ(lac)X74 φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) StrR λ*

### 2.1.11 Software

Die in dieser Arbeit genutzte Software ist in Tabelle 10 gelistet.

**Tabelle 10: Verwendete Software**

Name	Anwendung	Referenz
AnaSP	3D Zellkultur Bildanalyse	Piccini, 2015
Axio Vison	Bildanalyse und digitale Mikroskopie	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Citavi 5	Literaturverwaltung	Citavi, Schweiz
GraphPad Prism, Version 6	Grafische Datenanalyse	GraphPad Software Inc., USA
ImageJ	Bildverarbeitung und Analyse in JAVA	<a href="https://imagej.nih.gov/ij/">https://imagej.nih.gov/ij/</a>
MARS Data Analysis	Analysesoftware des Plattenlesegerätes	BMG Labtech, Ortenberg
Peptide Cutter	Analyse von Proteaseschnittstellen	<a href="http://web.expasy.org/peptide_cutter">http://web.expasy.org/peptide_cutter</a>
ReVisp	Erstellen von 3D Rekonstruktionen von Sphäroidaufnahmen	Piccini <i>et al.</i> , 2015
Serial Cloner 2.6	Erstellen der Klonierungsstrategien	<a href="http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html">http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html</a>

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 DNA-Amplifizierung mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur spezifischen Amplifikation der mCherry- und E2-Crimson-DNA wurde eine Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. Die PCR-Ansätze wurden mit einem Volumen von 50µl angefertigt. Diese setzten sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Polymerase-Puffer [10x]	1/10 Volumen des Gesamtansatzes
dNTPs [10mM]	1/10 Volumen des Gesamtansatzes
Primer forward [10µM]	1/20 Volumen des Gesamtansatzes
Primer reverse [10µM]	1/20 Volumen des Gesamtansatzes
Phusion Polymerase [5U/µl]	0,3 - 0,5µl
H <sub>2</sub> O ad	xµl
Template-DNA [25ng]	xµl

Die DNA-Fragmente wurden in einem Thermocycler nach folgendem in Tabelle 11 aufgeführtem Programm amplifiziert:

**Tabelle 11: Programm Phusion- PCR- Reaktion**

Reaktion	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	98°C	30s	1
Denaturierung	98°C	10s	35
Primer Anbindung	53°C	30s	
Elongation	72°C	25s	
Finale Elongation	72°C	10min	1

### 2.2.2 Gelelektrophorese

DNA-Gelladepuffer (6x): 0,2% (w/v) Bromphenolblau, 60% (v/v) Glycerin  
60mM EDTA, TAE Puffer (40mM Tris-base, 1mM EDTA, 20mM Essigsäure, pH 8,2-8,4)

Die molekulare Größenauftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte über Agarose-Gelelektrophorese. Dieses Verfahren ermöglichte eine Überprüfung und Quantifizierung von PCR-Produkten und Restriktionsfragmenten. Je nach Fragmentgröße wurden 0,8-1,8% Agarose in 35-100ml 1x-TAE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 60°C wurde das Gel gegossen und zur Aushärtung für ca. 20min bei RT stehen gelassen. Die DNA-Proben wurden mit 6x-DNA-Gelladepuffer versetzt und bei einer konstanten Spannung von 80V in einer mit 1x-TAE-Puffer gefüllten Gelkammer für 40-60min aufgetrennt. Als Größenmarker wurde ein entsprechender DNA-Marker aufgetragen. Um die aufgetrennten DNA-Banden nach der Gelelektrophorese sichtbar zu machen, wurden die Agarose-Gele im Gel-Red-Bad (0,5 µg/ml) für 20min gefärbt und mit Hilfe eines Transilluminators unter kurzweiliger UV-Strahlung fotografiert.

### **2.2.3 DNA Extraktion aus Agarosegelen**

Die gewünschte DNA-Bande wurde mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem „PCR clean up / Gel Extraction“-Kit der Firma Machery Nagel nach Herstellerangaben aufgereinigt.

### **2.2.4 Restriktionsverdau**

Pro 100µl Restriktionsansatz wurden circa 3-5µg DNA eingesetzt, sowie 10µl des 10-fach konzentrierten Restriktionspuffers, 3 bis 5 Units Restriktionsenzym (Fermentas) und MilliQ-Wasser. Der Ansatz wurde circa 2h bei 37°C inkubiert.

### **2.2.5 Ligation von DNA Fragmenten**

Für die Ligation wurden circa 20ng Vektor und ein 3-9 molarer Überschuss an Insert gemischt. Dazu wurden 1µl T4-Ligase (Fermentas) und 2µl Ligasenpuffer (Fermentas) gegeben und mit MilliQ-Wasser auf 20µl Endvolumen aufgefüllt. Die Ligation wurde für 25min bei Raumtemperatur durchgeführt und die DNA anschließend in entsprechende *E.coli* Stämme transformiert.

### 2.2.6 Transformation in *E.coli*

Pro Ansatz wurden 50µl bei -80°C gelagerter chemokompetenter *E.coli*-One-Shot MAX Efficiency DH10B-T1-Zellen oder *E.coli*-One-Shot-TOP10-Zellen (Life Technologies) für circa 10min auf Eis aufgetaut. 25ng aufgereinigter Plasmid-DNA oder 2-5µl Ligationsansatz wurden zu den aufgetauten kompetenten Zellen gegeben und für 30min auf Eis inkubiert. Ein Hitzeschock der Zellen erfolgte für 30s bei 42°C mit einer anschließenden zweiminütigen Inkubation auf Eis. Es wurden 250µl vorgewärmtes LB-Medium zugegeben und für 45min bei 37°C geschüttelt. Danach wurden 50µl und 100µl der Transformations-Ansätze auf LB-Agarplatten mit jeweiligen Selektionsmarker ausgestrichen und über Nacht im 37°C Inkubator inkubiert.

Mini-Präparation der Plasmid-DNA:

Resuspensionspuffer P1: 1M Tris-HCl, 0,5M EDTA, pH 8,0,

RNAse A 100mg/ml

Lysepuffer P2: 200mM NaOH, 1% SDS

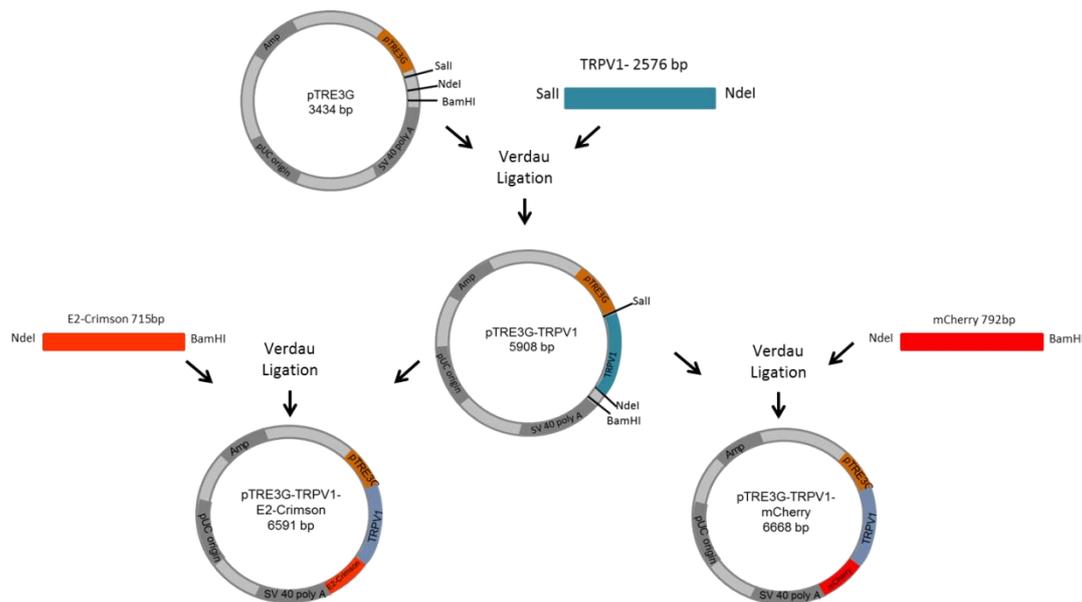
Neutralisierungspuffer P3: 2,8M KAc, pH 5,1

2ml einer Übernachtskultur wurden 2,5min bei 15.700rcf zentrifugiert. Das Pellet wurde in 300µl Puffer P1 (Resuspensionspuffer) resuspendiert. 300µl Puffer P2 (Lysepuffer) wurden zugefügt und die Proben 3-5mal invertiert. Nach dreiminütiger Inkubation erfolgte die Zugabe von 300µl Puffer P3 (Neutralisierungspuffer) und die Proben wurden wieder 3-5mal invertiert. Danach folgte eine Zentrifugation bei 15.700rcf für 10min und der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt. Zu dem Überstand wurde ein Volumen Isopropanol gegeben und die DNA für 20min bei -20°C gefällt. Nach der Fällung wurden die Proben ein weiteres Mal für 15min bei 15.700rcf zentrifugiert und mit 70% Ethanol gewaschen. Die Pellets trockneten bei RT und wurden in 50µl H<sub>2</sub>O gelöst.

## 2.2.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäurenkonzentration wurde durch das Messen der Absorption bei 260nm mit einem Nanodrop ND-1000 Photometer bestimmt.

## 2.2.8 Generierung pTRE3G-hTRPV1- E2-Crimson und -mCherry Plasmide



**Abbildung 14: Schematische Darstellung der Generierung der humanen TRPV1-E2-Crimson- und TRPV1-mCherry-Plasmide.**

Die hTRPV1-Nukleotidsequenz (NCBI Referenz: NG\_029716.1) wurde mittels Gensynthese mit einer Sall-Schnittstelle am 5'-Ende und einer NdeI-Schnittstelle am 3'-Ende von der Firma Life-Technologies hergestellt. Das hTRPV1-DNA-Fragment wurde mit den Enzymen Sall und NdeI aus dem Vektor pMK-RQ-hTRPV1 geschnitten. Der pTRE3G-Vektor wurde ebenfalls mit diesen Enzymen verdaut. Es erfolgte eine Ligation der linearen Vektorfragmente und des hTRPV1-DNA-Fragments zum Plasmid pTRE3G-hTRPV1 über die entstandenen klebrigen Enden. Die mCherry- und E2-Crimson-DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der in 2.1.7 gelisteten Primer über PCR mit Pfu-DNA-Polymerase amplifiziert. Dabei wurde über die verwendeten Primer am 5'-Ende eine NdeI- und am 3'-Ende eine BamHI-Schnittstelle eingeführt. Als Template dienten die Plasmide pm-Cherry-N1 und pE2-Crimson-N1. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mit den Enzymen NdeI und

BamHI verdaut. Das hergestellte Plasmid pTRE3G-hTRPV1 wurde ebenfalls mit den Enzymen NdeI und BamHI verdaut.

## **2.3 Proteinanalytische Methoden**

### **2.3.1 Zelllysatherstellung**

Zellysepuffer: 50mM Tris-HCl, pH 7,5; 15mM NaCl, 5% NP-40, 50mM NaF, Protease-Inhibitor-Cocktail (P8340 Sigma-Aldrich), 1mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)

Die adhärennten Zelllinien wurden in Petrischalen (100mm x 20mm) ausgesät und ca. 2 bis 3 Tage bis zur Subkonfluenz kultiviert. Die Zellen wurden dann mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend 300µl eiskalter Zellysepuffer zugegeben. Die Petrischalen wurden bei 4°C 15min geschüttelt und die restlichen Zellen anschließend mit einem Zellschaber abgeschabt. Der resultierende Zellaufschluss wurde in ein Mikrozentrifugen-Röhrchen überführt und 45min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte eine zehnmünütige Zentrifugation bei 10.000g 4°C. Der erhaltene Überstand, das Zelllysate, wurde in ein frisches Röhrchen überführt und der Proteingehalt mittels des BCA-Assays (Pierce) nach Herstellerangaben bestimmt. Anschließend wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### **2.3.2 SDS-PAGE und Immunoblot**

Ladepuffer (6x): 120mM Tris, 100mM EDTA, 20% Glycerin, 2% SDS, 4g/L Bromphenolblau, 450mM β-Mercaptoethanol, pH 7,2-7,4

Sammelgel: 29% Acryl- 1% Bisacrylamide, Stacking Puffer (0,5M Tris-HCl, pH 6,8; 0,4%SDS), 10% SDS, H<sub>2</sub>O, 10% APS, TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin).

---

Trenngel (10%):	29% Acryl- 1% Bisacrylamide, Trennpuffer (1,5M Tris-HCl, pH 8,8, 0,4% SDS), 10% SDS, H <sub>2</sub> O, 10% APS, TEMED
Laufpuffer (10x):	250mM Tris Base, 1,9M Glycin, 1% SDS (w/v), pH 8.3
Transferpuffer (10x):	10mM CAPSO, pH 11; 15% Methanol
PBS-T:	137mM NaCl, 2,7mM KCl, 2mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2 H <sub>2</sub> O, pH 7,4; 0,1% Tween-20
Blockierlösung:	5% Magermilchpulver in PBS-T

Mit der **Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)** können Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Zellysate wurden mit dem Ladepuffer gemischt und für 10min bei 40°C in einem Heizblock denaturiert. Es wurden jeweils 50µg Protein pro Tasche in 10%ige Polyacrylamidgele geladen. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Stromspannung von 130V für circa 2h in 1x-Laufpuffer durchgeführt.

Um die mittels der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine zu identifizieren, wurden diese auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Das SDS-Polyacrylamidgel wurde nach der Auftrennung auf ein mit Transferpuffer befeuchtete Nitrocellulosemembran gelegt. Auf jeder Seite wurden je zwei mit Transferpuffer befeuchtete Whatman 3 MM Filterpapiere und ein Schwamm gelegt. Dieser Stapel wurde in die Transferapparatur eingespannt und der Tank der Apparatur mit Puffer aufgefüllt. Der Transfer erfolgte bei 350mA für 1,5h. Anschließend wurde die Membran in Blockierlösung für 2h bei RT oder über Nacht bei 4°C geschwenkt. Nach dem Blockieren der unspezifischen Bindestellen wurde die Membran mit PBS-T 5x5min gewaschen und mit dem Erstantikörper für 2h bei RT inkubiert. Danach erfolgte ein weiterer Waschschrift von 5x5min in PBS-T sowie die Inkubation mit einem mit HRP (horsereadish-peroxidase)-Enzym konjugierten Zweitantikörper für 1h bei RT. Die Membran wurde dann erneut 5x5min mit PBS-T gewaschen, um schließlich die Immundetektion durchzuführen. Es wurde 1ml einer Entwicklerlösung angesetzt (Pierce) und auf die Membran getropft. Das in der Lösung enthaltenen Luminol sowie Wasserstoffperoxid werden von dem HRP-Enzym des Zweitantikörpers umgesetzt, wodurch eine Chemilumineszenz emittiert wird. Diese konnte dann mit dem Lumi Imager-F1™ detektiert werden.

## 2.4 Zellbiologische Methoden

### 2.4.1 Kultivierung der Zelllinien

Zellspezifisches Medium: siehe 2.1.9

Trypsin-EDTA (10x): 2g/l EDTA, 9g/l NaCl, 5g/l Trypsin, Dulbecco's PBS

Dulbecco's PBS: 0,2g/l KCl, 0,2g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8g/l NaCl, 1,15g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

Die adhären wachsenden Zellen wurden im jeweiligen zellspezifischen Medium (Tab. 8) in einem Begasungsbrutschrank (Heraeus) bei 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert. Die Zellen wurden 2-3-mal pro Woche subkultiviert. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit Dulbecco's-PBS gewaschen und anschließend mit 1x-Trypsin-EDTA bedeckt. Die Trypsin-EDTA-Inkubation erfolgte für 5-10min im Begasungsbrutschrank. Danach wurden die abgelösten Zellen mit FCS-haltigem Medium resuspendiert. Die Zellzahl der erhaltenen Zelllösung wurde mit Hilfe des Zellzählgerätes ViCell (Beckham-Coulter) bestimmt.

### 2.4.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Einfriermedium: Zellspezifisches Medium, 20% FCS, 10% DMSO

Zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen zunächst trypsiniert, dann zentrifugiert und das Zellpellet in Einfriermedium resuspendiert.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden in je 1ml Einfriermedium pro Kryoröhrchen überführt und dieses in einem Styroporgefäß langsam (1°C/min) bei -80°C eingefroren. Nach 24h wurden die Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff bei einer Temperatur von -196°C eingelagert.

Um die Zellen wieder aufzutauen, wurden die Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank und im 37°C-Wasserbad zügig aufgetaut. Die aufgetauten Zellen wurden in 10ml vorgewärmtes Medium überführt und abzentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 5ml Medium resuspendiert und die Zellen in eine T25-Zellkulturflasche ausgesät. Nach 24h-48h erfolgte ein Medienwechsel oder der Transfer in eine T75-Zellkulturflasche.

## 2.4.3 Bestimmung der Zellviabilität

### 2.4.3.1 CellTiter-Blue®-Cell Viability

Die Viabilität wurde mit Hilfe des „CellTiter-Blue®-Cell Viability Assays“ gemessen. Dabei wird den Zellen der Redoxindikator Resazurin zugeführt, welcher in metabolisch aktiven Zellen durch das Enzym Diaphorase unter Oxidation von NADH zu NAD<sup>+</sup> zu dem rot fluoreszierenden Resorufin reduziert wird. Die irreversible Reduktion von Resazurin zu Resorufin ist proportional zur Zellatmung. Es wurden jeweils 20µl des CellTiter-Blue® Reagenz pro Well zugegeben und es erfolgte eine zweistündige Inkubation im Begasungsbrutschrank. Danach wurde die Fluoreszenz mit Hilfe eines Mikroplattenreaders (560nm<sub>EX</sub>/590nm<sub>EM</sub>) gemessen. Die erhaltenen Messdaten wurden hinsichtlich unspezifischer Hintergrundsignale korrigiert. Als Hintergrundwert diente der Mittelwert der „CellTiter-Blue®-Fluoreszenzintensität in Wells die keine Zellen enthielten.

### 2.4.3.2 Propidium-Iodid (PI) Exklusionstest

Zur Bestimmung der Toxizität wurde ein fluorimetrischer Viabilitätstest durchgeführt, der auf der Exklusion von Propidiumiodid durch Zellen, deren Membran intakt ist, basiert. In abgestorbene Zellen mit defekter Zellmembran kann der Farbstoff eindringen und die DNA anfärben. Nach Permeabilisieren der Membran mit 1% Triton X-100 kann anschließend die DNA aller Zellen angefärbt werden. Durch Messen der PI Fluoreszenzintensität vor und nach der Lyse der Zellen mit Triton X-100 lässt sich so eine Aussage über die Viabilität, d.h. Anteil lebender Zellen, der Zellen treffen. Die Viabilität der Zellen berechnet sich aus den PI-Fluoreszenzintensitäten vor (PI<sub>vor Lyse</sub>) und nach der Lyse mit Triton X-100 (PI<sub>nach Lyse</sub>). Diese wurden vorher hinsichtlich unspezifischer Hintergrundsignale korrigiert. Als Hintergrundwert diente der Mittelwert der PI-Fluoreszenzintensität zellfreier Wells. Die Viabilität wurde dann mit der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Viabilität} = 1 - (\text{PI}_{\text{vor Lyse}} / \text{PI}_{\text{nach Lyse}})$$

#### 2.4.4 Transiente und stabile Transfektion

CHO-Tet-On-3G-Zellen wurden mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml in 6-Well-Platten ausgesät. Nach 24h erfolgte die Transfektion. Es wurde ein Verhältnis von DNA zu Transfektionsreagenz von 2:1 eingehalten. Das Transfektionsreagenz Fugene HD (3,4 $\mu$ l) wurde zu 100 $\mu$ l serumfreien Mediums zugegeben und es erfolgte eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die linearisierte pTRE3G-hTRPV1-mCherry-Plasmid-DNA bzw. pTRE3G-hTRPV1-E2-Crimson-Plasmid-DNA (1,6 $\mu$ g) sowie ein linearer Hygromycin-Selektionsmarker (80ng) zugefügt und für 25min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der 100 $\mu$ l-Ansatz in das Well der 6-Well-Platte gegeben und die Platte in den Begasungsbrutschrank gestellt.

Nach 24h-48h wurde die Morphologie und Vitalität der Zellen mikroskopisch überprüft. Um stabile Zelllinien zu produzieren, wurde durch die Zugabe von 175 $\mu$ g/ml Hygromycin B ein Selektionsdruck ausgeübt. Die generierten Zellen (Mischklone) wurden fluoreszenzmikroskopisch analysiert und subkloniert.

#### 2.4.5 Subklonierung zur Selektion stabiler hTRPV1-mCherry-Einzelklone

Selektionsmedium: Ham's F12, 10% Tet-approved FCS, 1% Pen/Strep, 500 $\mu$ g/ml G418, 175 $\mu$ g/ml Hygromycin B

Zur Subklonierung von Einzelklonen wurden Zellen der Mischklone mit einer berechneten Zellzahl von 5, 10 und 15 Zellen pro Petrischale ( $\varnothing$ 10cm) in 10ml Selektionsmedium ausgesät. Sobald einzelne Kolonien sichtbar wurden, wurden diese in ein Well einer 24-Well-Platte übertragen. Eine Parallelplatte wurde ausgesät, sobald die Zellen der ersten Platte konfluent waren. Zellen einer Platte wurden mit 500ng/ml Doxyzyklin induziert und nach 24h die mCherry-Fluoreszenz der verschiedenen Klone mikroskopisch analysiert. Klone in denen eine mCherry-Fluoreszenz detektiert wurde, wurden von der Parallelplatte in 6-Well-Platten übertragen. Die selektionierten Einzelklone wurden kryokonserviert und parallel auf Eigenschaften, wie beispielsweise Regulation der Expression und Aktivierbarkeit des TRPV1-Kanals, analysiert.

### 2.4.6 Herstellung von Sphäroidkulturen

Zur Generierung von Sphäroiden wurden Zellen in speziell beschichtete Mikrotiterplatten im 96-Well-Format ausgesät. In dieser Arbeit wurden zum einem Lipidure-Platten der Firma Amsbio als auch ULA (Ultra-Low-Attachment)-Platten der Firma Corning verwendet. Die Lipidure Platten sind mit einem MPC (2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)-Polymer beschichtet, welches durch gebundene biokompatible Phosphorylcholine zellabweisend wird. Die ULA-Platten sind mit einem kovalent gebundenen hydrophilen, neutral geladenen Hydrogel beschichtet, welches die Bindemöglichkeiten von Adhäsionsproteinen der Zellen sehr stark reduziert.

Zellen wurden mit Dichten von 10.000 Zellen pro Well in 200µl Endvolumen ausgesät und die Platte anschließend bei 400g 5min bei RT zentrifugiert. Danach erfolgte eine Inkubation von 48h. CHO-<sup>I-hTRPV1</sup>-Zellen wurde nach 24h mit 10ng/ml Doxyzyklin induziert und für weitere 24h inkubiert. Anschließend wurde die Sphäroidbildung mikroskopisch überprüft.

### 2.4.7 Herstellung von Sphäroidschnitten

Für Sphäroidschnitte wurden zunächst CHO-<sup>I-hTRPV1</sup>-Sphäroide, wie in 2.4.6 beschrieben, generiert. 15-25 Sphäroide wurden mit Hilfe einer abgeschnittenen 1000µl-Pipette in ein 15ml Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend mit PBS gewaschen. Danach wurde 4%ige PFA(Paraformaldehyd)-Lösung zu den Sphäroiden gegeben, und die Fixierung erfolgte für 30min auf einem Röhrchenroller bei RT. Die Fixierlösung wurde durch PBS, dem ein Tropfen Tween 20 zugesetzt wurde, ersetzt, und es folgte ein 30minütiger Inkubationsschritt auf dem Röhrchenroller. Die fixierten Sphäroide wurden in eine Einbettkammer (Cryomold, Tissue Tek) überführt und ein Tropfen des Einbettmediums OCT (optimum cutting temperature) zugegeben. Die Kammer wurde auf Trockeneis gelegt bis das OCT gefroren war. Der so erhaltene OCT-Block konnte bei -20°C gelagert werden. Schnitte von 10µm-Dicke wurden mit dem Cryostat angefertigt und diese auf Objektträger übertragen. Es folgte eine DNA-Färbung der Schnitte mit 1ml Hoechst 33342 (1µg/ml) über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zweimal

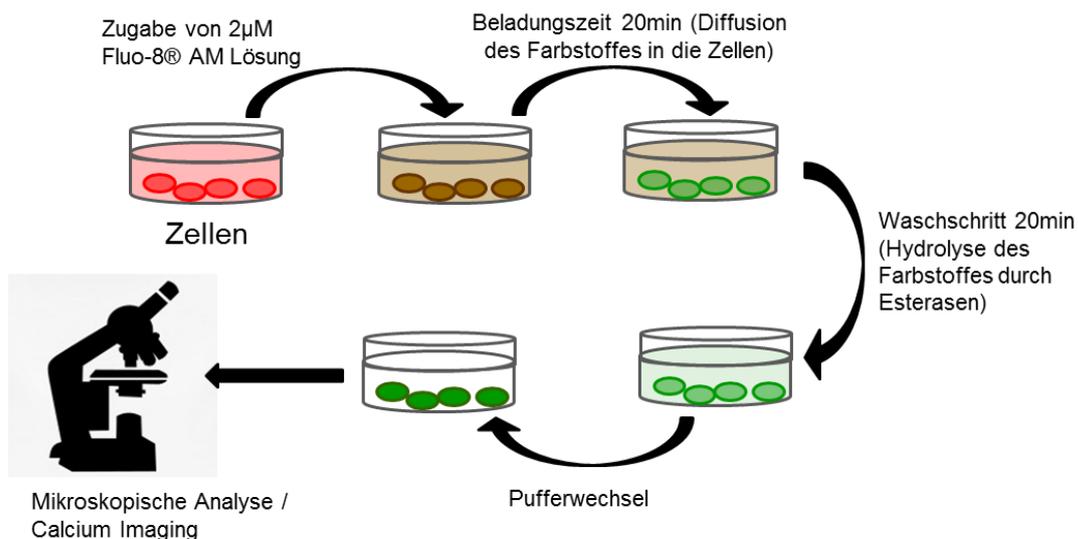
mit PBS gewaschen und die Objektträger mit Deckgläschen und Mowiol eingedeckt. Die Schnitte wurden fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

## 2.5 Fluoreszenzmikroskopische und Mikroplattenreader-basierte Methoden

### 2.5.1 Calcium Imaging

Fluo-8® AM: Fluoreszein-basierter Acetomethylester (Fluoreszenz-indikator für die Detektion intrazellulären Calciums)

External Puffer: 140mM NaCl, 3,5mM KCl, 2mM CaCl<sub>2</sub>x2H<sub>2</sub>O, 1mM MgCl<sub>2</sub>x 6H<sub>2</sub>O, 10mM HEPES, 20mM D-Glucose Monohydrat, pH 7.4 mit NaOH, steril filtriert (0,2µm)



**Abbildung 15: Schematische Darstellung der Fluo-8® AM-Beladung in Monolayer-Zellen für Calcium-Imaging.** Modifiziert nach EMBL.de

Zur mikroskopischen Analyse der intrazellulären Calciumkonzentration wurden Zellen in Petrischalen (ø 35mm) mit einer Zelldichte von 75.000 Zellen ausgesät. Zur Analyse der Sphäroide wurden 10.000 Zellen pro Well in 200µl einer 96-Well-Lipidure-Platte ausgesät. Zur Induktion der hTRPV1-mCherry-Expression wurden die CHO<sup>-I-hTRPV1</sup>-Zellen nach 24h mit Doxyzyklin induziert. Am Tag des Experiments wurde das Medium der Monolayer-Kultur abgenommen, die Zellen mit 1ml External

Puffer gewaschen und mit 1ml 2 $\mu$ M Fluo-8<sup>®</sup> AM in External Puffer beladen. Es erfolgte eine 20-minütige Inkubation in Dunkelheit, währenddessen der Farbstoff in die Zellen diffundieren kann. Anschließend wurde ein Waschschrift durchgeführt, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Es folgte eine 20-minütige Inkubation zur Hydrolyse des Farbstoffes durch intrazelluläre Esterasen. Vor der mikroskopischen Messung wurde ein Pufferwechsel durchgeführt (Abb.15).

160 $\mu$ l des Mediums der Sphäroidkultur wurden abgenommen und 100 $\mu$ l 2 $\mu$ M Fluo-8<sup>®</sup> AM in External Puffer zugegeben. Nach einer 60-minütigen Inkubationszeit in Dunkelheit wurden 100 $\mu$ l der Fluo-8<sup>®</sup> AM-Lösung abgenommen und durch 100 $\mu$ l External Puffer ersetzt. Es folgten eine 20-minütige Inkubation in Dunkelheit und ein Pufferwechsel.

Am Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M wurden zunächst Hellfeldaufnahmen gemacht, sowie bei CHO-<sup>I-hTRPV1</sup> zusätzlich Aufnahmen mit dem Filtersatz 45 (Texas-Red), um die induzierte Expression des TRPV1-Ionenkanals nachzuweisen. In einem Intervall von 2s wurden mit Hilfe der AxioVision Software 20 Aufnahmen mit dem Filtersatz 49 (YFP) und einer Belichtungszeit von 100ms mit der ImagEM C9100-13 EM-CCD Kamera als Basislinie aufgenommen. Dann erfolgte die Stimulation mit Capsaicin oder Puffer durch manuelle Zugabe und weitere 110 Aufnahmen.

## 2.5.2 Bild-Analyse

Die Analyse der erhaltenen Aufnahmen wurde mit Hilfe des Programms ImageJ, der MBF-Plugins-Collection und Microsoft Excel durchgeführt.

### 2.5.2.1 Analyse des Calcium-Imaging

Es wurden alle Zellen als sogenannte ROIs (Region of Interest) im Programm ImageJ markiert und die gemessenen Intensitäten in numerische Daten konvertiert. Diese wurden mit Hilfe der Formel  $(F-F_0)/F_0$  normalisiert. Dabei war F die Fluoreszenzintensität der Zelle in einer Aufnahme und  $F_0$  der Mittelwert der als Basislinie aufgenommenen 20 Bilder vor Stimulierung. Die so erhaltenen Werte wurden gegen die Zeit aufgetragen. Aufgrund eines hohen Signal-Hintergrund-

Verhältnisses wurde im Einzelklon-Screening der CHO-Zellen  $(F-F_0)_{\max}$  analysiert. Dabei wurde der Mittelwert der drei höchsten Fluo-8-Fluoreszenzintensitäten nach Stimulierung bestimmt.

### **2.5.2.2 Analyse der mCherry-Fluoreszenzintensität**

Alle Zellen wurden mit Hilfe des Programms ImageJ als ROIs in den Hellfeld-Aufnahmen markiert und diese ROIs zur Analyse der mCherry-Aufnahmen genutzt. So wurde sichergestellt, dass auch Zellen, die keine sichtbare mCherry-Fluoreszenz aufweisen, analysiert werden. Die gemessenen mCherry-Fluoreszenzintensitäten wurden in Microsoft Excel transferiert. Als mCherry-positiv wurden alle Zellen definiert, deren gemessene mCherry-Fluoreszenzintensität höher als der höchstgemessene Wert in nicht-induzierten Zellen war. Der Anteil mCherry-positiver Zellen wurde prozentual zur Gesamtzellzahl der analysierten Zellen berechnet.

### **2.5.2.3 Analyse der Sphäroidschnitte**

Die mCherry- und Hoechst 33342-Fluoreszenzintensitäten wurden in den Sphäroidschnitten entlang einer äquatorialen, 40µm breiten Linie mit dem ImageJ Tool „Profile Plot“ analysiert, um ein Intensitätsprofil zu erhalten.

### **2.5.2.4 Analyse der Sphäroid-spezifischen Parameter von Hellfeldaufnahmen**

Zur Analyse von Parametern wie Fläche, Durchmesser, Umfang, Volumen und Spherizität der Sphäroide, sowie die Erstellung von 3D Rekonstruktionen wurden die Programme ImageJ, AnaSP und ReVisp genutzt. Die mikroskopischen Aufnahmen der Sphäroide wurden zunächst mit ImageJ analysiert. Es wurde das Sphäroid als ROI markiert und ein binäres Bild, eine sog. „binary mask“, erstellt. Dieses wurde dann mit dem Programm AnaSP analysiert und damit morphologische Parameter wie folgt berechnet:

- Größte und kleinste Achse, berechnet als Länge in Pixel entlang der längsten und kürzesten Geraden durch den Schwerpunkt des Sphäroids

- Durchmesser in Pixel, berechnet anhand des als Querschnitt markierten Sphäroids
- Umfang (P) in Pixel, als Anzahl der Pixel entlang des äußeren Rands des Sphäroids
- Fläche (A), als Anzahl der Pixel innerhalb des Sphäroid Querschnitts
- Volumen (V), erlangt durch 3D Rekonstruktion bei der eine lokale spherische Symmetrie entlang der Maximalachsen angenommen und so die Anzahl der Voxels innerhalb der angenommenen Struktur berechnet wird
- Spherizität (S), nach (Kelm *et al.*, 2003)

$$S = \frac{\pi\sqrt{4A/\pi}}{P}$$

Mit dem Programm ReVisp wurde aus einer „binary mask“ eines Sphäroids eine 3D-Rekonstruktion erstellt (Piccinini *et al.*, 2015).

### 2.5.3 $[Ca^{2+}]_i$ -Messung in CHO-<sup>I-hTRPV1</sup>-Monolayer-Zellen im MTP-Format

Um die Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration nach Stimulierung des TRPV1-Ionenkanals von Monolayer-Zellen im MTP-Format zu messen, wurde in dieser Arbeit ein auf das generierte Zellmodell optimierter Assay entwickelt (Kapitel 3.4). Der entwickelte Assay, mit dem sowohl bekannte TRPV1-Agonisten als auch – Antagonisten getestet wurden, wurde wie folgt durchgeführt.

External Puffer: 140mM NaCl, 3,5mM KCl, 2mM CaCl<sub>2</sub>x2H<sub>2</sub>O, 1mM MgCl<sub>2</sub>x6H<sub>2</sub>O, 10mM HEPES, 20mM D-Glucose Monohydrat, pH 7,4 mit NaOH, steril filtriert (0,2µm)

Fluo-8-Beladungspuffer: External Puffer, 2,5mM Probenecid, 2µM Fluo-8® AM

Waschpuffer: External Puffer, 2,5mM Probenecid

Agonist-Lösung: External Puffer, 2,5mM Probenecid, xµM Agonist

Antagonist-Lösung: External Puffer, 2,5mM Probenecid, xµM Antagonist

Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von  $4 \times 10^4$  Zellen pro Well in eine 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät. Nach 24h erfolgte die Induktion mit 10ng/ml Doxyzyklin.

Nach 24h wurde die Platte aus dem Begasungsbrutschrank genommen und 10min bei RT inkubiert. Von 12 Wells wurde das Medium abgesaugt und durch 100µl Fluo-8-Beladungspuffer ersetzt. Es erfolgte eine Inkubation von 60min bei RT und Dunkelheit. Zur Testung von TRPV1-Agonisten wurde der Beladungspuffer nach der Inkubationszeit durch 100µl Waschpuffer ersetzt. Zur Testung von TRPV1-Antagonisten wurde an Stelle des Waschpuffers 100µl der Antagonist-Lösung zugegeben. Es folgte eine 20-minütige Inkubation bei RT in Dunkelheit und ein Wechsel des Waschpuffers bzw. der Antagonist-Lösung, bevor die Messung der Fluo-8-Fluoreszenzintensität am Mikroplattenreader gestartet wurde.

Zur Gewährleistung gleicher zeitlicher Bedingungen der Messungen wurde mit der Beladung der nächsten 12 Wells in einem zeitlichen Abstand von 10min begonnen.

Den Antagonist-Lösungen sowie dem Waschpuffer wurde Probenecid in einer Endkonzentration von 2,5mM zugesetzt, um eine Blockierung der Anionentransporter in den CHO-Zellen sicherzustellen, so dass der nach der Hydrolyse negativ geladene und aktivierte Farbstoff nicht aus den Zellen transportiert wird.

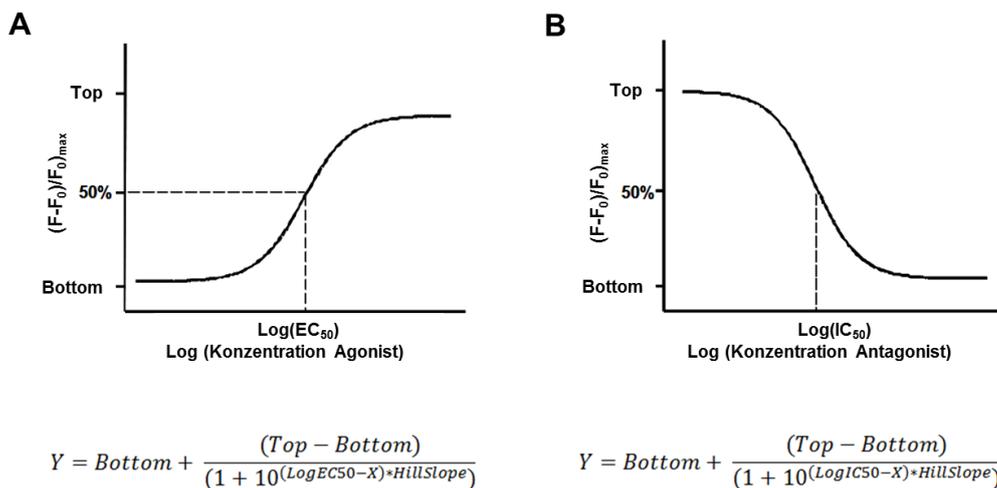
Am Mikroplattenreader wurde in einem Intervall von 7s über 10 Messpunkte, also circa 1min, eine Basislinie bei einer Anregungswellenlänge von 483/14nm und einer Detektionswellenlänge von 530/30nm aufgenommen. Danach erfolgte die Zugabe von 50µl Agonist-Lösung und eine Messung von weiteren 55 Messpunkten, also circa 7min. Die Detektion der Hitzeaktivierung des Ionenkanals wurde mit einem Intervall von 18s gemessen. Nach 7 Messpunkten als Basislinie (2min) wurde die Temperatur der Messkammer kontinuierlich auf 55°C erhöht, und eine Messung von 52 Messpunkten (16min) erfolgte.

Für die Hintergrundmessung wurden 100µl External Puffer ohne Zellen in entsprechende Kontroll-Wells pipettiert und die Messung wie oben beschrieben durchgeführt.

#### **2.5.4 Analyse der in 2.5.3 erhaltenen Daten**

Die Rohdaten der Fluoreszenzmesswerte einer Platte wurden aus der Analysesoftware MARS (BMG Labtech) in Microsoft Excel exportiert. Für jedes

gemessene Well wurde ein gemittelter Wert pro Messpunkt von der Software ausgegeben. Nach Hintergrundkorrektur wurden die gemessenen Fluoreszenzintensitäten mit der Formel  $(F-F_0)/F_0$  normalisiert, wobei  $F$  die Fluoreszenzintensität pro Zeitpunkt und  $F_0$  der Mittelwert der 10 Messpunkte der Basislinie ist. Zur Erstellung von Dosis-Wirkungskurven wurde pro zugegebener Agonist- bzw. Antagonist-Konzentration der Mittelwert der 5 höchsten Intensitäten nach der Agonist-Zugabe berechnet  $((F-F_0)/F_0)_{max}$ . Diese relativen Fluoreszenzintensitäten wurden gegen die Agonist- bzw. Antagonist-Konzentration aufgetragen. Die  $EC_{50}$ - und  $IC_{50}$ -Werte wurden mit dem Programm Graph Pad Prism 6 mit einer nichtlinearen Regressionsanalyse nach folgenden Formeln berechnet (Abb.3).



**Abbildung 16: Schematische Darstellung von Dosis-Wirkungskurven und nicht-linearer Regressionsanalyse.** Basale Antwort (Bottom), maximale Antwort (Top), Konzentration eines Agonisten (A) bzw. Antagonisten (B) bei der die halbmaximale bzw. inhibitorische Wirkung erreicht ist.

### 2.5.5 $[Ca^{2+}]_i$ -Messung in CHO-<sup>h</sup>TRPV1-Sphäroiden

External Puffer: 140mM NaCl, 3,5mM KCl, 2mM  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 1mM  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 10mM HEPES, 20mM D-Glucose Monohydrat, pH 7,4 mit NaOH, steril filtriert (0,2 $\mu$ m)

Fluo-8-Beladungspuffer: External Puffer, 2,5mM Probenecid, 2 $\mu$ M Fluo-8® AM

Waschpuffer: External Puffer, 2,5mM Probenecid

Agonist-Lösung: External Puffer, 2,5mM Probenecid,  $x\mu\text{M}$  Agonist

Antagonist-Lösung: External Puffer, 2,5mM Probenecid,  $x\mu\text{M}$  Antagonist

Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^4$  Zellen pro Well in  $100\mu\text{l}$  Medium in eine 96-Well-Lipidure-Mikrotiterplatte ausgesät. Nach 24h erfolgte die Induktion mit  $100\mu\text{l}$  Doxyzyklin ( $10\text{ng/ml}$  Endkonzentration). Nach 24h wurde die Platte aus dem Inkubator genommen und 10min bei RT in Dunkelheit inkubiert. Von 24 Wells wurden pro Well  $160\mu\text{l}$  des Mediums abgenommen und durch  $100\mu\text{l}$  Fluo-8-Beladungspuffer ersetzt. Es erfolgte eine Inkubation von 60min bei RT und Dunkelheit. Anschließend wurden die Sphäroide in einem Volumen von  $50\mu\text{l}$  in eine 96-Well-U-Bottom-Platte überführt. In dieser Platte wurden pro Well  $50\mu\text{l}$  Waschpuffer (zur Testung von TRPV1-Agonisten) oder  $50\mu\text{l}$  Antagonist-Lösung (zur Testung von TRPV1-Antagonisten) bereits vorgelegt. Eine Inkubation folgte für 20min bei RT und Dunkelheit. Um sicherzustellen, dass die Sphäroide möglichst in der Mitte des Wells positioniert sind, wurde die Platte kurz vor der Messung für circa 30s-1min bei  $400\text{g}$  zentrifugiert. Anschließend wurde die Messung am Mikroplattenreader gestartet.

Zur Gewährleistung gleicher Bedingungen der Messungen wurde mit der Beladung der nächsten 24 Wells in einem zeitlichen Abstand von 10min begonnen.

Während den Inkubationszeiten wurden die Agonist- bzw. Antagonist-Lösungen vorbereitet wie in 2.5.3 beschrieben.

Die Messung erfolgte über ein in Zusammenarbeit mit der Firma BMG Labtech entwickeltes Skript. Das Skript bestand aus zwei Protokollen. Einem Messprotokoll und einem Injektionsprotokoll. Das Messprotokoll diente der örtlich aufgelösten Messung eines  $3,2\text{mm}^2$  großen Bereichs in der Mitte des Wells mit  $5 \times 5$  Messpunkten (Abb.38). Das Injektionsprotokoll diente der Zugabe von  $50\mu\text{l}$  Agonist-Lösung bzw. Puffer. Zur Messung der Basislinie wurde das Messprotokoll viermal nacheinander durchgeführt. Dann erfolgte die Stimulierung des Ionenkanals über die Zugabe des Agonisten bzw. Puffers mit Hilfe des Injektionsprotokolls. Anschließend wurde das Messprotokoll weitere achtmal durchgeführt. Daraus ergab sich für die Messung eine zeitliche Auflösung von 35s zwischen den einzelnen Messpunkten. Anschließend wurde die Platte entnommen und die nächsten zwei Reihen für die unmittelbare Messung vorbereitet.

### 2.5.6 Analyse der in 2.5.5 erhaltenen Daten

Die Rohdaten der Fluoreszenzmesswerte einer Platte wurden aus der Analysesoftware MARS (BMG Labtech) in Microsoft Excel exportiert. Für jedes gemessene Well wurden 25 Messpunkte pro Messzeitpunkt ausgegeben. Die neun höchsten gemessenen Fluoreszenzintensitäten innerhalb eines Wells wurden gemittelt und als Fluoreszenzintensität für das gemessene Sphäroid pro Messzeitpunkt definiert. Da durch die Messung der 5x5 Matrix des Wells auch Bereiche außerhalb des Sphäroids gemessen wurden, wurden die vier niedrigsten Fluoreszenzintensitäten innerhalb des Wells als Hintergrundsignal gemittelt und von der Sphäroid-Fluoreszenzintensität abgezogen. Dann wurden die gemittelten und hintergrundkorrigierten Fluoreszenzintensitäten mit der Formel  $(F-F_0)/F_0$  normalisiert, wobei F die Fluoreszenzintensität zum Messzeitpunkt und  $F_0$  der Mittelwert der Messwerte der Basislinie ist. Zur Erstellung von Dosis-Wirkungskurven wurde pro zugegebener Agonist- bzw. Antagonist-Konzentration der Mittelwert der 3 höchsten Intensitäten nach der Agonist-Zugabe berechnet  $((F-F_0/F_0)_{max})$ . Diese relativen Fluoreszenzintensitäten wurden gegen die Agonist- bzw. Antagonist-Konzentration aufgetragen. Die  $EC_{50}$ - und  $IC_{50}$ -Werte wurden mit dem Programm Graph Pad Prism 6 mit einer nonlinearen Regressionsanalyse wie in 2.5.4 beschrieben berechnet.

### 2.5.7 Bestimmung des Z'- Faktors

Um die Qualität der entwickelten Calcium-Assays im MTP-Format zu überprüfen, wurden sowohl für den Monolayer- als auch für den Sphäroid-Assay ein Z'-Faktor nach Zhang (Zhang *et al.*, 1999) ermittelt. Der Z'-Faktor beschreibt, wie signifikant die Positiv- und Negativ-Kontrollwerte voneinander getrennt sind. Dazu wurden CHO-<sup>I-hTRPV1</sup> wie in 2.5.3 und 2.5.5 beschrieben ausgesät und die Assays durchgeführt. Allerdings wurden nur 2 Konzentrationen des Agonisten Capsaicin zugegeben: 0µM als Negativkontrolle und 10µM als Positivkontrolle. Die Maxima der relativen Änderungen wurden als Mittelwerte mit Standardabweichungen berechnet und mit der folgenden Formel der Z'-Faktor ermittelt:

$$1 - \frac{3x(\sigma_p + \sigma_n)}{\mu_p - \mu_n}$$

$\sigma_p$ = Standardabweichung der Positivkontrolle

$\sigma_n$ = Standardabweichung der Negativkontrolle

$\mu_p$ = Mittelwert der Positivkontrolle

$\mu_n$ = Mittelwert der Negativkontrolle

**Tabelle 12: Interpretation berechneter Z'-Faktoren**

Z'-Faktor- Wert	Interpretation
1	ideal
$1 > Z' \geq 0,5$	exzellent
$0,5 > Z' \geq 0$	grenzwertig
$< 0$	unbrauchbar

## **2.6 Statistische Analyse**

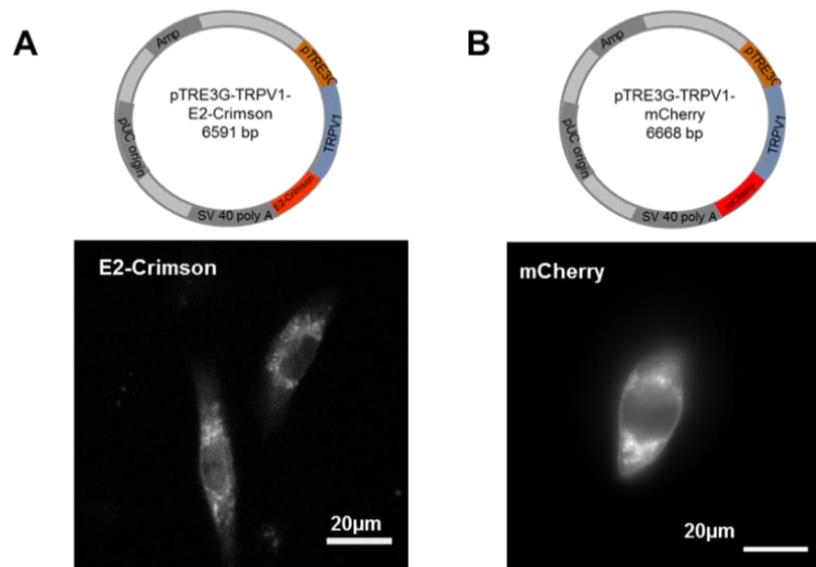
Um die Mittelwerte der  $EC_{50}$ - und  $IC_{50}$ -Werte, Hill-Koeffizienten und Effizienzen der im Monolayer- und Sphäroid-Modell gemessenen Dosiswirkungskurven auf signifikante Unterschiede hin zu untersuchen, wurde ein ungepaarter t-test mit dem Programm Graph Pad Prism 6 durchgeführt. Die zu vergleichenden Daten der Zellviabilität in Brustkrebslinien nach Stimulierung mit verschiedenen Konzentrationen Capsaicin wurden ebenfalls mit dem ungepaarten t-test auf Signifikanz untersucht. Ein P-Value  $< 0,05$  wurde als signifikant angesehen.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Tet-induzierbare Zelllinien mit Expression von humanem TRPV1

Zur gezielten Regulierung der rekombinanten, stabilen Expression des humanen, transmembranen TRPV1-Ionenkanals in Säugerzellen wurde das Tetrazyklin-induzierbare Genexpressionssystem Tet-On 3G eingesetzt (Clontech; Gossen & Bujard, 1992; Zhou *et al.*, 2006; Loew *et al.*, 2010; Gossen *et al.*, 1995). Im ersten Schritt wurden CHO-K1 Zellen stabil mit dem Expressionsplasmid pCMV-Tet3G transfiziert, die dadurch eine konstitutive Expression des Transaktivatorproteins Tet-On 3G zeigten (CHO-3G-Zelllinie). In einer zweiten Transfektion wurde der pTRE3G-Expressionsvektor mit dem Zielgen TRPV1 in die CHO-3G-Zellen eingebracht, dessen Expression Doxyzyklin-abhängig über das Transaktivatorprotein Tet-On 3G induziert wird. Um die TRPV1-Expression überprüfen als auch die subzelluläre Lokalisation der heterologen TRPV1-Ionenkanäle fluoreszenzmikroskopisch detektieren zu können, wurden Fusionsproteine aus TRPV1 mit C-terminal-fusioniertem mCherry- bzw. E2-Crimson-Fluoreszenzprotein hergestellt. Der Emissionsbereich von mCherry und E2-Crimson liegt spektral weit von dem Calcium-sensitiven Fluoreszenzindikator Fluo-8 entfernt, der für Funktionsanalysen der TRPV1-Ionenkanäle im Verlauf der Arbeit eingesetzt wurde. Dadurch ist eine parallele Analyse von TRPV1-Lokalisation/-Expression als auch TRPV1-vermitteltem Einstrom von Calcium-Ionen im entwickelten CHO-Zellmodell möglich.

Zunächst wurden die pTRE3G-Expressionsplasmide mit TRPV1-mCherry bzw. mit TRPV1-E2-Crimson (Abb.17A) transient in CHO-3G-Zellen transfiziert. Die transiente Transfektion der hTRPV1-Konstrukte diente als erste Kontrolle der Induzierbarkeit der Genexpression und der intrazellulären Lokalisation des Fusionsproteins. Nach Induktion der heterologen Genexpression durch Doxyzyklin zeigten transfizierte Zellen mCherry- bzw. E2-Crimson-Fluoreszenz (Em 610nm bzw. 646nm). Das hTRPV1-mCherry Fusionsprotein ist in der Plasmamembran sowie in intrazellulären Strukturen lokalisiert (Abb.17B). Das hTRPV1-E2-Crimson Fusionsprotein zeigte im Vergleich eine schwächere Fluoreszenzintensität und ist hauptsächlich in intrazellulären Strukturen lokalisiert (Abb.17A).



**Abbildung 17: Vergleich der Expression und Lokalisation der hTRPV1-Konstrukte.** 100.000 Zellen wurden pro 35mm Petrischale ausgesät und mit 750ng hTRPV1-E2-Crimson (A) und hTRPV1-mCherry (B) Plasmid-DNA transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen mit 500ng/ml Doxyzyklin induziert und nach weiteren 24h fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

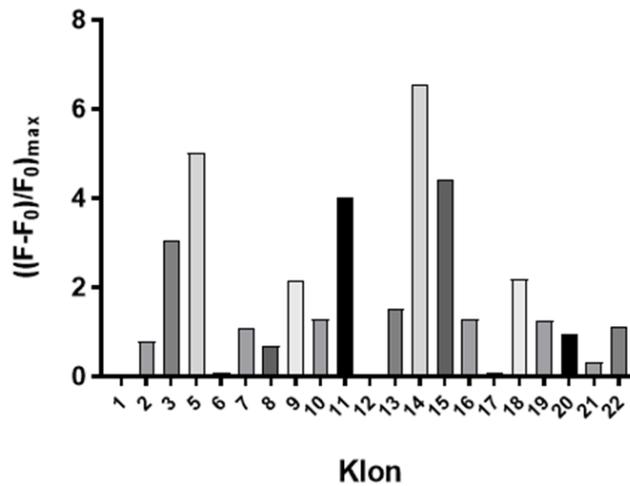
Zur nachfolgenden Herstellung stabiler, induzierbarer Zelllinien wurde das hTRPV1-mCherry-Plasmid eingesetzt, da die hTRPV1-mCherry Fusionsproteine eine höhere Fluoreszenzintensität zeigten und die intrazelluläre Lokalisation des Fusionsproteins der beschriebenen, endogenen entsprach (Gallego-Sandin *et al.*, 2009; Caterina *et al.*, 1997). Mit dem generierten Konstrukt pTRE3G-hTRPV1-mCherry wurden CHO-3G Zellen wie in 2.4.4 beschrieben stabil transfiziert und Einzelklone selektiert.

### 3.2 Zellklone mit optimal regulierter TRPV1 Expression

Eine optimal Tet-regulierte Expression eines Transgens bedeutet, dass ohne Induktion mit Doxyzyklin keine Basalexpression vorliegt und bei Induktion eine maximale Expression erfolgt.

Um diesbezüglich optimale Zellklone zu identifizieren, wurden CHO-3G-Zellen mit dem hTRPV1-mCherry-Konstrukt transfiziert und anschließend mit Hygromycin selektioniert. 24 Zellklone wurden nach Doxyzyklin-Induktion mikroskopisch hinsichtlich der mCherry-Fluoreszenzintensität untersucht. Von diesen zeigten 21 Klone eine mCherry-Fluoreszenz. Nachfolgend wurde die Funktion der rekombinant exprimierten hTRPV1-mCherry Ionenkanäle getestet. Dazu wurde nach Aktivierung

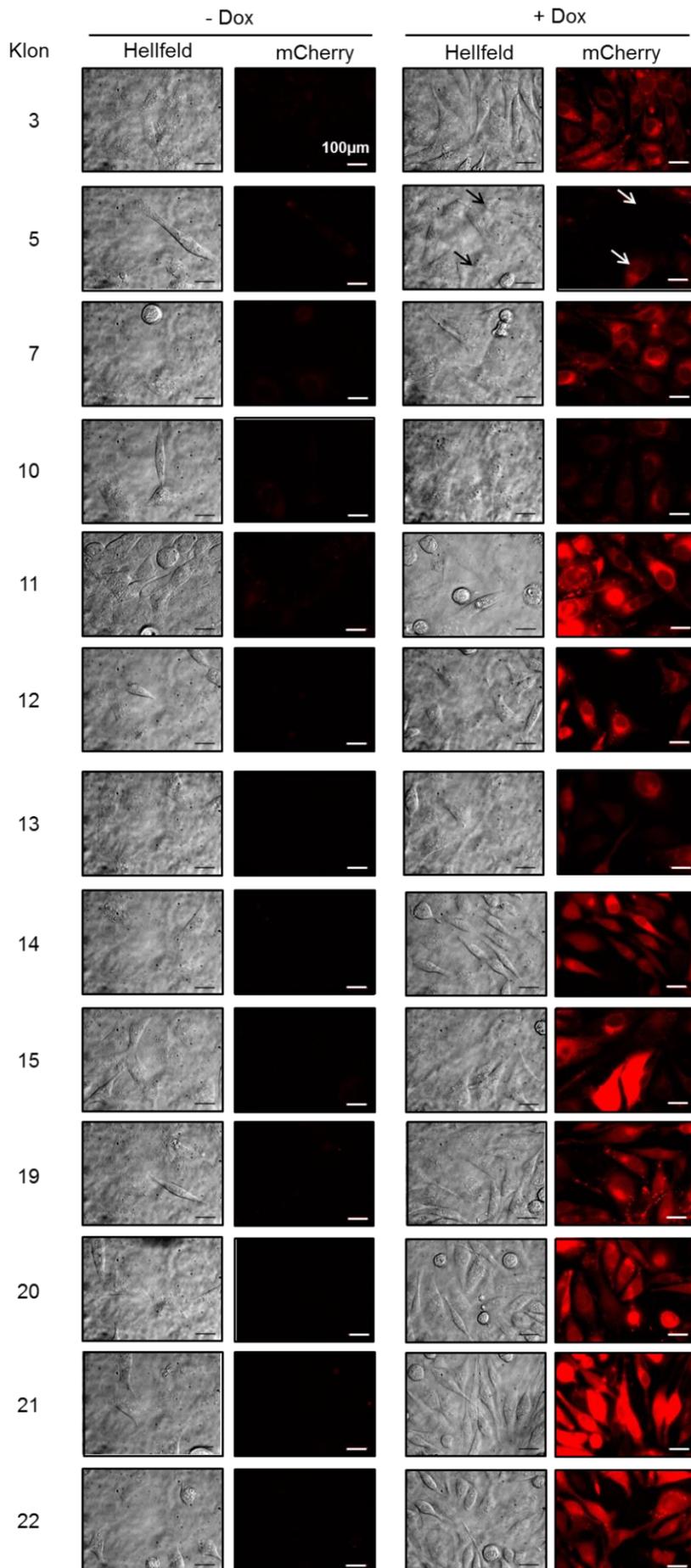
der Kanäle mit Capsaicin der TRPV1-vermittelte Calcium-Einstrom mittels Calcium Imaging gemessen (Abb.18).



**Abbildung 18: Maximale Änderung der Fluo-8-Fluoreszenzintensität nach spezifischer Aktivierung des hTRPV1 Ionenkanals der Klone mit Capsaicin.** 30.000 Zellen pro Klon wurden pro Well in eine 24-Well-Platte ausgesät und nach 24h mit 500ng/ml Doxyzyklin behandelt. Nach 24h wurden die Zellen mit 2 $\mu$ M Fluo-8<sup>®</sup> AM beladen und der Ca<sup>2+</sup>-Einstrom nach Zugabe von 2 $\mu$ M des TRPV1-spezifischen Agonisten Capsaicin fluoreszenzmikroskopisch detektiert.

Mit Ausnahme der Klone 1, 6, 12 und 17 reagierten alle Klone mit einer signifikanten Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration auf die spezifische TRPV1-Aktivierung durch Capsaicin-Zugabe. Einzelne Zellen der Klone 2, 8, 9 und 16 zeigten keine oder eine zeitlich verzögerte Reaktion. Ein Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration wurde in 79% der Zellen des Klon 2 detektiert, in 56% der Zellen von Klon 8 und in 80% der Zellen des Klons 9. 5% der Zellen des Klons 16 zeigten eine um 12s verzögerte Reaktion im Vergleich zu den anderen Zellen des Klons.

Dreizehn selektionierte Klone wurden anschließend auf Basalexpression (Leakiness) als auch auf Tet-Induzierbarkeit der hTRPV1-mCherry Expression getestet. Weiterhin wurde die Homogenität der hTRPV1-mCherry Expression in der Population der jeweiligen Zellklone untersucht. Dazu wurde die mCherry-Fluoreszenzintensität vor und nach Zugabe von Doxyzyklin mikroskopisch analysiert (Abb.19).



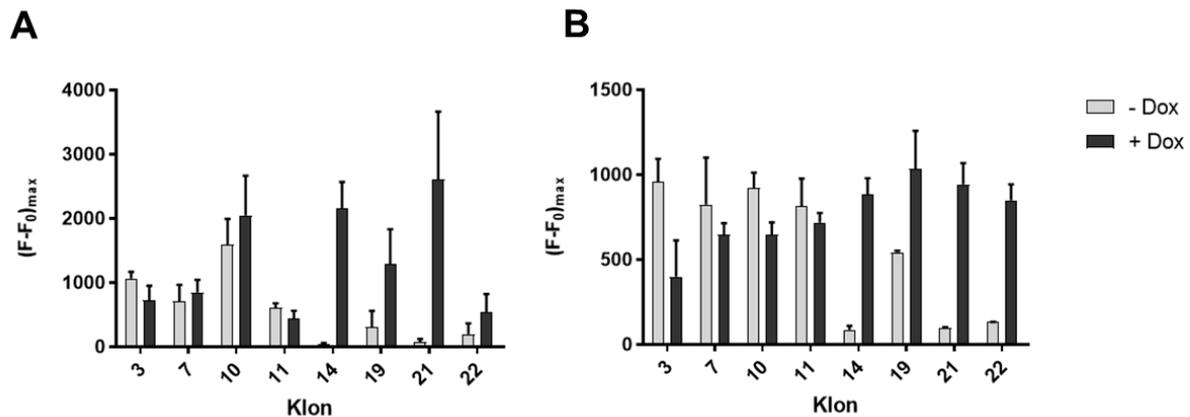
**Abbildung 19: mCherry-Fluoreszenzintensitäten der Klone vor und nach Zugabe von Doxzyklin.**

75.000 Zellen pro Klon wurden in 35mm Petrischalen ausgesät und nach 24h auf eine mCherry-Fluoreszenzintensität mikroskopisch untersucht (links). Die Zellen wurden anschließend mit 100ng/ml Doxzyclin induziert und nach 24h erneut die mCherry-Fluoreszenzintensität mikroskopisch analysiert (rechts).

Ohne Induktion durch Doxyzyklin zeigten die analysierten Zellklone keine mikroskopisch detektierbare Basalexpression von hTRPV1-mCherry (Abb.19 links). Die Regulierbarkeit der hTRPV1-mCherry-Expression konnte über die mikroskopische Analyse der mCherry-Fluoreszenz nach Zugabe von Doxyzyklin nachgewiesen werden (Abb.19 rechts). Die Zellklone zeigten unterschiedliche Expressionshöhen des hTRPV1-mCherry Fusionsproteins. Zum Beispiel wurde in Klon 21 eine 17-fach höhere Fluoreszenzintensität als in Klon 10 gemessen.

Allerdings war die Expressionshöhe in Einzelzellen einiger Zellklone unterschiedlich, beispielsweise konnte in Klon 5 nur in einem Drittel der Zellen überhaupt eine mCherry-Fluoreszenz detektiert werden (Abb.19, rechts, Pfeile). Im Gegensatz dazu zeigten Einzelzellen anderer Klone zwar eine mCherry-Fluoreszenz in allen Einzelzellen, aber mit deutlich unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten (z.B. Klon 15). Aufgrund der Heterogenität der detektierten Fluoreszenzintensitäten wurden die Klone 5, 12, 13, 15 und 19 verworfen.

Zur weiteren Identifizierung des optimalen Zellklons wurde im nächsten Schritt die Funktion der rekombinant exprimierten hTRPV1-mCherry-Ionenkanäle überprüft. Dazu wurden die Kanäle mit dem spezifischen Agonisten Capsaicin aktiviert und die dadurch resultierende Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mikroskopisch als auch im Mikroplattenreader gemessen (Abb.20). Diese Analysen wurden mit und ohne Induktion der Genexpression des hTRPV1-mCherry Fusionsproteins durchgeführt. Auf diese Weise wurden die Zellklone auch über die Funktion der hTRPV1-mCherry-Kanäle auf eine mögliche Basalexpression getestet, als auch die Klone identifiziert, die die höchste Änderung der intrazellulären Calcium-Konzentration zeigten.



**Abbildung 20: Maximale Änderung der Fluo-8-Fluoreszenzintensität nach Capsaicin Zugabe.** A) 75.000 Zellen wurden pro 35mm Petrischale ausgesät und nach 24h mit 0ng/ml Doxyzyklin (grau) oder 100ng/ml Doxyzyklin (schwarz) induziert. Nach 24h wurden die Zellen mit 2 $\mu$ M Fluo8 $\text{®}$ -AM beladen und die Fluoreszenzintensität nach Zugabe von 2 $\mu$ M Capsaicin fluoreszenzmikroskopisch detektiert. B) 40.000 Zellen wurden pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät und nach 24h Induktion mit 0ng/ml Doxyzyklin (grau) oder 100ng/ml Doxyzyklin (schwarz) induziert. Nach 24h wurden die Klone mit 5 $\mu$ M Fluo8 $\text{®}$ -AM beladen und die Fluoreszenzintensität nach Zugabe von 2 $\mu$ M Capsaicin mit dem Mikroplattenreader gemessen.

Alle induzierten Klone reagierten nach Zugabe von Capsaicin mit einem Anstieg der Fluo-8-Fluoreszenzintensität. Allerdings zeigten die Zellklone 3, 7, 10, 11 und 19 auch ohne Doxyzyklin-Induktion eine Erhöhung der Fluo-8-Fluoreszenzintensität und damit eine unerwünschte Basalexpression der hTRPV1-mCherry-Ionenkanäle. Die Fluoreszenzmessungen wurden mikroskopisch auf Einzelzellebene als auch im Mikrotiterplattenformat (> 40.000 Zellen/Well) im Plattenreader durchgeführt. Mit beiden Messmethoden wurden vergleichbare Ergebnisse zwischen nicht-induzierter und induzierter Expression der hTRPV1-mCherry-Ionenkanäle erzielt. Dagegen lieferten die beiden Methoden unterschiedliche maximale Änderungen der intrazellulären Calcium-Konzentration im direkten Vergleich einzelner Zellklone (Abb. 4; mikroskopisch: Klon 14 > Klon 19; Plattenreader: Klon 14 < Klon 19). Trotzdem erlauben beide Methoden die Identifizierung von Zellklonen mit bester Regulation der Genexpression als auch mit höchster Änderung der intrazellulären Calcium-Konzentration.

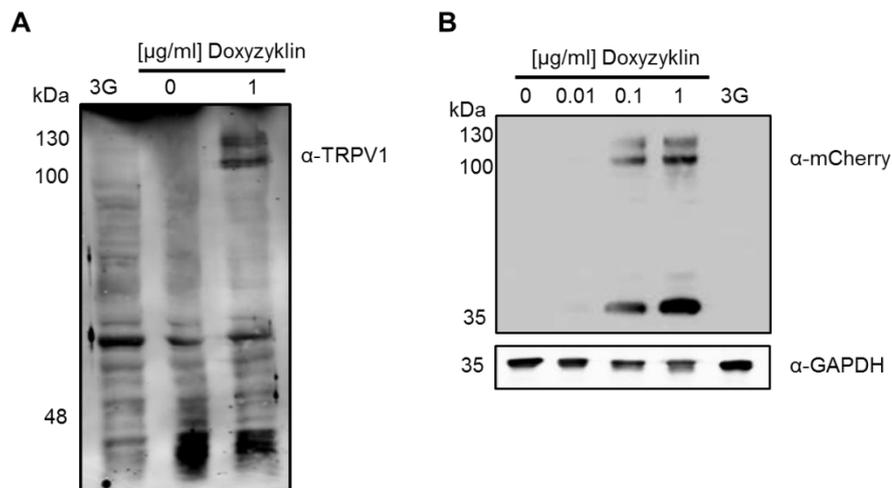
Anhand der durchgeführten Untersuchungen wurde Klon 14 als Zelllinie für die Entwicklung eines induzierbaren Zellmodells mit rekombinanter Expression von hTRPV1-mCherry-Ionenkanälen ausgewählt (nachfolgend CHO<sup>-I-hTRPV1</sup> genannt).

### **3.3 Charakterisierung der generierten CHO-<sup>I-hTRPV1</sup> Zelllinie**

Für die Entwicklung zellbasierter, industrietauglicher Wirkstoff-Screeningverfahren und Toxizitätsassays stellt die Auswahl des Zellmodells eine wichtige Grundlage dar. Dieses muss eingehend charakterisiert werden, um Anpassungen an standardisierte Zellkulturbedingungen und Analytik sowie Kompatibilität zu etablierten Mikrotiter-basierten Hochdurchsatztechnologien zu erreichen. Eine hohe Standardisierung des zellulären Assays ist somit unabdingbar, um korrekte quantitative und vergleichbare Daten generieren zu können. Die Charakterisierung der selektionierten CHO-<sup>I-hTRPV1</sup> -Zelllinie erfolgte hinsichtlich folgender Parameter: i) Qualitativer Nachweis der Expression des TRPV1-mCherry Fusionsproteins, ii) Überprüfung der intrazellulären Lokalisation, iii) Abhängigkeit der Genexpression von Induktionszeit und -konzentration, iv) Reaktion der CHO-<sup>I-hTRPV1</sup>-Zellen auf spezifische TRPV1-Agonisten und -Antagonisten, v) Wirkung Doxyzyklin-induzierter Expression und hTRPV1-Aktivierung auf die Viabilität der CHO-<sup>I-hTRPV1</sup> Zelllinie.

#### **3.3.1 Nachweis der Expression des Fusionsproteins mittels Western Blot**

Der Nachweis des hTRPV1-mCherry Fusionsproteins erfolgte mittels Western Blot und Immundetektion mit spezifischen Antikörpern gegen hTRPV1 bzw. gegen mCherry (Abb.22). Mit dem anti-hTRPV1- als auch dem anti-mCherry-Antikörper wurden ausschließlich bei Induktion durch Doxyzyklin (ab 0,1µg/ml) zwei Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von 122kDa bzw. 131kDa detektiert.



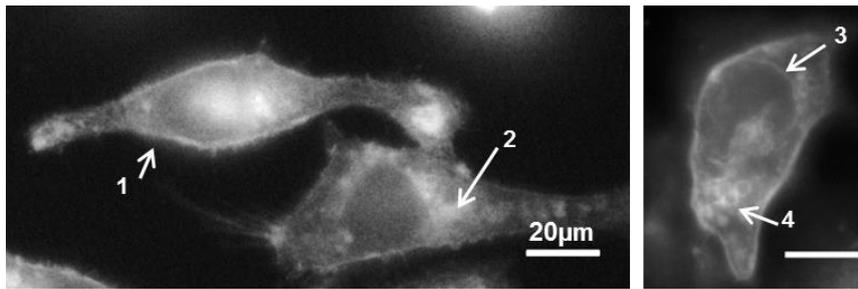
**Abbildung 22: Western Blot von CHO<sup>-hTRPV1</sup>- und CHO-3G-Zelllysaten.** CHO<sup>-hTRPV1</sup>-Zellen und CHO-3G-Parentalzellen wurden mit Doxycyclin-Konzentrationen von 0-1µg/ml induziert, 72h inkubiert und Zelllysate gewonnen. Je 50µg wurden pro Tasche einer SDS-PAGE aufgetragen und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. A) Kaninchen α-TRPV1. B) Ziege α-mCherry und Maus α-GAPDH.

In der Parentallinie CHO-3G wurde keine TRPV1- oder mCherry-Bande detektiert. Das Molekulargewicht des hTRPV1-mCherry Fusionsproteins, berechnet aus der Summe des Molekulargewichtes von hTRPV1 (95 kDa; Hayes *et al.*, 2000) und von mCherry (27kDa), beträgt 122kDa. Dies entspricht der unteren Bande. Die zweite Proteinbande von 131kDa stellt vermutlich eine glykosylierte Form des hTRPV1-mCherry Fusionsproteins in den CHO<sup>-hTRPV1</sup> Zellen dar (Veldhuis *et al.*, 2012).

Mit dem anti-mCherry-Antikörper wurde zusätzlich eine Bande von 36kDa detektiert. (Abb.22B). Die Aminosäuresequenz des Fusionsproteins wurde auf potenzielle Proteaseschnittstellen mit der Peptide-Cutter-Software (ExPASy.org) analysiert. Es konnte dabei keine Protease-Schnittstelle ermittelt werden, die zu einem C-terminalen, 36kDa großen Fragment des Fusionsproteins führen könnte.

### 3.3.2 Intrazelluläre Lokalisation des hTRPV1-mCherry-Proteins

Der endogene TRPV1-Ionenkanal ist in der Plasmamembran sowie in Endomembranen lokalisiert (Gallego-Sandin *et al.*, 2009; Cheng *et al.*, 2007). Die Lokalisation des rekombinanten hTRPV1-mCherry Fusionsproteins wurde fluoreszenzmikroskopisch in den CHO<sup>-hTRPV1</sup>-Zellen überprüft (Abb.23).



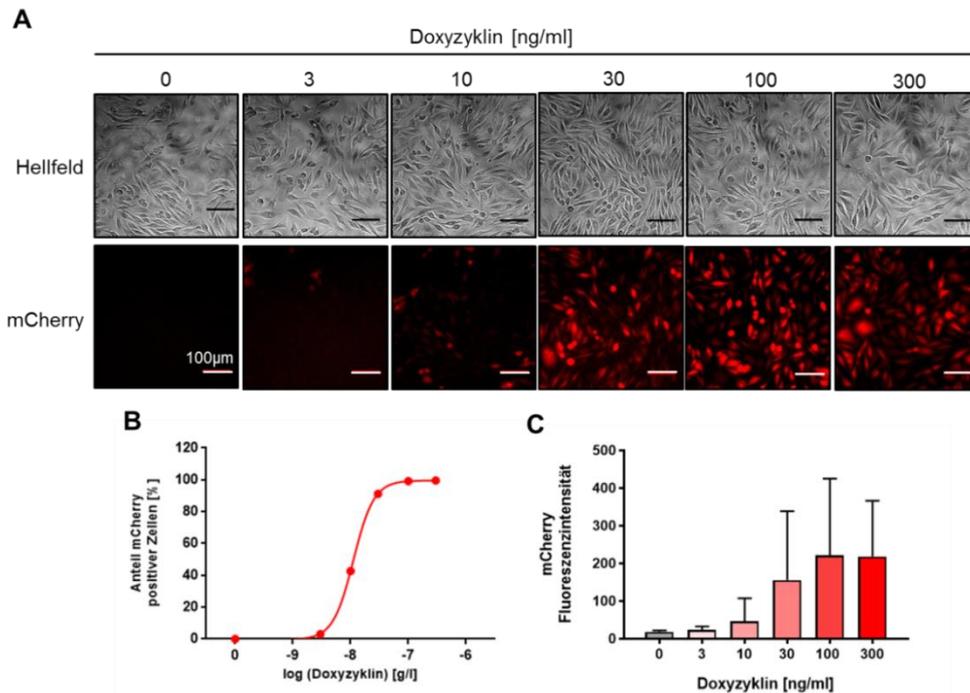
**Abbildung 23: Lokalisation des hTRPV1-mCherry-Fusionsproteins.** CHO-<sup>I-hTRPV1</sup>-Zellen wurden mit 100ng/ml Doxyzyklin induziert. Nach 24h wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. 1) Plasmamembran, 2) intrazelluläre Strukturen, 3) Kernhülle, 4) vesikuläre Strukturen

mCherry-Fluoreszenz wurde in der Plasmamembran (1), in intrazellulären Strukturen, vermutlich Endomembranen (2), in der Kernhülle (3) und in vesikulären Strukturen (4) detektiert. Dies entspricht der in der Literatur beschriebenen Lokalisation des endogenen TRPV1-Ionenkanals.

### 3.3.3 Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der induzierten hTRPV1-mCherry-Expression

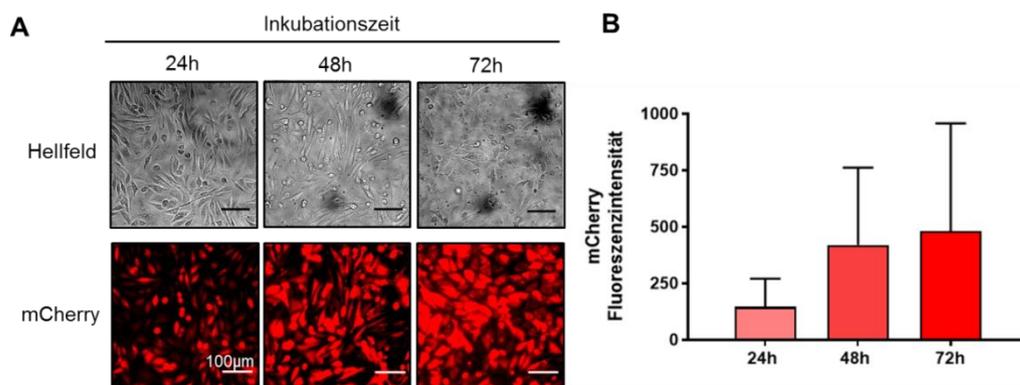
Zur Charakterisierung des entwickelten CHO-<sup>I-hTRPV1</sup>-Zellmodells wurde die Abhängigkeit der hTRPV1-mCherry-Expression von der Doxyzyklin-Konzentration (Abb.24) und der Induktionsdauer (Abb.25) analysiert.

Die Expression des Fusionsproteins ist von der Doxyzyklin-Konzentration abhängig. Ohne Zugabe von Doxyzyklin wurde keine mCherry-Fluoreszenz im Zellmodell detektiert, ab 3ng/ml zeigen circa 3% und ab 100ng/ml 100% der Zellen eine mCherry-Fluoreszenz. Die mittlere effektive Konzentration ( $EC_{50}$ ) des Doxyzyklins wurde mit den erhaltenen Messdaten berechnet und beträgt  $9,8 \pm 2$  ng/ml. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der Einzelzellen sind heterogen, was auf unterschiedlich hohe Expressionsraten schließen lässt. Die Expressionsraten könnten aufgrund unterschiedlicher Zellzyklusstadien variieren.



**Abbildung 24: Konzentrationsabhängigkeit der Doxyzyklin-induzierten hTRPV1-mCherry-Expression.** CHO-<sup>hTRPV1</sup>-Zellen wurden in einer 6-Well-Platte ausgesät. Nach 24h wurde den Zellen Medium mit unterschiedlichen Doxyzyklin-Konzentrationen zugegeben (0-300ng/ml). Nach 24h wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. A) Hellfeld, mCherry-Fluoreszenz. B) Anteil mCherry-positiver Zellen ( $EC_{50}$ :  $9,8 \pm 2$ ng/ml). C) mCherry-Fluoreszenzintensität der gemessenen Einzelzellen.

Im Folgenden wurde der Zeitverlauf der Doxyzyklin-induzierten Expression in der entwickelten Zelllinie fluoreszenzmikroskopisch analysiert (Abb.25).

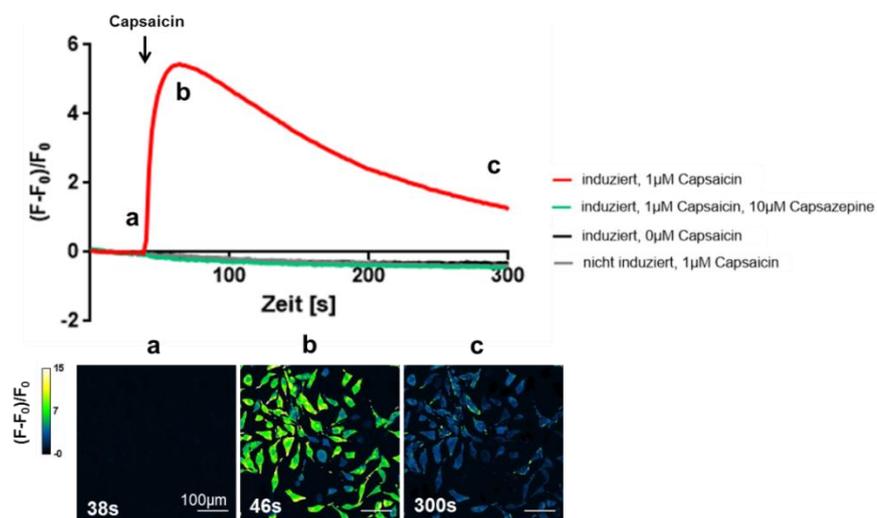


**Abbildung 25: Zeitabhängigkeit der Doxyzyklin-induzierten hTRPV1-mCherry Expression.** CHO-<sup>hTRPV1</sup>-Zellen wurden in einer 6-Well-Platte ausgesät. Nach 24h wurde den Zellen Medium mit einer Doxyzyklin-Konzentration von 100ng/ml zugegeben. Nach 24h, 48h und 72h wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. A) Hellfeld, mCherry-Fluoreszenz. B) mCherry-Fluoreszenzintensität der gemessenen Einzelzellen.

Die hTRPV1-mCherry-Expressionshöhe ist von der Induktionsdauer abhängig. Nach 48h wurde eine 2,8-fach höhere mCherry-Fluoreszenzintensität gemessen als nach 24h. Eine Induktionsdauer von 72h führte zu einer 3,3-fach höheren Intensität. Anhand der Analysen konnte gezeigt werden, dass die Expression des Transgens in dem entwickelten CHO<sup>-I-hTRPV1</sup>-Zellmodell sehr gut über die Doxyzyklin-Konzentration als auch über die Induktionsdauer reguliert werden kann.

### 3.3.4 Aktivierbarkeit und Inhibierbarkeit des TRPV1-mCherry-Ionenkanals

Zur pharmakologischen Charakterisierung des CHO<sup>-I-hTRPV1</sup>-Zellmodells wurde Capsaicin als TRPV1-Referenz-Agonist und Capsazepine als Antagonist exemplarisch untersucht (Abb.26). Dazu wurde der TRPV1-vermittelte Calcium-Einstrom mittels Calcium Imaging gemessen. Um eine mechanische Stimulation des TRPV1-Kanals auszuschließen, wurde eine Kontrollmessung ohne Zusatz des TRPV1-Aktivators Capsaicin durchgeführt. In dieser Kontrollmessung wurde keine Änderung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration detektiert.



**Abbildung 26: Validierung der Calcium-Antwort in der induzierten rekombinanten Zelllinie.** Es wurden 75.000 CHO<sup>-I-hTRPV1</sup>-Zellen pro 35mm Petrischale ausgesät und nach 24h mit 0ng/ml (graue Linie) oder 10ng/ml Doxyzyklin induziert. Nach 24h wurden die Zellen mit 2µM Fluo-8® AM beladen und die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration fluorezenzmikroskopisch vor und nach der Zugabe von 0µM (schwarze Linie) oder 1µM (rote Linie) Capsaicin gemessen. Zellen einer Petrischale wurden mit 10µM des TRPV1-Antagonisten Capsazepine vorbehandelt (grüne Linie). Die Mittelwerte der Fluo-8 Fluoreszenzintensitäten aller untersuchten Zellen wurden berechnet und grafisch dargestellt. Eine Bildsequenz zeigt die Fluo-8® AM beladenen Zellen vor (a), kurz nach (b) und 300s (c) nach Zugabe des Capsaicins.

Ein Anstieg der Fluo-8-Fluoreszenzintensität, die mit der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration korreliert, konnte in Doxyzyklin-induzierten Zellen nach Zugabe des Agonisten Capsaicin gemessen werden. Eine Zugabe des Agonisten zu nicht-induzierten Zellen änderte die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nicht. Dies unterstreicht die gute Regulierbarkeit des Tet-On 3G Expressionssystems in dem etablierten CHO-<sup>I-hTRPV1</sup>-Zellmodell.

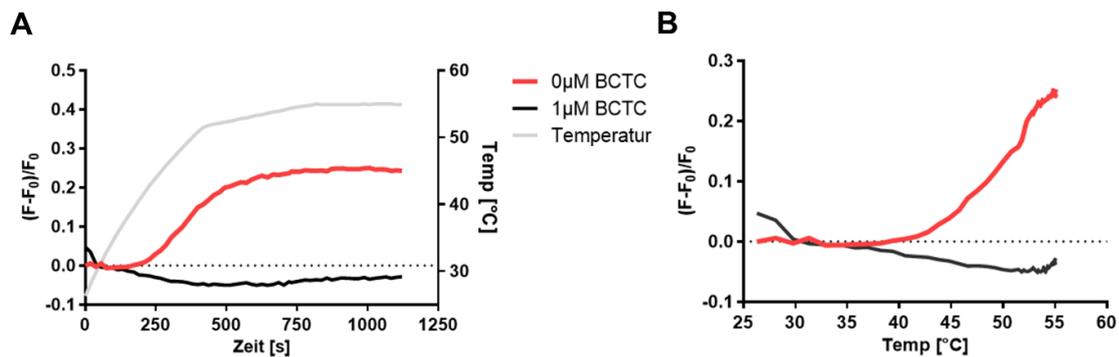
Bei Vorbehandlung der CHO-<sup>I-hTRPV1</sup>-Zellen mit Capsazepine wurde keine Erhöhung der Fluo-8-Fluoreszenzintensität gemessen. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf einer spezifischen Aktivierung der rekombinant exprimierten TRPV1-Kanäle beruht.

### 3.3.5 Hitzeaktivierung des hTRPV1-mCherry Ionenkanals

TRPV1-Ionenkanäle reagieren ab einer Temperatur von 43°C mit Öffnung ihrer Poren, die zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Ioneneinstrom führt. Zur Überprüfung der rekombinant exprimierten hTRPV1-mCherry-Ionenkanäle auf diese Eigenschaft wurden in An- und Abwesenheit eines spezifischen TRPV1-Antagonisten hTRPV1-exprimierende Zellen steigender Temperatur ausgesetzt (Abb.27). Als Antagonist wurde BCTC gewählt, da Capsazepine bei Hitzestimulus einen sehr hohen  $\text{IC}_{50}$ -Wert (3100nM) aufweist. Im Gegensatz dazu liegt der  $\text{IC}_{50}$ -Wert von BCTC mit 5,3nM bei Hitzeinduktion in einem wesentlich niedrigeren Bereich (Reubish *et al.*, 2009).

Ab einer Temperatur von 43°C wurde eine Erhöhung der Fluo-8 Fluoreszenzintensität in CHO-<sup>I-hTRPV1</sup>-Zellen detektiert. Nach einer Vorbehandlung der Zellen mit dem TRPV1-Antagonisten BCTC wurde keine Änderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration gemessen.

Hiermit konnte ein weiterer Nachweis erbracht werden, dass der rekombinant exprimierte TRPV1-Ionenkanal auch als Fusionsprotein mit mCherry bekannte physiologische Funktionen des endogenen TRPV1-Ionenkanals aufweist.

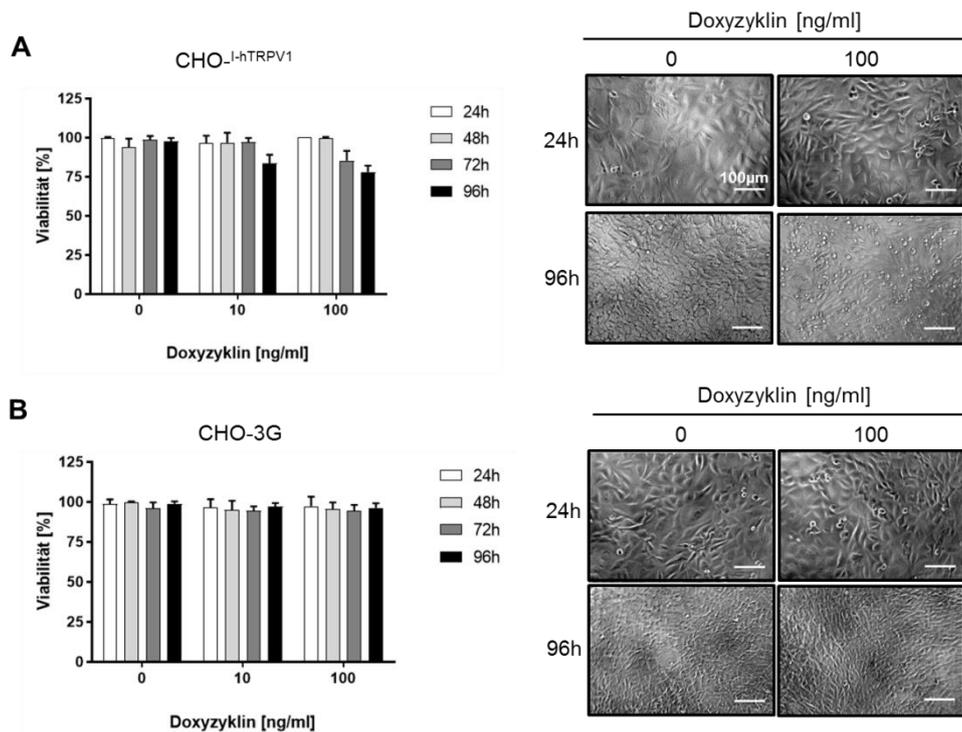


**Abbildung 27: Temperaturabhängige Aktivierung des induzierten hTRPV1-mCherry-Ionenkanals.** 40.000 Zellen wurden pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät und nach 24h mit 10ng/ml Doxyzyklin induziert. Nach 24h wurden die Zellen mit 2 $\mu$ M Fluo-8® AM beladen und eine Platte mit 1 $\mu$ M BCTC vorbehandelt. Während der Messung wurde die Temperatur kontinuierlich auf 55°C erhöht. A) Änderung der Fluo-8-Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit. B) Änderung der Fluo-8-Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Temperatur.

### 3.3.6 Einfluss der Expression und Aktivierung des hTRPV1-mCherry-Ionenkanals auf die Viabilität der CHO<sup>-I-hTRPV1</sup>-Zellen

Die gentechnische Veränderung der CHO-Zellen mit dem hTRPV1-mCherry-Konstrukt kann sich auf die Viabilität der CHO<sup>-I-hTRPV1</sup>-Zellen auswirken. In diesem Kontext wurden folgende Faktoren untersucht: i) die Überexpression des humanen TRPV1-Kanals, ii) die Inkubation mit dem chemischen Induktor Doxyzyklin und iii) die Aktivierung der rekombinant exprimierten TRPV1-Ionenkanäle.

Zunächst wurde die Viabilität der CHO<sup>-I-hTRPV1</sup>-Zelllinie in Abhängigkeit der Doxyzyklin-induzierten Expression analysiert. Die Viabilität wurde fluorimetrisch mit Propidiumiodid (PI) bestimmt. Zusätzlich wurde die Morphologie der Zellen mikroskopisch untersucht. Als Kontrolle wurden die Analysen in der CHO-3G-Parentallinie durchgeführt, die nur das Transaktivatorprotein Tet-On 3G, aber kein Zielgen (TRPV1-mCherry) exprimieren (Abb. 28).



**Abbildung 28: Viabilität der CHO-I-hTRPV1-Zellen und der CHO-3G-Parentalzellen nach Doxyzyklin-Induktion.** Es wurden 40.000 Zellen pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät. Nach 24h erfolgte die Induktion mit Doxyzyklin (0-100ng/ml). Nach 24h, 48h, 72h und 96h wurde ein fluorimetrischer Vitalitätstest mit Propidiumiodid durchgeführt und die Zellen mikroskopisch untersucht.

Die Doxyzyklin-induzierte Expression des rekombinanten Fusionsproteins beeinflusst die Viabilität der entwickelten Zelllinie (Abb.28A). Nach einer Induktionsdauer von 96h mit 10ng/ml Doxyzyklin sinkt der Anteil lebender CHO-I-hTRPV1-Zellen auf 83,4%. Bei einer Konzentration von 100ng/ml Doxyzyklin wurde nach 72h eine Viabilität von 85,4% und nach 96h von 77,9% detektiert. In Abwesenheit von Doxyzyklin wurde keine signifikante Änderung in der Viabilität gemessen. Die Analyse der Parentallinie CHO-3G zeigte nach Induktion mit Doxyzyklin keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen (Abb.28B).

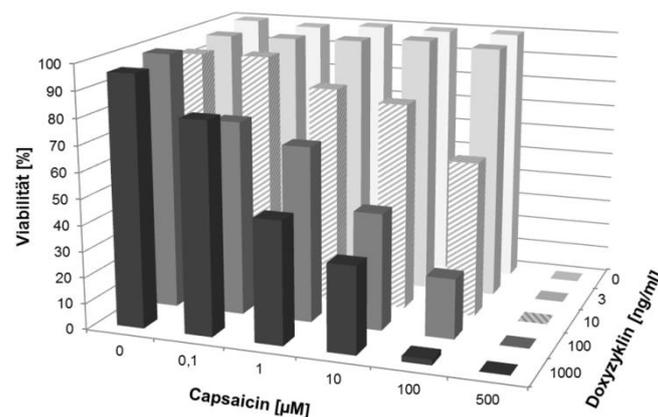
Zusammenfassend wurde ein geringer Einfluss der rekombinanten Expression auf die Viabilität festgestellt, jedoch kein Einfluss durch Behandlung der Zellen mit Doxyzyklin beobachtet.

In Übereinstimmung mit den fluorimetrisch erfassten Daten wurden auch Änderungen in der Zellmorphologie abhängig von der Doxyzyklin-induzierten Genexpression mikroskopisch detektiert. 80% der mit 100ng/ml Doxyzyklin-behandelten CHO-I-hTRPV1-Zellen zeigten nach einer Induktionsdauer von 96h eine

flache, Epithel-ähnliche Morphologie. Bei 20% wurde ein Verlust der ursprünglichen Zellmorphologie beobachtet.

Die Capsaicin-vermittelte Aktivierung des TRPV1-Ionenkanals wurde in einem in der Literatur beschriebenen, rekombinanten Expressionssystem mit Zelltod assoziiert. HEK293-Zellen, die transient den Ratten-TRPV1-Kanal exprimierten, zeigten bei einer Behandlung mit 3 $\mu$ M Capsaicin eine nekrotische Morphologie und eine um 50-75% verminderte Viabilität. Im Gegensatz dazu blieb die Vitalität und Morphologie mit einem Kontrollplasmid transfizierter HEK293-Zellen unverändert (Caterina *et al.*, 1997).

Der Einfluss der Aktivierung der Ionenkanäle auf die Viabilität der CHO-<sup>I-hTRPV1</sup>-Zellen wurde durch Zugabe des Agonisten Capsaicin (0–500 $\mu$ M) untersucht. Dabei wurden unterschiedliche Doxyzyklin-Konzentrationen (0–1000ng/ml) zur Induktion der Ionenkanal-Expression eingesetzt (Abb.29).



**Abbildung 29: Einfluss der Überexpression und hTRPV1-Aktivierung auf die Viabilität der rekombinanten Zelllinie.** Es wurden 40.000 Zellen pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät. Nach 24h erfolgte die Induktion mit Doxyzyklin (0-1000ng/ml). Nach weiteren 24h wurden die Zellen mit Capsaicin (0-500 $\mu$ M) behandelt, und 24h später wurde ein Propidiumiodid-Viabilitätstest durchgeführt.

Mit steigender Capsaicin-Konzentration ab 0,1 $\mu$ M Capsaicin als auch steigender Doxyzyklin-Konzentration ab 10ng/ml Doxyzyklin nahm die Zellviabilität ab. Bei einer Capsaicin-Konzentration von 500 $\mu$ M konnten sowohl in den Doxyzyklin-induzierten als auch in den nicht-induzierten CHO-<sup>I-hTRPV1</sup>-Zellen keine viablen Zellen mehr detektiert werden.

Zusammenfassend ist hiermit eine TRPV1-vermittelte Toxizität bei Behandlung der CHO-<sup>I-hTRPV1</sup>-Zellen mit Capsaicin in einem Zeitraum von 24h nachweisbar. Allerdings

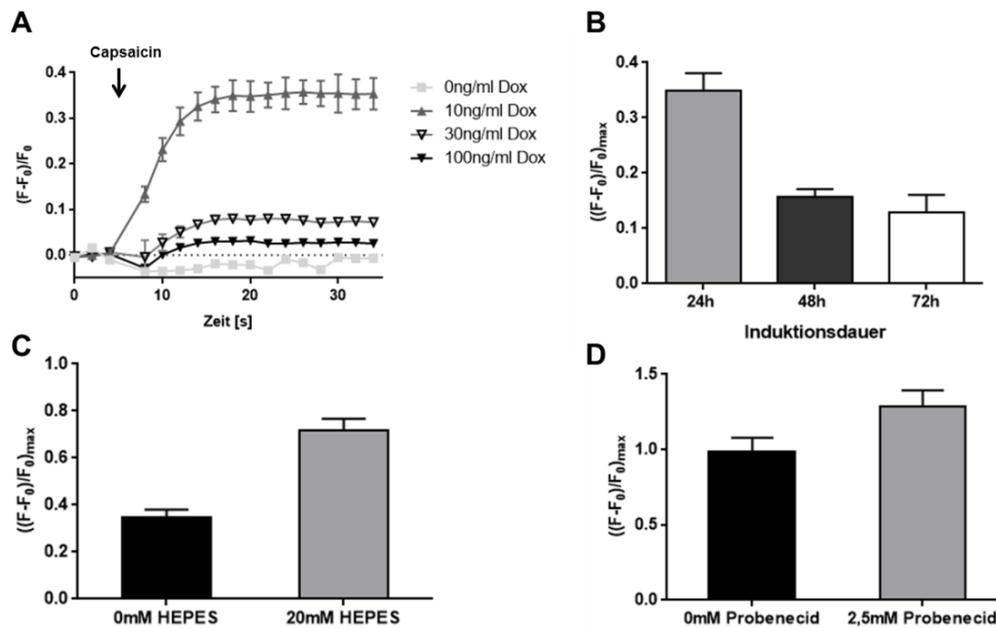
liegt die Inkubationszeit der Zellen mit Capsaicin für die Aktivierung der TRPV1 Ionenkanäle als auch die Messung der resultierenden Fluo-8-Fluoreszenzintensität im Minutenbereich, so dass in diesem Messintervall keine signifikante Beeinflussung der Zellviabilität zu erwarten ist.

### **3.4 Fluorimetrischer zellulärer Calcium-Assay für pharmakologische Analysen des TRPV1-Ionenkanals**

Die Messung der intrazellulären Calcium-Konzentration wird in vielen pharmakologischen Mittel- bis Hochdurchsatz-Screeningverfahren zur Identifizierung von Wirkstoffen für Ionenkanäle eingesetzt. Zellbasierte Calcium-Assays eignen sich für die nicht-invasive Messung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und weisen minimale Wechselwirkungen mit den zellulären Vorgängen auf.

#### **3.4.1 Mikrotiterplatten-basierte Calcium-Assays zur Analyse selektiver TRPV1-Agonisten und -Antagonisten**

Fluoreszenzmikroskopische Messungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen sind sehr sensitiv und ermöglichen eine hohe zeitliche und räumliche Auflösung des Calciumsignals. Im Vergleich dazu sind Plattenreader-basierte Messungen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms schneller und kosteneffektiver. Nachteilig ist die geringere Sensitivität der Fluoreszenzdetektion des Plattenreaders (Heusinkveld & Westerink, 2011). Zur Validierung des CHO-<sup>I-hTRPV1</sup>-Zellmodells wurde ein Calcium-Assay im 96-Well-MTP(Mikrotiterplatten)-Format entwickelt, mit dem Dosis-Wirkungs-Beziehungen von TRPV1-Agonisten und -Antagonisten analysiert werden können. Im Plattenreader bestehen unterschiedliche Anforderungen bei der Messung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in MTPs als bei mikroskopischer Messung. Daher waren eine Anpassung folgender Parameter essentiell, um ein optimales Signal-Rausch-Verhältnis im zellulären Assay zu erreichen: (i) Doxyzyklin-Konzentration für die Induktion, (ii) Induktionsdauer, (iii) Stabilisierung des extrazellulären pH-Wertes, (iv) Stabilisierung der Fluo-8-Konzentration während der Messung (Abb.30).



**Abbildung 30: Einfluss der verwendeten Doxyzyklin-Konzentration, Induktionsdauer, der Pufferung des extrazellulären pH-Werts mit HEPES und Stabilisierung der Fluo-8-Konzentration durch Probenecid auf die Calcium-Messung.** 40.000 CHO-<sup>I-hTRPV1</sup>-Zellen wurden pro Well einer 96-Well-Mikrotiter-Platte ausgesät und nach 24h mit 10ng/ml Doxyzyklin (B; C; D) bzw. 0-100ng/ml Doxyzyklin (A) behandelt. Nach weiteren 24h (A; C; D) bzw. 48h und 72h (B) wurden die Zellen mit 2 $\mu$ M Fluo-8<sup>AM</sup> beladen und die Fluoreszenzintensität vor und nach Zugabe von 1 $\mu$ M Capsaicin mit einem Plattenreader gemessen. A) Einfluss der verwendeten Doxyzyklin-Konzentration. B) Einfluss der Induktionsdauer. C) Einfluss der Pufferung des extrazellulären pH-Werts mit HEPES (pH 7.4). D) Einfluss des Zusatzes von Probenecid zur Stabilisierung der Fluo-8-Konzentration während der Messung.

Die eingesetzte Doxyzyklin-Konzentration beeinflusste im MTP-Format die Höhe der Änderung der Fluo-8-Fluoreszenzintensität nach TRPV1-Aktivierung. In CHO-<sup>I-hTRPV1</sup>-Zellen, in denen die hTRPV1-mCherry Genexpression mit 10ng/ml Doxyzyklin induziert wurde, wurde nach Aktivierung des Ionenkanals mit Capsaicin die höchste Änderung der Fluoreszenzintensität (0,35-fach) detektiert. In Zellen, die mit 30ng/ml und 100ng/ml Doxyzyklin behandelt wurden, war sie deutlich niedriger (0,08 bzw. 0,03) (Abb.30A).

Die Induktionsdauer beeinflusste die Fluo-8-Intensität nach Aktivierung des Ionenkanals ebenfalls (Abb.30B). In CHO-<sup>I-hTRPV1</sup>-Zellen, die 24h mit Doxyzyklin behandelt wurden, wurde eine doppelt so hohe Änderung der Fluo-8-Intensität nach TRPV1-Aktivierung gemessen als in Zellen, die 48h und 72h induziert wurden.

Der extrazelluläre pH-Wert kann auf verschiedenen Ebenen die Messergebnisse des Calcium-Assays beeinflussen, da Protonen endogene Aktivatoren von TRPV1 sind.

Die Temperaturschwelle zur Aktivierung des TRPV1-Ionenkanals wird durch eine Änderung des extrazellulären pH-Werts herabgesetzt, da der TRPV1-Kanal bei milder Ansäuerung des Mediums (bereits bei  $\text{pH} < 5,9$ ) sensitiver wird. Diese Aktivierung bewirkt eine nachfolgende Desensibilisierung der Kanäle. Im Calcium-Assay würde dies die Signalhöhe der gemessenen Fluo-8-Fluoreszenz erniedrigen, da weniger aktivierbare TRPV1-Kanäle bei der Messung zur Verfügung stehen würden.

Der extrazelluläre pH-Wert übt einen Einfluss auf den intrazellulären pH-Wert und damit auch auf das Fluo-8-Signal aus, da die Fluoreszenzintensität Fluoreszeinverwandter Farbstoffe, wie Fluo-8® AM, stark vom (intrazellulären) pH-Wert abhängig ist (Haugland, 2002; Rohrbach *et al.*, 2005; Caterina *et al.*, 1999). Daher wurde durch die Kultivierung der CHO<sup>-I-hTRPV1</sup>-Zellen in Anwesenheit des Puffers HEPES der extrazelluläre pH-Wert konstant gehalten. In diesen Zellen wurde eine 0,72-fache Änderung der Fluo-8-Intensität nach Aktivierung des Ionenkanals gemessen. In Zellen, die ohne Zusatz des HEPES kultiviert wurden, wurde eine niedrigere Änderung der Fluo-8-Intensität (0,35-fach) detektiert (Abb.30C).

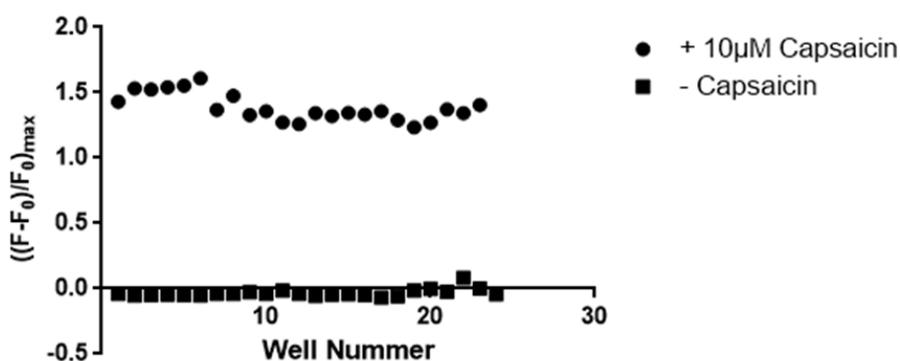
CHO-Zellen besitzen Anionentransporter, die negativ-geladene Moleküle und damit auch Calcium-Farbstoffe, wie Fluo-8, aus den Zellen ausschleusen (Di Virgilio *et al.*, 1989). Dies kann zu einem Verlust des Fluo-8 während der Messung führen. Durch die Zugabe von 2,5mM Probenecid, einem Anionentransporterblocker, konnte nach Aktivierung des Ionenkanals eine 1,3-fache Erhöhung der Fluo-8-Intensität detektiert werden (Abb.30D). Zusammenfassend konnte durch die Optimierung der beschriebenen Parameter eine Maximierung des Fluo-8 Signals erreicht werden.

Auf Grundlage der oben durchgeführten Optimierungen des Calcium-Assays im MTP-Format wurde ein standardisiertes Assay-Protokoll definiert: (i) Induktion mit 10ng/ml Doxyzyklin, (ii) Induktionsdauer 24h, (iii) Kultivierung und Messung der Zellen in Anwesenheit von 20mM HEPES und (iv) Zusatz von 2,5mM des Hemmstoffes Probenecid während der Messung.

### 3.4.2 Qualität des entwickelten Calcium-Assays

Die Qualität eines Assays lässt sich mit Hilfe verschiedener statistischer Parameter beurteilen. Diese können auch angewendet werden, um die Qualität von Daten zu bewerten. Der Z'-Faktor wird häufig für die Evaluierung von Assays eingesetzt, da er eine Aussage über die Leistungsfähigkeit bzw. Qualität des Testsystems ermöglicht. Der Z'-Faktor ist eine statistische, dimensionslose, Kennzahl, die ein Maß für die Reproduzierbarkeit und Robustheit eines Assays ist (Zhang *et al.*, 1999). Der Z'-Faktor berücksichtigt die Schwankungen der erhaltenen Messdaten (Standardabweichungen) und die Größe des Messfensters (dynamischer Bereich) zwischen den Mittelwerten gemessener Positiv- und Negativkontrollen. Für prinzipiell auswertbare Assays nimmt dieser einen Wert zwischen 0 und 1 an. Werte zwischen 0,5 und 1 bedeuten, dass ein robuster Assay mit zuverlässigen Daten vorliegt, wobei  $Z' = 1$  für den idealen Assay steht. Bei negativen Werten liegt ein nicht-auswertbarer Assay vor.

Der Z'-Faktor wurde für den entwickelten Calcium-Assay im CHO-<sup>I-hTRPV1</sup>-Zellmodell aus den Mittelwerten und Standardabweichungen gemessener Fluo-8 Fluoreszenzintensitäten von Positiv (10 $\mu$ M Capsaicin)- und Negativ (0 $\mu$ M)-Kontrollen bestimmt (Abb.31).



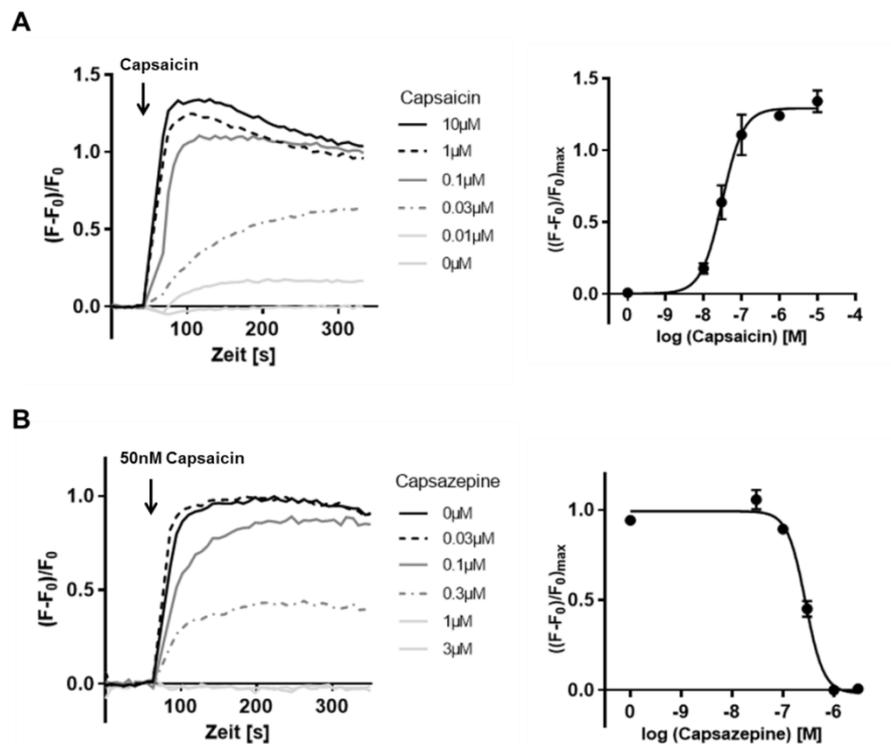
**Abbildung 31: Bestimmung des Z'-Faktors.** Es wurden 40.000 Zellen pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät und nach 24h mit 10ng/ml Doxyzyklin induziert. Nach weiteren 24h wurde die Änderung der Fluo-8-Intensität nach Zugabe von 0 $\mu$ M und 10 $\mu$ M Capsaicin gemessen. Der berechnete Z'-Faktor betrug in diesem Experiment 0,71. Das Streudiagramm ist repräsentativ für n=6 Experimente.

In sechs unabhängigen Experimenten wurde ein Z'-Faktor von  $0,66 \pm 0,09$  ermittelt. Dies belegt die erfolgreichen Optimierungen als auch die resultierende sehr gute Qualität des entwickelten, fluorimetrischen Calcium-Assays im MTP-Format. Auf

dieser Grundlage konnte der Calcium-Assay in Verbindung mit dem entwickelten CHO-<sup>I-hTRPV1</sup>-Zellmodell als sensitives und aussagekräftiges Testsystem für die pharmakologische Analyse von TRPV1-spezifischen Agonisten und Antagonisten eingesetzt werden.

### **3.5 Pharmakologische Analyse von TRPV1-Agonisten und -Antagonisten**

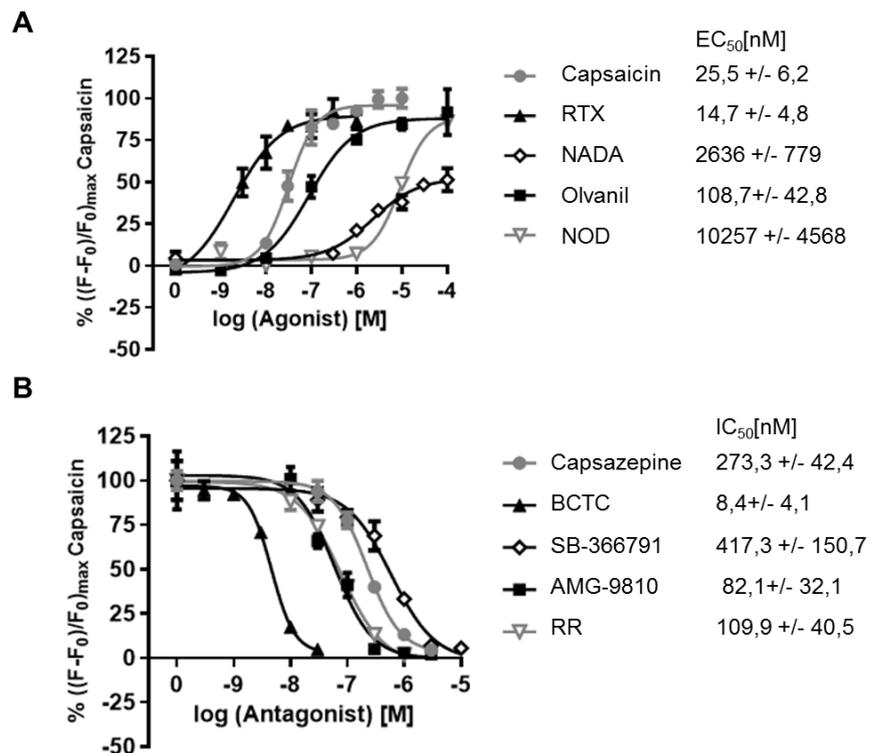
Die Potenz ( $EC_{50}$ - bzw.  $IC_{50}$ -Werte) und die Effizienz (Maximalwirkung) von bekannten TRPV1-Agonisten und -Antagonisten wurden bestimmt, um den heterologen TRPV1-mCherry-Ionenkanal pharmakologisch zu charakterisieren. Dazu wurden Dosis-Wirkungs-Kurven mit dem entwickelten CHO-<sup>I-hTRPV1</sup>-Calcium-Assay erstellt. Das Prinzip des Assays beruht auf der Messung der maximalen Änderung des Fluo-8-Signals, welches mit der Änderung der intrazellulären Calcium-Konzentration korreliert, nach Aktivierung des TRPV1-Ionenkanals. Dabei ist die maximale Änderung von der zugegebenen Agonisten-Konzentration abhängig (Abb. 32A). Im ersten Schritt wurde Capsaicin als TRPV1-Referenz-Agonist eingesetzt. Bei Zugabe von 10nM Capsaicin konnte eine Änderung der Fluo-8-Intensität um das 0,17-fache detektiert werden. Die Aktivierung des TRPV1-Ionenkanals mit der maximalen Konzentration von 10 $\mu$ M Capsaicin führte zu einer 1,34-fachen Änderung der Fluo-8-Intensität, die 62s nach Zugabe gemessen wurde. Nach Aktivierung mit submaximalen Capsaicin-Konzentrationen wie bspw. 30nM wurde die maximale Änderung der Fluo-8-Intensität erst nach 300s detektiert. Mit den gemessenen höchsten Änderungen der Fluo-8-Intensität nach Capsaicin-Zugabe in den Einzelmessungen kann eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt und die  $EC_{50}$  abgeleitet werden ( $EC_{50}$ : 25,5  $\pm$  6,2 nM) (Abb.32 A, rechts).



**Abbildung 32: Dosis-Wirkungs-Beziehungen von Capsaicin und Capsazepine in CHO<sup>I-hTRPV1</sup>-Zellen.** 40.000 Zellen wurden pro Well in eine 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät und nach 24h mit 10ng/ml Doxyzyklin induziert. A) Nach 24h wurde die Fluo-8-Intensität vor und nach Zugabe von Capsaicin (0-10 $\mu\text{M}$ ) gemessen. Links: Einzelmessungen der Konzentrationen. Rechts: Resultierende Dosis-Wirkungs-Kurve. B) Nach 24h wurden die Zellen mit Capsazepine (0-3 $\mu\text{M}$ ) vorbehandelt und die Fluo-8-Intensität vor und nach Zugabe von 50nM Capsaicin gemessen. Links: Einzelmessungen der Konzentrationen. Rechts: Resultierende Dosis-Wirkungs-Kurve. Die Kurven sind repräsentativ aus n=3-5 Experimenten.

Für die Analyse der Dosis-Wirkungs-Beziehung eines Antagonisten wurde Capsazepine als Referenz exemplarisch in den CHO<sup>I-hTRPV1</sup>-Zellen untersucht. Die Fluoreszenzintensitätsänderung, ausgelöst durch Capsaicin (50nM), wurde durch steigende Capsazepine Konzentrationen inhibiert ( $\text{IC}_{50}$ :  $273 \pm 42\text{nM}$ ) (Abb.32 B). In Zellen, die mit 30nM Capsazepine behandelt wurden, wurde eine Änderung der Fluo-8-Intensität um das 1,05-fache detektiert. Die Zugabe von 1 $\mu\text{M}$  Capsazepine inhibierte die Capsaicin-induzierte Calcium-Reaktion vollständig. Die ermittelten  $\text{EC}_{50}$  und  $\text{IC}_{50}$ -Werte für Capsaicin bzw. Capsazepine stimmten sehr gut mit in der Literatur beschriebenen Werten überein (Gavva *et al.*, 2004; Witte *et al.*, 2002).

In Folge wurden für eine umfassendere Analyse des heterologen hTRPV1-mCherry Ionenkanals im CHO-Zellmodell Dosis-Wirkungs-Beziehungen von vier weiteren Agonisten (RTX, NADA, Olvanil, NOD) und vier Antagonisten (BCTC, SB-366791, AMG-9810, RR) erstellt (Abb.33).



**Abbildung 33: Dosis-Wirkungs-Kurven der getesteten Agonisten und Antagonisten.** 40.000 Zellen wurden pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät und nach 24h mit 10ng/ml Doxzyklin induziert. A) Nach weiteren 24h wurde die Fluo-8-Fluoreszenzintensität vor und nach Agonist-Zugabe gemessen. TRPV1-Agonisten: Capsaicin, RTX, NADA, Olvanil, NOD. B) Nach weiteren 24h wurden die Zellen mit den Antagonisten vorbehandelt und die Fluo-8-Intensität vor und nach Zugabe von 50nM Capsaicin gemessen. TRPV1-Antagonisten: Capsazepine, BCTC, SB-366791, AMG-9810, RR. Die Kurven sind repräsentativ aus n=3-5 Experimenten und auf die maximale Capsaicin-Reaktion normiert.

Die Aktivierung des rekombinanten hTRPV1-mCherry-Ionenkanals mit den eingesetzten Agonisten führte zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der gemessenen Fluo-8-Intensitäten in den induzierten CHO<sup>-I-hTRPV1</sup>-Zellen. Basierend auf den ermittelten EC<sub>50</sub>-Werten konnten Wirksamkeitsreihenfolgen für die insgesamt fünf Agonisten erstellt werden: RTX > Capsaicin > Olvanil > NADA > NOD. Die ermittelten Hill-Koeffizienten, die ein Maß für die Kooperativität der Liganden und des Ionenkanals darstellen, sind in Tabelle 14 aufgeführt. Für Capsaicin, RTX und NOD wurden Koeffizienten >1 berechnet und für Olvanil und NADA <1. Die Maximalwirkung (Efficacy) der Agonisten wurde relativ zum Agonisten Capsaicin berechnet (Tab. 14; Kap. 3.9). Der Agonist NADA zeigte im Vergleich zur Referenz Capsaicin die signifikant geringste Effizienz (51,6% ± 12,4%), gefolgt von NOD (86,3% ± 6,2%) (Tab.14; Abb.33 A). Keine signifikanten Unterschiede konnten für die Agonisten RTX, Olvanil und NADA ermittelt werden (Tab. 14).

Die getesteten Antagonisten inhibierten die Capsaicin-induzierte Calcium-Antwort des hTRPV1-mCherry-Ionenkanals konzentrationsabhängig (Abb.33B). Die Analyse der generierten Dosis-Wirkungs-Kurven ergab folgende Rangfolge der IC<sub>50</sub>-Potenzen: BCTC > AMG-9810 > Ruthenium Red > Capsazepine > SB-366791. Für SB-366791 wurde ein Hill-Koeffizient von -1,02 berechnet, für RR -1,28, und Capsazepine -1,91. Für die beiden Antagonisten AMG-9810 und BCTC wurden Hill-Koeffizienten von <-2 berechnet (-2,34 bzw. -2,39) (Tab. 15; Kap. 3.9).

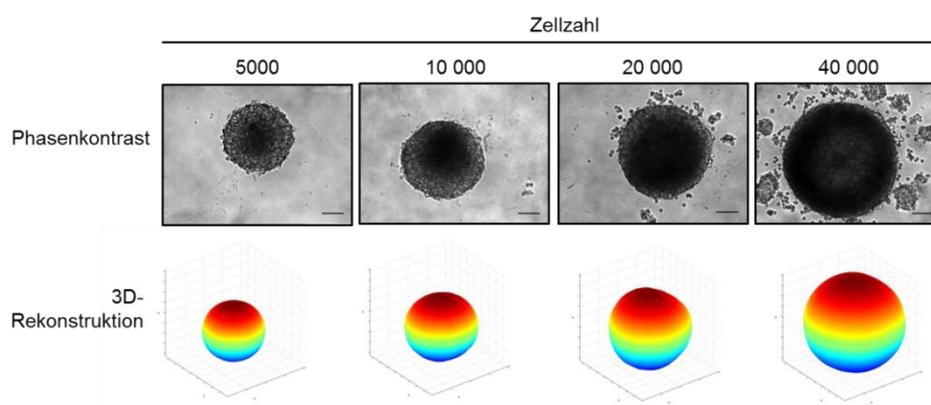
Zusammenfassend belegen die Ergebnisse, dass der entwickelte Plattenreader-basierte CHO<sup>-I-hTRPV1</sup>-Calcium-Assay als sensitives Testsystem für die pharmakologische Analyse von TRPV1-spezifischen Agonisten und Antagonisten einsetzbar ist.

### **3.6 3D-Sphäroid-Zellmodell mit Tet-induzierbarer TRPV1-Expression**

Der technologische Wechsel von zweidimensionalen Monolayer- zu dreidimensionalen Zellkulturen ist durch die Notwendigkeit geprägt, Zellmodelle zu entwickeln, die die physiologischen Zellfunktionen in lebendem Gewebe besser simulieren und damit den experimentellen Bereich zwischen *in-vitro* Zellkultur und *in-vivo* Organismus abbilden. In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass im Gegensatz zu 2D-Zellkulturen Zellen in 3D-Kultur in vielen Aspekten ihre gewebephysiologischen Eigenschaften beibehalten, beispielsweise hinsichtlich Morphologie, Genexpression, Signaltransduktion, Polarisation, Apoptose, Migration und Proliferation sowie Sensitivität gegenüber Wirkstoffen (Bissell *et al.*, 1982; Pampaloni *et al.*, 2007). In der 3D-Zellkultur werden häufig Sphäroide als 3D-Zellmodell verwendet.

Für die Entwicklung eines TRPV1-spezifischen 3D Sphäroid-basierten Assays wurde zunächst die Fähigkeit der CHO<sup>-I-hTRPV1</sup>-Zellen untersucht, in nicht-adhäsiven Mikrotiterplatten 3D-Strukturen auszubilden. Weiterhin wurde die Abhängigkeit der Sphäroidbildung von der Aussaatdichte der Zellen analysiert. Für die Generierung von Sphäroiden wurden unterschiedliche Zellzahlen von 5000 bis 40.000 CHO<sup>-I-</sup>

$hTRPV1$ -Zellen pro Well in Lipidure-Mikrotiterplatten (MTP) ausgesät. Bereits nach 24h waren bei allen Zellzahlen Sphäroide ausgebildet (Abb.34), die nachfolgend mikroskopisch analysiert wurden. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm AnaSP (Piccinini, 2015), wodurch Fläche, Durchmesser, Umfang und der SI (Sphericity-Index) der Sphäroide bestimmt wurden (Tab.13). Die Größe der gebildeten Sphäroide war von der Zellzahl abhängig. Bei einer Zellzahl von 5000 und 10.000 zeigten sich kompakte runde Sphäroide aus allen ausgesäten Zellen, wohingegen ab einer Zellzahl von 20.000 und 40.000 neben jeweils einem großen, kompakten Sphäroid zusätzlich kleinere Zellaggregate gebildet wurden (Abb.34).



**Abbildung 34: Mikroskopische Aufnahmen und 3D-Rekonstruktionen der generierten Sphäroide.** Es wurden 5000 bis 40.000 Zellen pro Well einer zellabweisenden U-Bottom-96-Well-Platte (Lipidure) ausgesät und die Platte anschließend zentrifugiert. Mit Hilfe des Programms ReVisp (Piccinini *et al.*, 2015) wurden 3D-Rekonstruktionen der Sphäroide berechnet und hergestellt (untere Reihe).

Aufgrund der gemessenen SI (Sphericity-Index)-Werte als auch der 3D-Rekonstruktion mittels ReVisp-Programm wurden die Sphäroide nach Park als „rund“ klassifiziert (Park *et al.*, 2016) (Abb. 34).

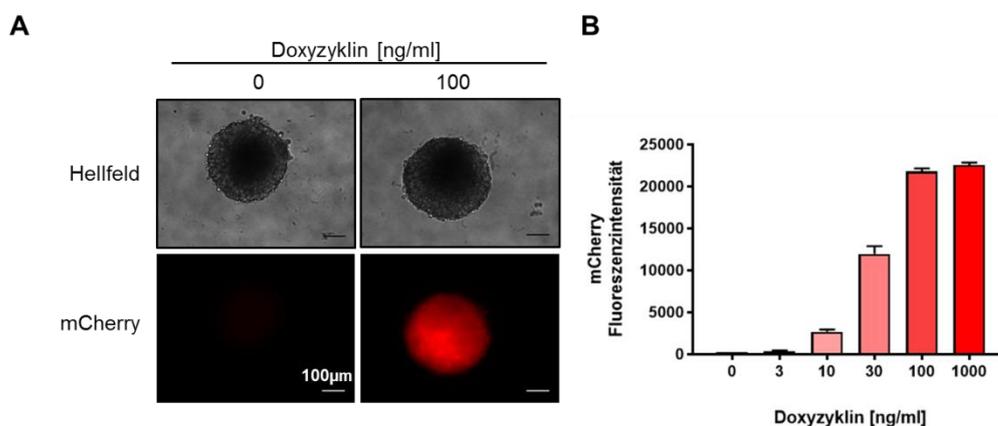
**Tabelle 13: Mit AnaSP berechnete Parameter der  $CHO^{hTRPV1}$  Sphäroide**

Zellzahl	Fläche [ $\mu m^2$ ]	Durchmesser [ $\mu m$ ]	Umfang [ $\mu m$ ]	SI
5000	138012 $\pm$ 6286	332 $\pm$ 7	1109 $\pm$ 25	0.94 $\pm$ 0.003
10 000	170927 $\pm$ 6714	369 $\pm$ 7	1242 $\pm$ 25	0.93 $\pm$ 0.003
20 000	229667 $\pm$ 9374	439 $\pm$ 8	1475 $\pm$ 29	0.93 $\pm$ 0.002
40 000	357407 $\pm$ 15649	534 $\pm$ 11	1806 $\pm$ 61	0.93 $\pm$ 0.01

Eine Erhöhung der Zellzahl korreliert mit einem Anstieg der gemessenen Fläche, des Durchmessers und des Umfangs der Sphäroide. Der Sphericity-Index (SI) ist eine dimensionslose Kennzahl, die mit Hilfe der Sphäroid-Fläche und des Umfangs, berechnet wird. Sie gibt Auskunft über die Form des Sphäroids. Ab einem Wert  $>0,9$  wird die Form des Sphäroids als rund beschrieben (Piccinini, 2015; Zanoni *et al.*, 2016; Kelm *et al.*, 2003). Für die CHO-<sup>I-hTRPV1</sup>-Sphäroide wurden SI-Werte  $>0,9$  ermittelt.

### 3.6.1 Doxyzyklin-abhängige Induktion der hTRPV1-mCherry-Expression im Sphäroid-Zellmodell

Da im CHO-<sup>I-hTRPV1</sup>-Monolayer bereits nachgewiesen wurde, dass die Expression des hTRPV1-mCherry Ionenkanals von der Doxyzyklin-Konzentration abhängig ist, wurde die Regulierbarkeit der hTRPV1-mCherry-Genexpression auch im Sphäroid-Zellmodell analysiert (Abb. 35).



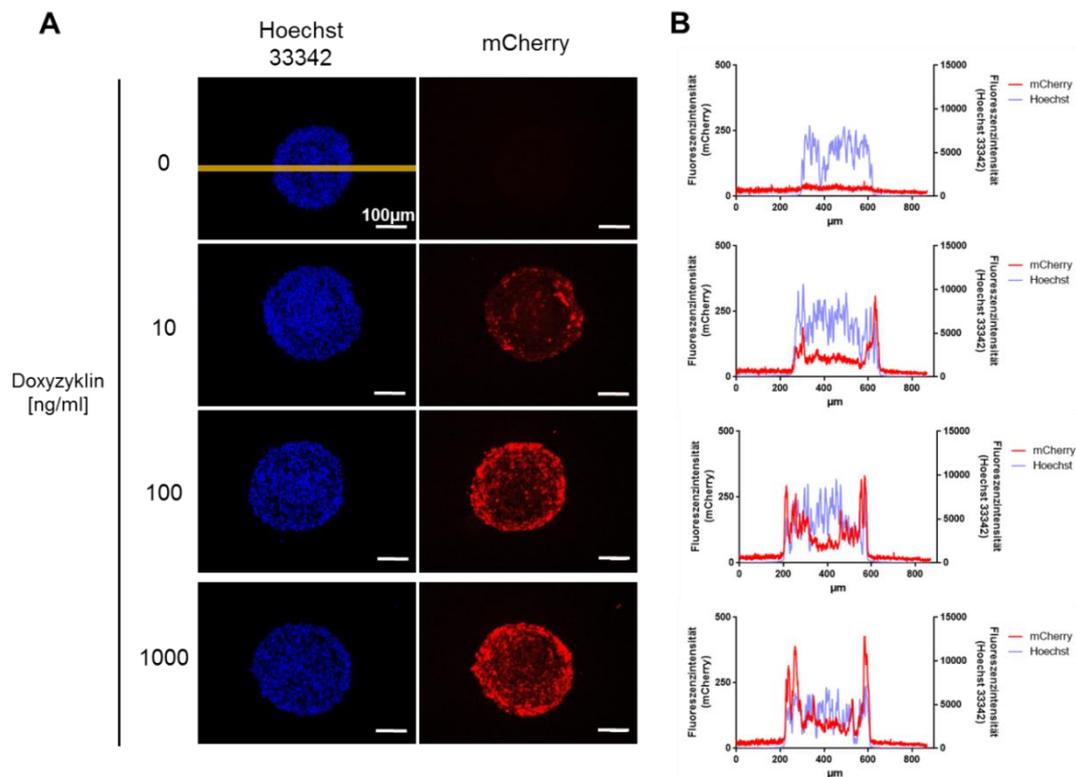
**Abbildung 35: Konzentrationsabhängige Induktion der hTRPV1-mCherry-Expression im CHO-<sup>I-hTRPV1</sup>-Sphäroid.** Jeweils 10.000 Zellen wurden pro Well einer 96-Well-U-Bottom-Lipidure-Platte ausgesät und nach 24h mit Doxyzyklin (0-1000ng/ml) induziert. A) Hellfeld, mCherry-Fluoreszenz. B) mCherry-Fluoreszenzintensität der gemessenen Sphäroide.

In Abwesenheit von Doxyzyklin wurde keine mCherry-Fluoreszenz gemessen. Ab einer Konzentration von 10ng/ml Doxyzyklin wurde eine mCherry-Fluoreszenzintensität in Höhe von 2700 Fluoreszenzeinheiten nachgewiesen. Diese stieg mit zunehmender Doxyzyklin-Konzentration und erreichte ab 100ng/ml Doxyzyklin ein Maximum von 21800 Fluoreszenzeinheiten. Aus dieser Dosis-Wirkungs-Beziehung wurde ein  $EC_{50}$ -Wert von 28,6ng/ml Doxyzyklin für die Induktion der hTRPV1-mCherry Expression im 3D-Zellkulturmodell berechnet. Damit ist der

EC<sub>50</sub>-Wert im Sphäroid-Zellmodell fast dreimal höher als im 2D-CHO<sup>I-hTRPV1</sup>-Zellkulturmodell.

### 3.6.2 hTRPV1-mCherry-Expression im CHO<sup>I-hTRPV1</sup>-Sphäroid-Zellmodell

Im Gegensatz zum Monolayer ist die Verteilung der hTRPV1-mCherry exprimierenden Zellen im Sphäroid-Zellmodell nicht direkt anhand der mCherry-Fluoreszenz quantifizierbar, da der Durchmesser der Sphäroide ca. 400 µm betrug. Daher wurde die Quantifizierung an 10µm dicken Kryoschnitten der CHO<sup>I-hTRPV1</sup>-Sphäroide durchgeführt (Abb. 36).



**Abbildung 36: Verteilung der Zellen mit induzierter hTRPV1-mCherry-Fluoreszenz in Kryoschnitten von Sphäroiden.** 10.000 Zellen wurden pro Well einer 96-Well-U-Bottom-Lipidure-Platte ausgesät und nach 24h mit Doxycyclin (0-1000ng/ml) induziert. Nach 24h wurden die Sphäroide mit PFA fixiert, in OCT-Medium eingebettet, 10µm dicke Schnitte angefertigt und mit Hoechst 33342 angefärbt. A) Hoechst 33342, mCherry. Der gelbe waagerechte Balken markiert den analysierten Bereich für die in B) abgebildeten Intensitäts-Profile der Hoechst 33342- und mCherry-Fluoreszenzintensitäten

Die gemessene mCherry-Fluoreszenzintensität variiert innerhalb des Sphäroids. In den äußeren Zellschichten (50µm Breite) wurde in den induzierten Sphäroiden eine

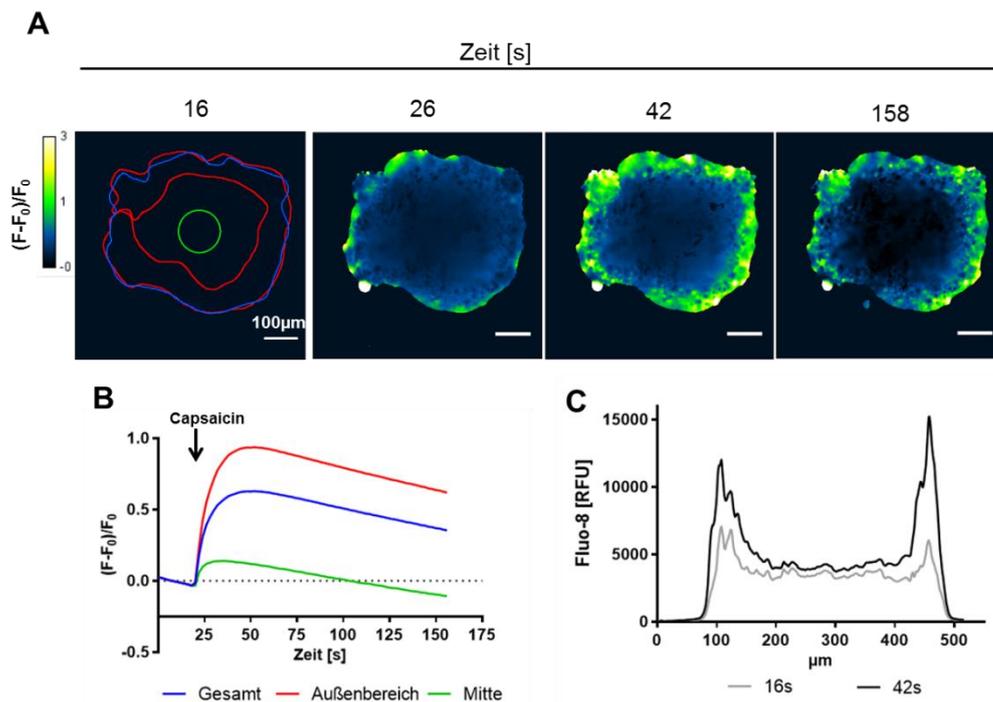
höhere mCherry-Fluoreszenzintensität als im 200µm großen Bereich in der Mitte des Sphäroids detektiert. Mittels Hoechst33342-Färbung wurde in den Kryoschnitten eine einheitlich verteilte Fluoreszenzintensität gemessen, wodurch ausgeschlossen werden konnte, dass in der Mitte der Sphäroide die Zellzahl geringer ist (Abb.36).

Die erhöhte mCherry-Fluoreszenz in den äußeren Zellschichten ist von der Doxyzyklin-Konzentration abhängig. In Sphäroiden, die mit 10ng/ml Doxyzyklin induziert wurden, wurde eine 2,1-fach höhere mCherry-Fluoreszenz in den äußeren Zellschichten im Vergleich zum Mittelbereich gemessen. Dieser Faktor erhöhte sich bei einer Induktion mit 100ng/ml bzw. 1000ng/ml Doxyzyklin auf 2,2-fach bzw. 2,4-fach.

### 3.6.3 Capsaicin-induzierte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in Sphäroiden

Nachdem die Expression des hTRPV1-mCherry-Fusionsproteins in CHO<sup>-I-hTRPV1</sup>-Sphäroiden anhand der mCherry-Fluoreszenz verifiziert wurde, wurde die Aktivierbarkeit der Ionenkanäle in den Sphäroiden durch Messung der intrazellulären Calcium-Konzentration  $[Ca^{2+}]_i$  nach Zugabe von Capsaicin fluoreszenzmikroskopisch bestätigt (Abb.37).

Die relative Änderung der Fluo-8-Intensität war in der Mitte des Sphäroids niedriger als im äußeren Bereich (Abb.37B). Dieser Bereich hatte eine Dicke von circa 60µm (Abb.37C). Die Auswertung der unterschiedlichen Bereiche (Mitte und Außenbereich) zeigte, dass alle Zellen des Sphäroids mit einem sofortigen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  auf eine Capsaicin-Stimulierung reagierten. Die Aktivierung der rekombinant exprimierten TRPV1-Ionenkanäle kann über die Messung der  $[Ca^{2+}]_i$  mit Fluo-8 somit auch in Sphäroiden quantifiziert werden. Daher eignet sich im Vergleich zum Monolayer-Modell auch das CHO<sup>-I-hTRPV1</sup>-Sphäroid-Zellmodell für pharmakologische Analysen von TRPV1 Agonisten und Antagonisten.



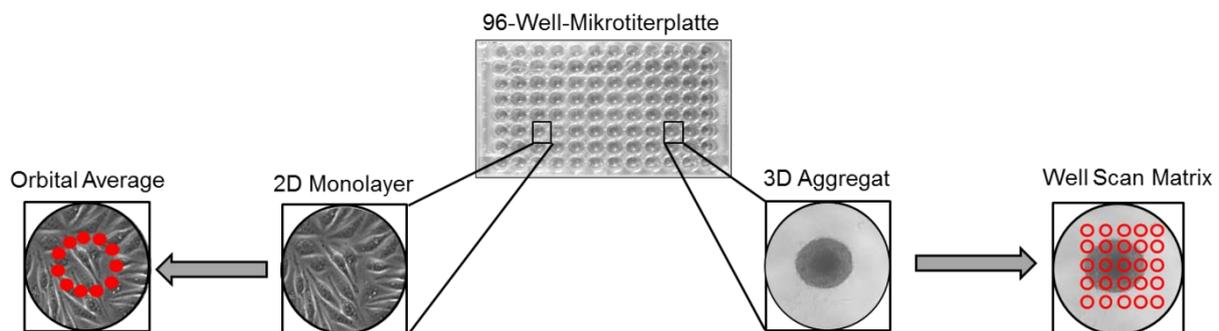
**Abbildung 37: Capsaicin-induzierte Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in  $\text{CHO}^{\text{-hTRPV1}}$ -Sphäroiden.** Es wurden 10.000 Zellen pro Well einer 96-Well-U-Bottom-Lipidure-Platte ausgesät und nach 24h mit 100ng/ml Doxzyklin induziert. Nach weiteren 24h wurde die Fluo-8-Intensität vor und nach Zugabe von  $1\mu\text{M}$  Capsaicin gemessen. A) Bildsequenz des Sphäroids vor Capsaicin-Zugabe (16s), direkt nach der Zugabe (26s und 42s) und nach 158s. B) Zeitaufgelöste Calcium-Reaktion des gesamten Sphäroids (blau), des Außenbereichs ( $60\mu\text{m}$  Dicke) (rot) und der Mitte ( $\varnothing 280\mu\text{m}$ ) (grün). C) Intensitätsprofil der Fluo-8-Intensität entlang einer äquatorialen Linie 16s und 42s nach Capsaicin-Zugabe.

### 3.7 Fluorimetrischer Calcium-Assay für pharmakologische Analysen im TRPV1-Sphäroid-Zellmodell

#### 3.7.1 Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Sphäroiden im Plattenreader

Die Messung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in den Sphäroiden im Plattenreader erforderte eine Anpassung des Messprotokolls. Im Gegensatz zu Monolayer-Kulturen haften Sphäroide nicht an das Substrat der MTP an, so dass die „orbital averaging“-Methode, die zur Messung  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in Monolayer-Kulturen benutzt wurde, nicht verwendet werden konnte. Bei Zugabe von Puffer oder Agonisten können Sphäroide ihre Position im Well verändern, so dass sie ggf. nicht mehr vollständig oder gar nicht vom Messstrahl erfasst werden. Dadurch kann es zu einer Änderung der gemessenen Fluo-8-Fluoreszenzintensität kommen und die Quantifizierung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  verfälschen. Daher wurde eine „Well Scan“-Methode in Zusammenarbeit mit

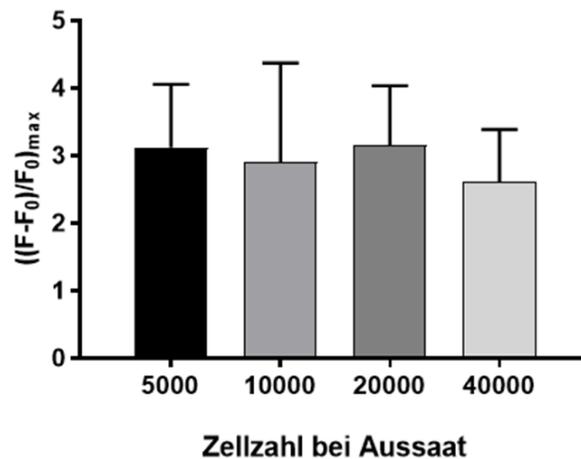
BMG Labtech entwickelt, die es ermöglicht, die Position der Sphäroide während der Messung zu berücksichtigen. In der Mitte des Wells wird eine Fläche von circa  $3,2\text{mm}^2$  mit einer Auflösung von  $5 \times 5$  Messpunkten erfasst. Die Fläche der Sphäroide betrug circa  $0,1\text{mm}^2$ , so dass sie bei der Messung von maximal 9 Messpunkten erfasst werden, die dann zur Positionsbestimmung und Quantifizierung herangezogen werden können (Abb. 38; Kapitel 2.5.6). Diese Messmethode ermöglicht die Bestimmung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in  $\text{CHO}^{-\text{hTRPV1}}$ -Sphäroiden und damit die Untersuchung von spezifischen TRPV1-Agonisten und Antagonisten.



**Abbildung 38: Schematischer Vergleich der eingesetzten Messmethoden für 2D-Monolayer und 3D-Sphäroide des generierten Zellmodells.**

### 3.7.2 Einfluss der Sphäroidgröße im fluorimetrischen Calcium-Assay

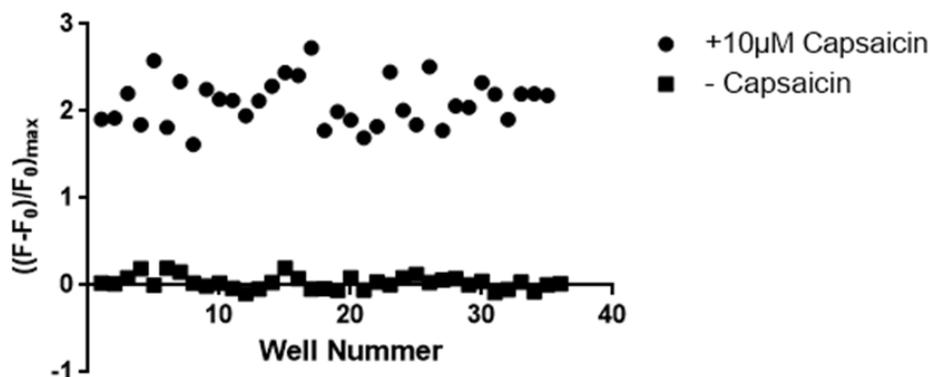
Ein weiterer Entwicklungsschritt zur Analyse der Sphäroide im Plattenreader war die Bestimmung der optimalen Sphäroidgröße, die bei der Fluo-8-Quantifizierung ein maximales Fluoreszenzsignal ergab. Die Sphäroide zeigten unabhängig von ihrer Größe den gleichen Capsaicin-induzierten relativen Anstieg der Fluo-8-Fluoreszenzintensität (Abb.39). Für nachfolgende Analysen wurden daher Sphäroide mit einem Durchmesser von ca.  $370\ \mu\text{m}$  (Aussaat von 10.000 Zellen/Well) verwendet.



**Abbildung 39: Einfluss der Sphäroidgröße auf die Änderung der Fluo-8-Intensität nach TRPV1-Aktivierung.** Es wurden 5000, 10.000, 20.000 und 40.000 Zellen pro Well einer 96-Well-U-Bottom-Lipidure-Platte ausgesät und nach 24h mit 10ng/ml Doxyzyklin induziert. Nach weiteren 24h wurde die Fluoreszenzintensität vor und nach Zugabe von 2 $\mu$ M Capsaicin im Mikroplattenreader gemessen.

### 3.7.3 Qualität des Calcium-Assays für Analysen von CHO<sup>I-hTRPV1</sup>-Sphäroiden

Analog zur Bestimmung des Z'-Faktors im Monolayer-Zellmodell (Kap. 3.4.2) wurde die Qualität des Calcium-Assays für pharmakologische Analysen des CHO<sup>I-hTRPV1</sup>-Sphäroid-Zellmodells ermittelt (Abb. 40).

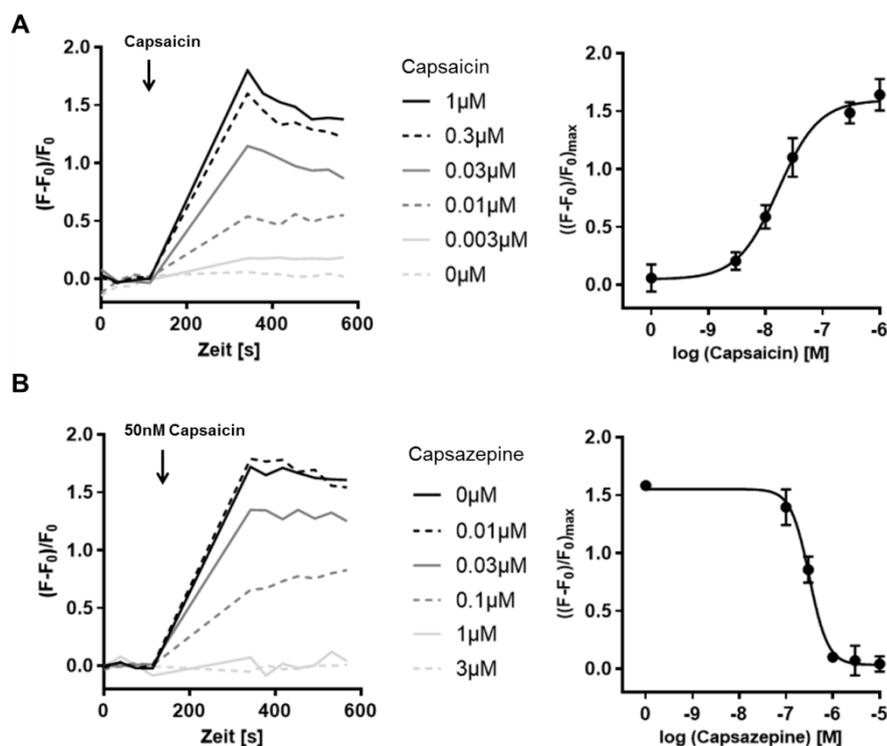


**Abbildung 40: Bestimmung des Z'-Faktors des entwickelten Assays für die Aktivierung von TRPV1-Kanälen in CHO<sup>I-hTRPV1</sup>-Sphäroiden.** Es wurden 10.000 Zellen pro Well einer 96-Well-Lipidure Platte ausgesät und nach 24h mit 10ng/ml Doxyzyklin induziert. Nach weiteren 24h wurde die Fluo-8-Intensität vor und nach Zugabe von 0 $\mu$ M und 10 $\mu$ M Capsaicin gemessen. Der berechnete Z'-Faktor betrug in diesem Experiment 0,5. Das Streudiagramm ist repräsentativ aus n=6 Experimenten.

In sechs unabhängigen Experimenten wurde ein Z'-Faktor von  $0,45 \pm 0,05$  ermittelt. Damit erfüllt der etablierte Calcium-Assay für das entwickelte Sphäroid-Zellmodell die minimalen Anforderungen an ein Hochdurchsatz-Screening-Verfahren.

### 3.8 Pharmakologische Analyse von TRPV1-Agonisten und -Antagonisten im CHO-<sup>I-hTRPV1</sup>-Sphäroid-Zellmodell

Das CHO-<sup>I-hTRPV1</sup>-Sphäroid-Zellmodell wurde wie auch das Monolayer-Zellmodell hinsichtlich der Potenz (EC<sub>50</sub>- bzw. IC<sub>50</sub>-Werte) und der Effizienz (Maximalwirkung) von bekannten TRPV1-Wirkstoffen pharmakologisch charakterisiert. Dazu wurden Dosis-Wirkungs-Kurven mit dem entwickelten Calcium-Assay erstellt (Abb.41). Mit diesen Messungen konnte erfolgreich die Abhängigkeit der Höhe der gemessenen [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Änderung nach TRPV1-Aktivierung von unterschiedlich konzentrierten TRPV1-Agonisten bzw. -Antagonisten nachgewiesen werden.

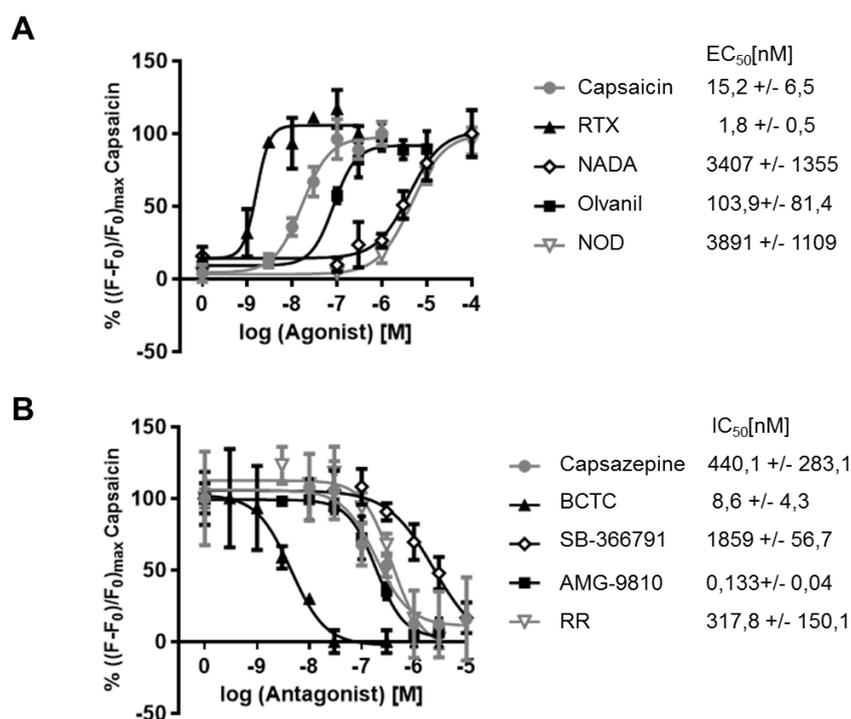


**Abbildung 41: Zeitaufgelöste, konzentrationsabhängige Calcium-Reaktionen nach Capsaicin Zugabe in unbehandelten bzw. mit Capsazepine vorbehandelten CHO-<sup>I-hTRPV1</sup>-Sphäroiden.** 10.000 Zellen wurden pro Well in eine 96-Well-Lipidure-Platte ausgesät und nach 24h mit 10ng/ml Doxyzyklin induziert. A) Nach weiteren 24h wurde die Fluo-8-Intensität vor und nach Zugabe von Capsaicin (0-1µM) gemessen. Links: Einzelmessungen der Konzentrationen. Rechts: Resultierende Dosis-Wirkungskurve. B) Nach weiteren 24h wurden die Zellen mit Capsazepine (0-3µM) vorbehandelt und die Fluo-8-Intensität vor und nach Zugabe von 50nM Capsaicin gemessen. Links: Einzelmessungen der Konzentrationen. Rechts: Resultierende Dosis-Wirkungskurve. Die Kurven sind repräsentativ aus n=3-5 Experimenten.

Die gemessene Capsaicin-induzierte Calcium-Reaktion ist konzentrationsabhängig (Abb.41A). Bei Zugabe von 3nM Capsaicin konnte eine Änderung der Fluo-8-

Intensität um das 0,2-fache detektiert werden. Die Aktivierung des TRPV1-Ionenkanals mit der maximalen Konzentration von 1  $\mu$ M Capsaicin führte zu einer 1,64-fachen Änderung der Fluo-8-Intensität. Mit den gemessenen höchsten Änderungen der Fluo-8-Intensität nach Capsaicin-Zugabe in den Einzelmessungen wurde eine Dosis-Wirkungskurve erstellt (Abb.41 A, rechts).

Eine Vorbehandlung der Sphäroide mit dem Antagonisten Capsazepine inhibierte die Capsaicin-induzierte Calcium-Reaktion konzentrationsabhängig (Abb.41B). In Sphäroiden, die mit 100nM Capsazepine vorbehandelt wurden, wurde eine Änderung der Fluo-8-Intensität um das 1,39-fache detektiert. Die Zugabe von 1  $\mu$ M Capsazepine inhibierte die Capsaicin-induzierte Calcium-Reaktion vollständig.



**Abbildung 42: Dosis-Wirkungs-Kurven der getesteten Agonisten und Antagonisten in CHO<sup>-I</sup><sub>hTRPV1</sub>-Sphäroiden.** 10.000 Zellen wurden pro Well einer 96-Well-Lipidure-Platte ausgesät und nach 24h mit 10ng/ml Doxyzyklin induziert. A) Nach weiteren 24h wurde die Fluo-8-Fluoreszenzintensität vor und nach Agonist-Zugabe gemessen. TRPV1-Agonisten: Capsaicin, RTX, NADA, Olvanil, NOD. B) Nach weiteren 24h wurden die Zellen mit den Antagonisten vorbehandelt und die Fluo-8-Intensität vor und nach Zugabe von 50nM Capsaicin gemessen. TRPV1-Antagonisten: Capsazepine, BCTC, SB-366791, AMG-9810, RR. Die Kurven sind repräsentativ aus n=3-5 Experimenten und auf die maximale Capsaicin-Reaktion in Prozent normiert.

Zusätzlich wurden analog zum Monolayer-Zellmodell weitere TRPV1-spezifische Wirkstoffe zur pharmakologischen Charakterisierung des Sphäroid-Zellmodells eingesetzt. Es wurden die Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Agonisten RTX, NADA,

Olvanil, NOD sowie der Antagonisten BCTC, SB-366791, AMG-9810, RR analysiert (Abb.42).

Die Analyse der ermittelten Dosis-Wirkungs-Kurven ergab folgende Rangfolge der  $EC_{50}$ -Potenzen: RTX > Capsaicin > Olvanil > NADA > NOD. Die zugehörigen Hill-Koeffizienten sind in Tabelle 14 aufgeführt. Für Capsaicin, NADA, Olvanil, und NOD wurden Koeffizienten >1 berechnet und für RTX >2. Die Maximalwirkung (Efficacy) der Agonisten wurde relativ zum Agonisten Capsaicin berechnet (Tab.14). Eine signifikant geringere Effizienz zeigte der Agonist NADA ( $83,7\% \pm 14,8\%$ ). Keine signifikanten Unterschiede konnten für die Agonisten RTX, Olvanil und NOD ermittelt werden (Tab.14).

Die getesteten Antagonisten inhibieren die Capsaicin-induzierte Calcium-Antwort des hTRPV1-mCherry-Ionenkanals konzentrationsabhängig (Abb.42B). Die Analyse der generierten Dosis-Wirkungskurven ergab folgende Rangfolge der  $IC_{50}$ -Potenzen: BCTC > AMG-9810 > Ruthenium Red > Capsazepine > SB-366791. Für Ruthenium Red wurde ein Hill-Koeffizient von -1,18 berechnet, für BCTC von -1,70. Für die Antagonisten Capsazepine, AMG-9810 und SB-366791 wurden Hill-Koeffizienten von <-2 berechnet (-2,57; -2,17; -2,18) (Tab.15).

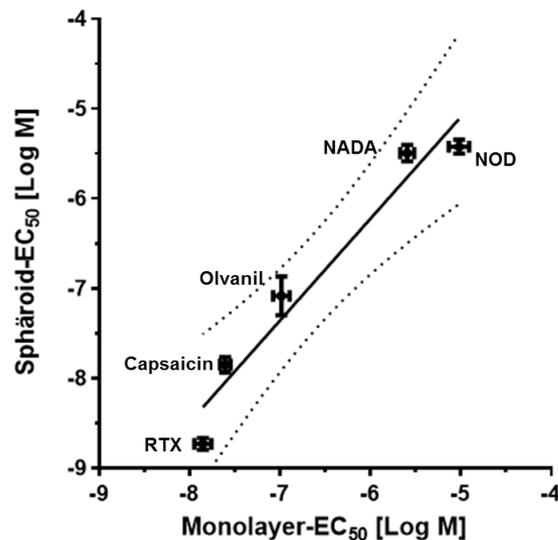
Zusammenfassend belegen die Ergebnisse, dass das CHO-<sup>I-hTRPV1</sup>-Sphäroid-Zellmodell für Plattenreader-basierte Calcium-Assays als sensitives Testsystem für TRPV1 Wirkstoffe einsetzbar ist.

### **3.9 Vergleich der pharmakologischen Aktivität der TRPV1-Wirkstoffe im Monolayer- und 3D-Sphäroid Zellmodell**

Die Resultate der pharmakologischen Analysen der CHO-<sup>I-hTRPV1</sup>-Zellkulturmodelle wurden verglichen, um Einflüsse der 2D- bzw. 3D-Zellkultivierung auf die pharmakologische Aktivität der getesteten Wirkstoffe in den CHO-<sup>I-hTRPV1</sup> Zellen zu untersuchen.

Um abzuschätzen, ob für die  $EC_{50}$ - bzw.  $IC_{50}$ -Werte ein linearer Zusammenhang zwischen beiden Zellmodellen besteht, wurde eine lineare Regression durchgeführt und das Bestimmtheitsmaß (Determinationskoeffizient  $r^2$ ) der Regressionsgeraden

ermittelt. Dieser Koeffizient ist das Quadrat des Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) und zeigt an, wie gut die Regression (hier die Gerade) die tatsächlich gemessenen Werte beschreibt. Der Vergleich der  $EC_{50}$ -Werte der untersuchten TRPV1-Agonisten Capsaicin, RTX, NADA, Olvanil und NOD zeigte eine starke Korrelation zwischen Monolayer- und Sphäroid-Zellmodell ( $r^2 = 0,97$ ) (Abb.43; Tab.14).



**Abbildung 43: Korrelationsanalyse der Monolayer- $EC_{50}$ -Werte versus Sphäroid- $EC_{50}$ -Werte.** Determinationskoeffizient  $r^2$  0,97; Steigung der Regressionsgeraden: 1,13 (durchgezogene Linie). 95% Konfidenzband (gepunktete Linien).

Im 3D-Zellkulturmodell zeigen drei Agonisten eine signifikant höhere Potenz als im Monolayer (Tab.14). Der Agonist RTX ist im Sphäroid-Zellmodell 8,7-fach potenter als im Monolayer (1,7nM bzw. 14,7nM) (Tab. 14). Das Dopamin-Derivat, NOD, zeigt eine 2,6-fach höhere (3891nM bzw. 10257nM) und der Agonist Capsaicin eine 1,7-fach (15,2nM bzw. 25,2nM) höhere Potenz im 3D-Zellmodell als im Monolayer. Keine signifikanten Unterschiede konnten für die Agonisten Olvanil und NADA ermittelt werden (Tab. 14). Die ermittelte Wirksamkeitsreihenfolge (RTX > Capsaicin > Olvanil > NADA > NOD) ist für Monolayer und 3D-Sphäroid identisch.

Die Effizienz des Agonisten NADA ist im 2D- als auch 3D-Zellkulturmodell im Vergleich zu Capsaicin signifikant geringer (2D: 51,6%  $\pm$  12,4%; 3D: 83,7%  $\pm$  14,8%), wobei der Effekt im Monolayer deutlich höher ausfällt. Die Agonisten RTX, Olvanil und NOD zeigten relativ zu Capsaicin keine signifikanten Unterschiede.

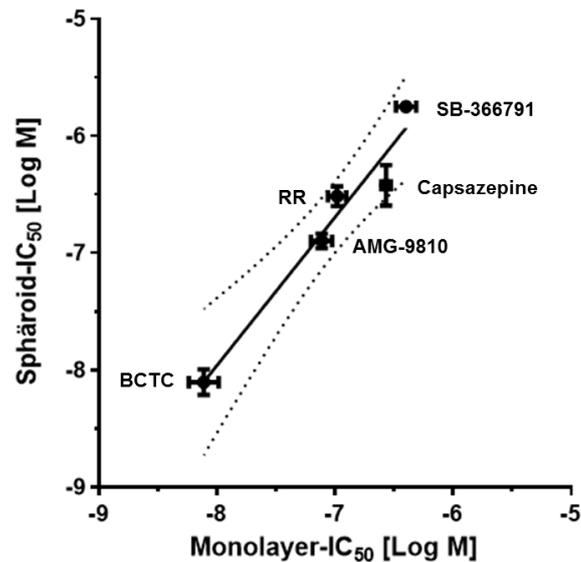
Die Hill-Koeffizienten der gemessenen Dosis-Wirkungskurven der Agonisten zeigten keine signifikanten Unterschiede (Tab.14).

**Tabelle 14: EC<sub>50</sub>-Werte, Hill-Koeffizienten und Effizienz der Monolayer und Sphäroid Calcium Messungen.** Mittelwert (± Standardabweichung) aus n=3-8. \* P<0.05 (Signifikanzniveau)

Agonist	Monolayer			Sphäroid		
	EC <sub>50</sub> [nM]	Hill Koeffizient	Effizienz [%]	EC <sub>50</sub> [nM]	Hill Koeffizient	Effizienz [%]
Capsaicin	25,5 (6,2)	1,27 (0,33)	100 (6,2)	15,2 * (6,5)	1,71 (0,98)	100 (14,4)
RTX	14,7 (4,9)	1,70 (0,76)	96,1 (7,2)	1,7 * (0,4)	2,66 (0,25)	110,9 * (7,9)
NADA	2636 (779)	0,87 (0,16)	51,6 (12,4)	3407 (1355)	1,20 (0,20)	83,7 * (14,8)
Olvanil	108,7 (42,7)	0,88 (0,26)	89,5 (9,0)	103,9 (81,5)	1,27 (0,39)	94,2 (11,9)
NOD	10257 (4568)	1,10 (0,35)	86,3 (6,2)	3891 * (110)	1,18 (0,25)	97,0 * (9,4)

Zusammenfassend zeigte die pharmakologische Analyse der TRPV1-Agonisten Unterschiede in Abhängigkeit von der 2D- bzw. 3D-Kultivierung der CHO<sup>I-hTRPV1</sup>-Zellen. Im 3D-Sphäroid-Zellmodell wurden im Vergleich zum Monolayer signifikant niedrigere EC<sub>50</sub>-Werte für die Agonisten Capsaicin, RTX und NOD, als auch eine höhere Maximalwirkung für NADA, RTX und NOD ermittelt. Die höchste Änderung in der Effizienz wurde bei der Untersuchung des Agonisten NADA detektiert. Die Maximalwirkung im Monolayer betrug 51,6%, im Sphäroid dagegen 83,7%.

Der Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte der untersuchten TRPV1-Antagonisten Capsazepine, BCTC, SB-366791, AMG-9810 und RR zeigte eine starke Korrelation zwischen Monolayer- und Sphäroid-Zellmodell ( $r^2 = 0,97$ ) (Abb.44; Tab.15).



**Abbildung 44: Korrelationsanalyse der Monolayer-IC<sub>50</sub>-Werte versus Sphäroid-IC<sub>50</sub>-Werte.** Determinationskoeffizient  $r^2$  0,97; Steigung der Regressionsgeraden: 1,26. (durchgezogene Linie). 95% Konfidenzband (gepunktete Linien).

Im 3D-Zellkulturmodell zeigten zwei Antagonisten eine signifikant niedrigere inhibitorische Potenz als im Monolayer (Tab.15). Der Antagonist SB-366791 zeigte im Sphäroid einen 4,5-fach höheren IC<sub>50</sub>-Wert als im Monolayer (1859nM bzw. 417,3nM). RR zeigte einen 3-fach höheren IC<sub>50</sub>-Wert im Sphäroid als im Monolayer (326,7nM bzw. 109,9nM). Für die Antagonisten Capsazepine, AMG-9810 und BCTC konnten keine signifikanten Unterschiede in den gemessenen IC<sub>50</sub>-Werten festgestellt werden. Die berechneten Hill-Koeffizienten der Antagonisten zeigten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich von Monolayer- zu Sphäroid-Zellmodell (Tab. 15).

**Tabelle 15: IC<sub>50</sub>-Werte und Hill-Koeffizienten der Monolayer und Sphäroid Calcium Messungen.**  
Mittelwert (± Standardabweichung) aus n=3-8. \* P<0.05 (Signifikanzniveau)

Antagonist	Monolayer		Sphäroid	
	IC <sub>50</sub> [nM]	Hill Koeffizient	IC <sub>50</sub> [nM]	Hill Koeffizient
Capszepine	273,6 (42,4)	-1,91 (0,45)	440,1 (283,1)	-2,57 (1,19)
BCTC	8,4 (4,1)	-2,39 (0,98)	8,7 (4,3)	-1,70 (0,49)
SB-366791	417,3 (150,7)	-1,02 (0,09)	1859 * (567)	-2,18 (0,37)
AMG-9810	82,0 (32,1)	-2,34 (1,14)	133,4 (46,3)	-2,17 (0,87)
RR	109,9 (40,5)	-1,28 (0,34)	326,7 * (114,2)	-1,18 (0,26)

### **3.10 Brustkrebs-Zellmodelle für die pharmakologische Untersuchung von TRPV1-spezifischen Wirkstoffen**

Die 2D- und 3D- CHO<sup>-I-hTRPV1</sup>-Zellmodelle wurden als standardisiertes, zellbasiertes Assay-System entwickelt und hinsichtlich des Einsatzes in Wirkstoff-Screenings für TRPV1-spezifische Wirkstoffe optimiert. Die Brustkrebs-Zellmodelle richten sich dagegen im Kern auf die Validierung des TRPV1-Ionenkanals als Zielmolekül und die pharmakologische Analyse von TRPV1-spezifischen Wirkstoffen hinsichtlich deren Potenz, in das molekulare Krankheitsgeschehen einzugreifen.

Entsprechend der molekularen Klassifizierung von Brustkrebs wurden repräsentativ Zelllinien für jeden der fünf Subtypen und zusätzlich als Kontrolle nicht-maligne Brustzelllinien ausgewählt (Tab.16). Die Zelllinien wurden als 2D-Zellkulturmodelle und 3D-Zellkulturmodelle für pharmakologische Analysen eingesetzt.

Tabelle 16: Molekulare Subtypen von Brustkrebs und ausgewählte Zelllinien (Eroles *et al.*, 2012).

Molekularer Subtyp	Häufigkeit	ER/PR/HER2	Proliferationsgene	Ausgewählte Zelllinie	Prognose
<b>Luminal A</b>	50-60 %	+/ $\pm$	gering	MCF7 / T47D	exzellent
<b>Luminal B</b>	10-20 %	$\pm$ / $\pm$ / $\pm$	hoch	BT-474 / HCC1500	mittel/ schlecht
<b>HER2-enriched</b>	10-15 %	-/-/+	hoch	SkBr3 / MDA-MB-436	schlecht
<b>Basal-like</b>	10-20 %	-/-/-	hoch	MDA-MB-468 / HCC38	schlecht
<b>Claudin-low</b>	12-14 %	-/-/-	hoch	MDA-MB-231	schlecht
<b>nicht-maligne Brustepithelzel</b>		-/-/-		MCF12A / MCF10A	

### 3.10.1 TRPV1-vermittelte Calcium-Antwort in 2D-Brustkrebs-Zelllinien

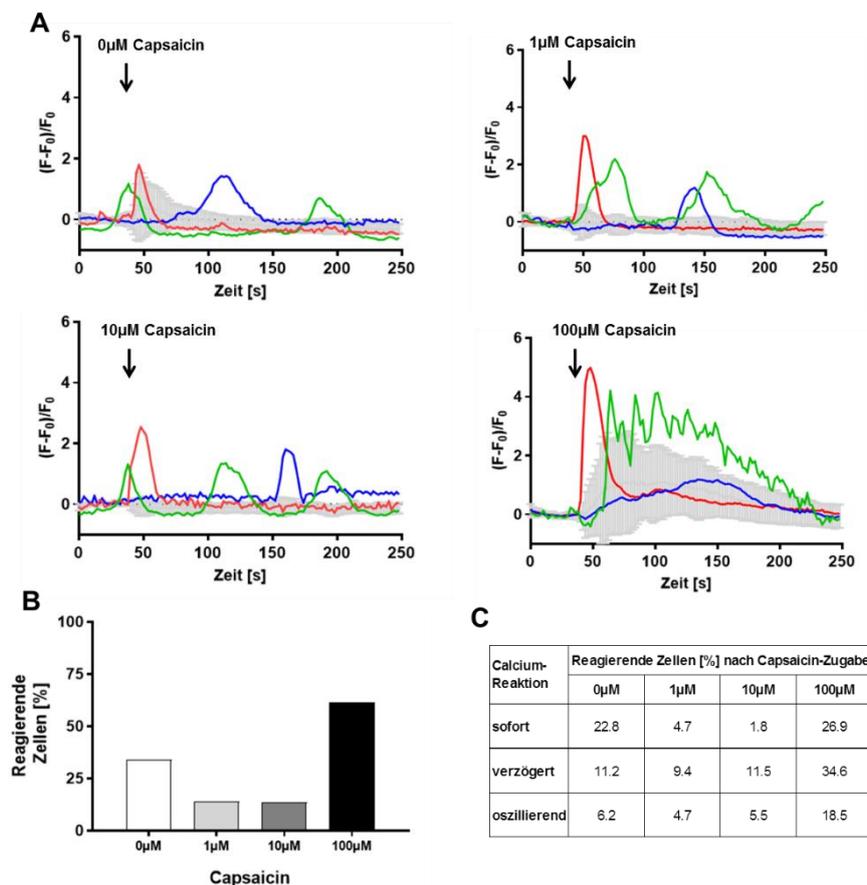
Die Monolayer-Kultivierung der Brustkrebszelllinien und nicht-malignen Brustepithelzellen erfolgte nach Standardprotokollen (Kap. 2.4). Die in Tabelle 16 aufgeführten Zelllinien wurden exemplarisch mit dem TRPV1-Referenz-Agonisten Capsaicin behandelt und der Calcium-Influx mit dem calciumsensitiven Farbstoff Fluo-8® AM fluoreszenzmikroskopisch analysiert (Abb.45-55). Da gemäß Angaben in der Literatur der TRPV1-Ionenkanal in Brustkrebszellen wahrscheinlich mindestens 20-fach geringer exprimiert wird als in sensorischen Neuronen (Pecze & Blum *et al.*, 2016), wurde Capsaicin zusätzlich zu Konzentrationen von 1 $\mu$ M bzw. 10 $\mu$ M auch in einer Konzentrationen von 100 $\mu$ M eingesetzt. In den Einzelzellanalysen (150-600 Zellen pro Zelllinie) wurden verschiedene Calcium-Signalformen beobachtet, (i) transienter, (ii) biphasisch, (iii) oszillierender Signalverlauf. In den Einzelzellmessungen zeigten Zellen entweder keinen, einen sofortigen oder einen verzögerten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ .

Eine Calcium-Reaktion wurde als positiv bewertet, wenn  $((F-F_0)/F_0) > 0,5$  war. Die detektierten Calcium-Antworten wurden in drei Kategorien aufgeteilt: 1) *sofort*: Zellen in denen innerhalb von 20s nach Capsaicin-Zugabe ein Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  gemessen wurde (rot markierte Einzelzellmessungen); 2) *verzögert*: Zellen in denen später als 20s nach Capsaicin-Zugabe ein Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  gemessen wurde (blau

markierte Einzelzellmessungen); und 3) *oszillierend*: Zellen, in denen ein Wechsel zwischen höheren und niedrigeren  $[Ca^{2+}]_i$  gemessen wurde (grün markierte Einzelzellmessungen).

### 3.10.1.1 Analyse der $[Ca^{2+}]_i$ in Zelllinien des *Luminal A* Subtyps (MCF-7; T47D)

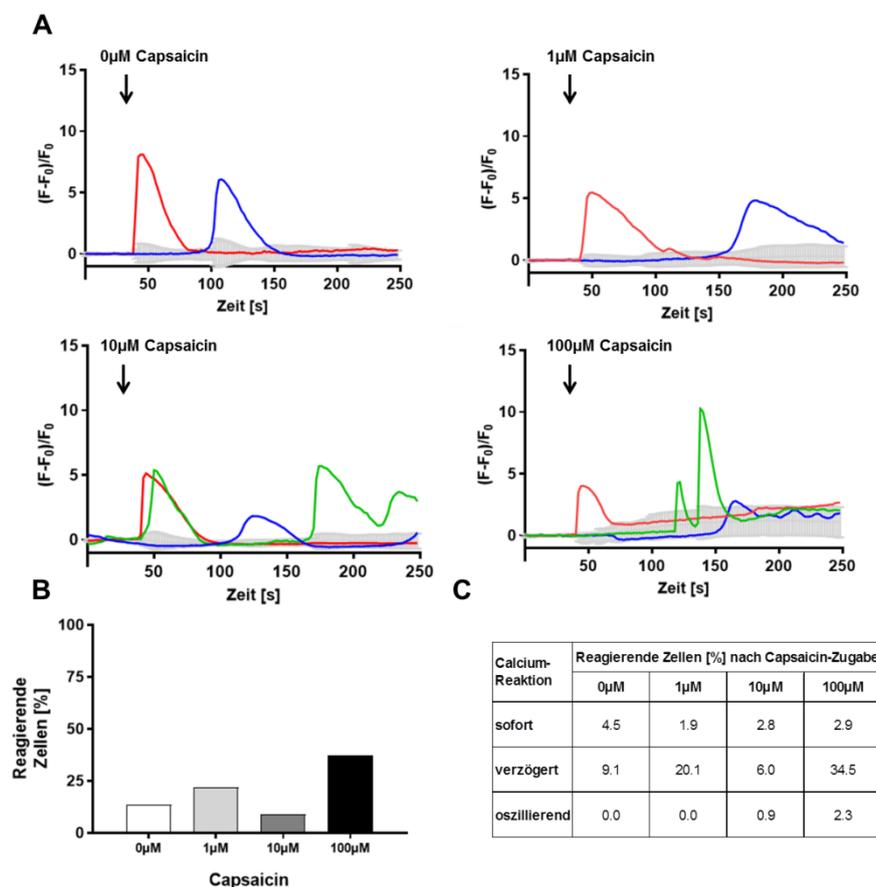
**MCF-7:** Nach einer Zugabe von 100 $\mu$ M Capsaicin wurden die höchsten relativen Änderungen der Fluo-8-Intensität sowie eine höhere Frequenz der  $Ca^{2+}$ -Oszillationen detektiert (Abb.45A). Bei den eingesetzten Konzentrationen zeigte ein unterschiedlicher Anteil von Zellen eine Calcium-Antwort, mit höchstem Anteil von 61,5% bei 100 $\mu$ M Capsaicin (Abb.45B).



**Abbildung 45: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung der *Luminal A* MCF7-Brustkrebszelllinie nach Capsaicin-Zugabe.** Es wurden 160.000 Zellen pro 35mm Schale ausgesät. Nach 48h wurde die Fluo-8-Fluoreszenzintensität fluoreszenzmikroskopisch vor und nach der Zugabe von Capsaicin gemessen. A) Repräsentative Einzelzellmessungen (rot, blau, grün) und die mittlere Fluoreszenzintensität der Population (grau, MW + Stabw). B) Anteil reagierender Zellen nach Capsaicin Zugabe aus drei unabhängigen Experimenten. C) Tabellarische Zusammenfassung detektierter Calcium-Reaktionsmuster der untersuchten Zellen.

34% der MCF7-Zellen reagierten auf die Zugabe von Capsaicin-freiem Puffer mit einem Anstieg der Fluo-8-Fluoreszenzintensität, was möglicherweise auf einer mechanischen Stimulation von Ionenkanälen beruhen könnte.

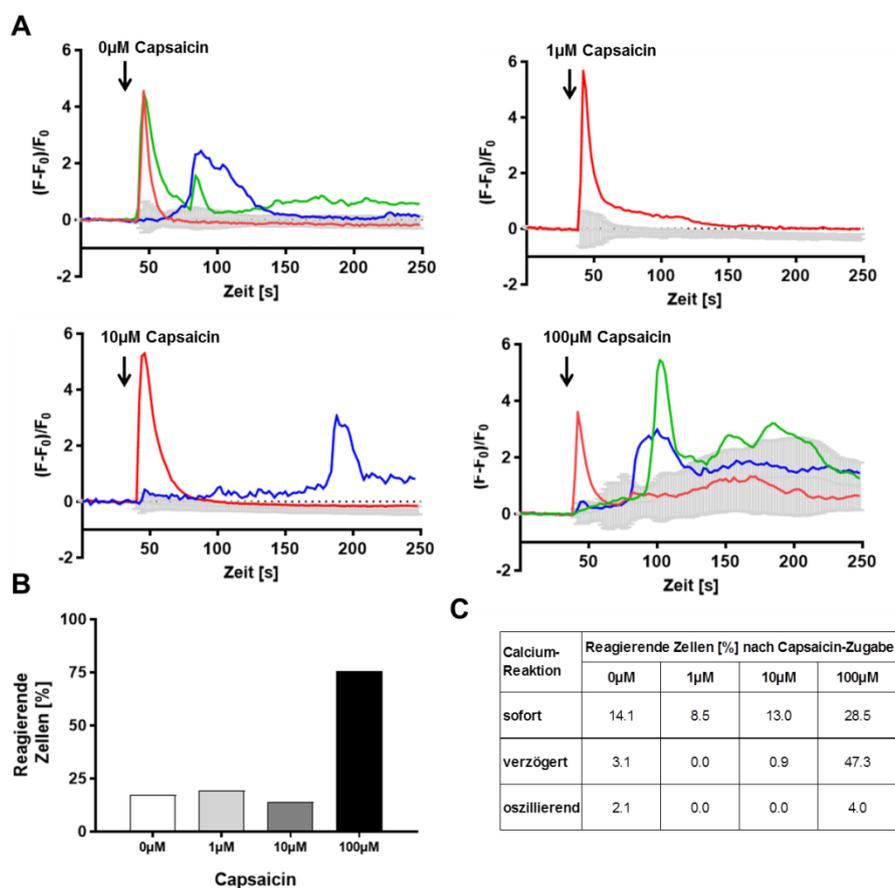
**T47D:** In den T47D-Zellen resultierte die Capsaicin-Zugabe in einem Anstieg der Fluo-8-Fluoreszenzintensität in 8,8-37,4% der untersuchten Zellen (Abb.46B). Nach Zugabe von 10 $\mu$ M und 100 $\mu$ M Capsaicin wurde in einem geringen Anteil der Zellen ein oszillierender Ca<sup>2+</sup>-Signalverlauf (0,9 bzw. 2,3%) detektiert. Der Hauptanteil der reagierenden Zellen zeigte eine verzögerte Calcium-Reaktion (20,1% bei 1 $\mu$ M bzw. 34,5% bei 100 $\mu$ M) (Abb.46C). Die Zugabe Capsaicin-freien Puffers resultierte in einem Anstieg der Fluo-8-Intensität in 13,6% der untersuchten Zellen.



**Abbildung 46: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Änderung der Luminal A T47D-Brustkrebszelllinie nach Capsaicin-Zugabe.** Es wurden 160.000 Zellen pro 35mm Schale ausgesät. Nach 48h wurde die Fluo-8-Fluoreszenzintensität fluoreszenzmikroskopisch vor und nach der Zugabe von Capsaicin gemessen. A) Repräsentative Einzelzellmessungen (rot, blau, grün) und die mittlere Fluoreszenzintensität der Population (grau, MW + Stabw). B) Anteil reagierender Zellen nach Capsaicin Zugabe aus drei unabhängigen Experimenten. C) Tabellarische Zusammenfassung detektierter Calcium-Reaktionsmuster der untersuchten Zellen.

### 3.10.1.2 Analyse der $[Ca^{2+}]_i$ in Zelllinien des Luminal B Subtyps (BT-474; HCC1500)

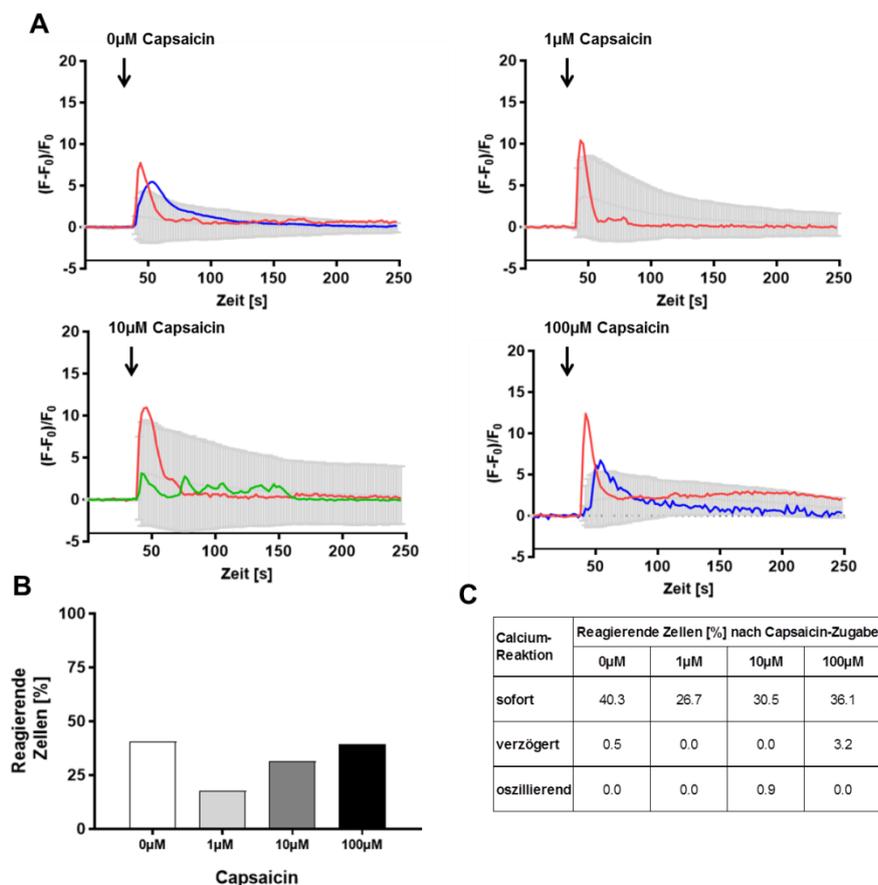
**BT-474:** In BT-474-Zellen resultierte die Capsaicin-Zugabe in einem Anstieg der Fluo-8-Fluoreszenzintensität in 19,5-75,8% der untersuchten Zellen (Abb.47B). Keine der untersuchten Zellen, die mit  $1\mu\text{M}$  Capsaicin stimuliert wurde, zeigte verzögerte oder oszillierende Calcium-Reaktionen. Nach einer Stimulierung mit  $10\mu\text{M}$  Capsaicin wurde in 13% der Zellen eine sofortige Calcium-Reaktion detektiert, in 0,9% eine verzögerte. Der Anteil verzögert reagierender Zellen ist nach einer Zugabe von  $100\mu\text{M}$  Capsaicin im Vergleich zu niedrigeren Capsaicin-Konzentration deutlich angestiegen (0-0,9% bzw. 47,3%) (Abb.47C).



**Abbildung 47: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung der Luminal B BT-474-Brustkrebszelllinie nach Capsaicin-Zugabe.** Es wurden 160.000 Zellen pro 35mm Schale ausgesät. Nach 48h wurde die Fluo-8-Fluoreszenzintensität fluoreszenzmikroskopisch vor und nach der Zugabe von Capsaicin gemessen. A) Repräsentative Einzelzellmessungen (rot, blau, grün) und die mittlere Fluoreszenzintensität der Population (grau, MW + Stabw). B) Anteil reagierender Zellen nach Capsaicin Zugabe aus drei unabhängigen Experimenten. C) Tabellarische Zusammenfassung detektierter Calcium-Reaktionsmuster der untersuchten Zellen.

17,3% der BT-474-Zellen reagierten auf die Zugabe von Capsaicin-freiem Puffer mit einem Anstieg der Fluo-8-Fluoreszenzintensität, was möglicherweise auf einer mechanischen Stimulation von Ionenkanälen beruhen könnte.

**HCC1500:** In HCC1500-Zellen resultierte die Capsaicin-Zugabe in einem Anstieg der Fluo-8-Fluoreszenzintensität in 17,9-39,4% der untersuchten Zellen (Abb.48B). Der Hauptanteil der reagierenden Zellen zeigte eine direkte Calcium-Antwort (Abb.48A und C).

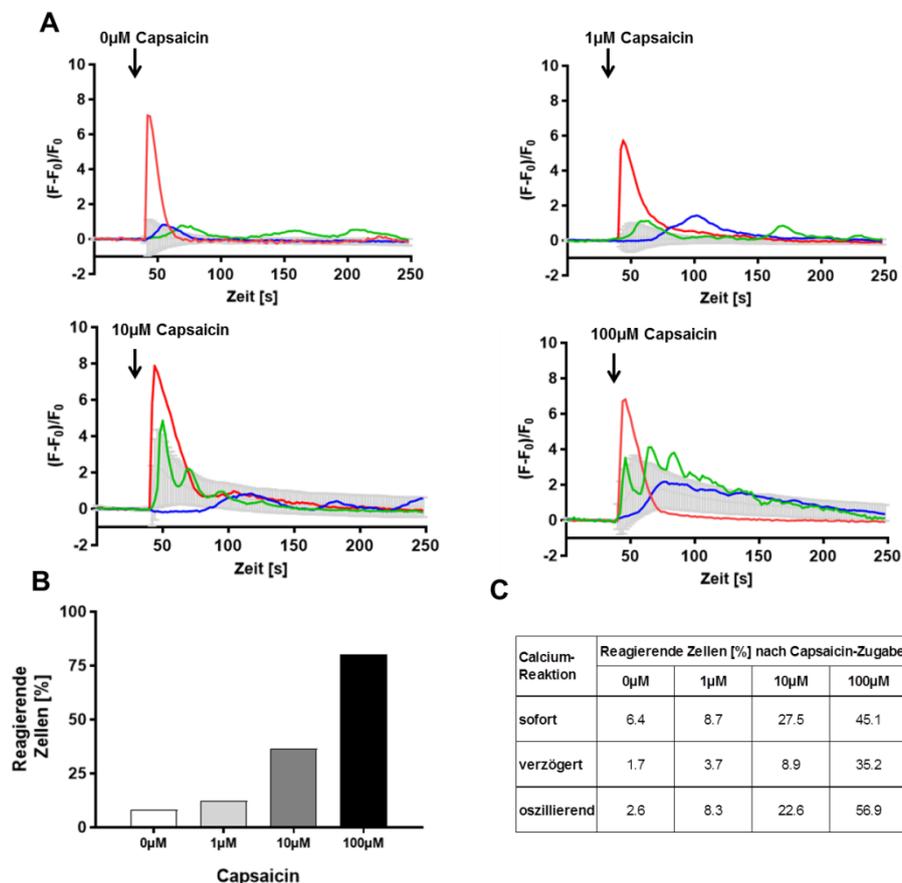


**Abbildung 48: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung der Luminal B HCC1500-Brustkrebszelllinie nach Capsaicin-Zugabe.** Es wurden 160.000 Zellen pro 35mm Schale ausgesät. Nach 48h wurde die Fluo-8-Fluoreszenzintensität fluoreszenzmikroskopisch vor und nach der Zugabe von Capsaicin gemessen. A) Repräsentative Einzelzellmessungen (rot, blau, grün) und die mittlere Fluoreszenzintensität der Population (grau, MW + Stabw). B) Anteil reagierender Zellen nach Capsaicin Zugabe aus drei unabhängigen Experimenten. C) Tabellarische Zusammenfassung detektierter Calcium-Reaktionsmuster der untersuchten Zellen.

40,8% der HCC1500-Zellen reagierten auf die Zugabe von Capsaicin-freiem Puffer mit einem Anstieg der Fluo-8-Fluoreszenzintensität, was möglicherweise auf einer mechanischen Stimulation von Ionenkanälen beruhen könnte.

### 3.10.1.3 Analyse der $[Ca^{2+}]_i$ in Zelllinien des *HER2-enriched* Subtyps (SkBr3; MDA-MB436)

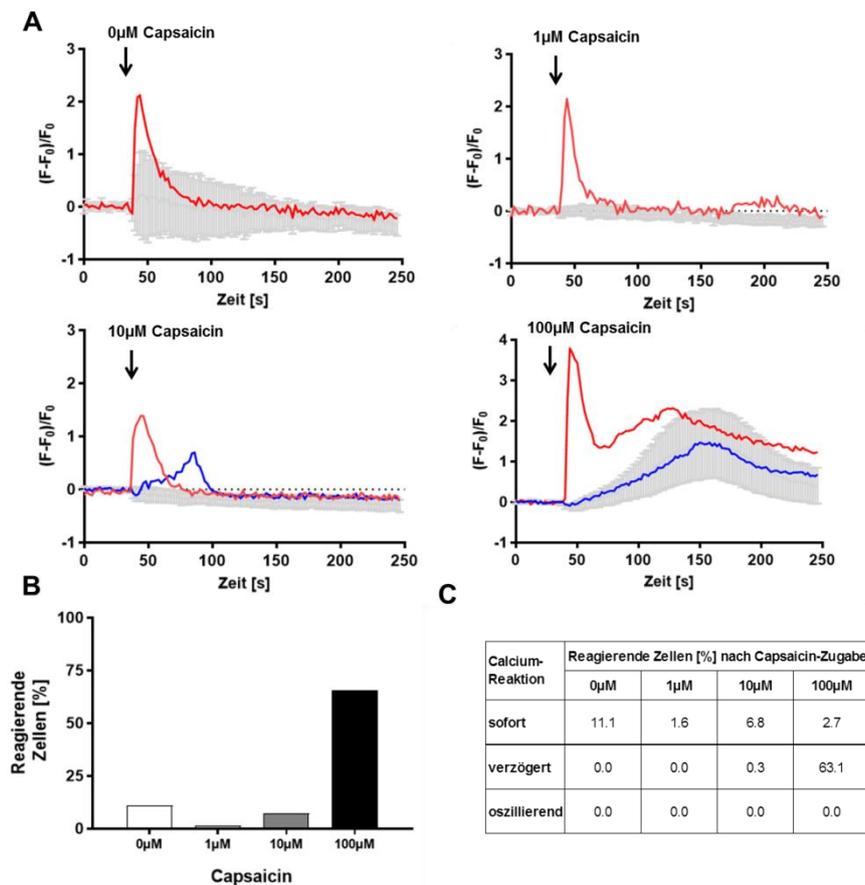
**SkBr3:** In SkBr3-Zellen resultierte die Capsaicin-Zugabe in einem Anstieg der Fluo-8-Fluoreszenzintensität in 12,4 - 80,2% der untersuchten Zellen (Abb.49B).



**Abbildung 49: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung der *HER2-enriched* SkBr3-Brustkrebszelllinie nach Capsaicin-Zugabe.** Es wurden 160.000 Zellen pro 35mm Schale ausgesät. Nach 48h wurde die Fluo-8-Fluoreszenzintensität fluoreszenzmikroskopisch vor und nach der Zugabe von Capsaicin gemessen. A) Repräsentative Einzelzellmessungen (rot, blau, grün) und die mittlere Fluoreszenzintensität der Population (grau, MW + Stabw.). B) Anteil reagierender Zellen nach Capsaicin Zugabe aus drei unabhängigen Experimenten. C) Tabellarische Zusammenfassung detektierter Calcium-Reaktionsmuster der untersuchten Zellen.

Bei Capsaicin-Konzentrationen von 10µM bzw. 100µM zeigten die  $Ca^{2+}$ -Oszillationen eine höhere Frequenz als bei 1µM (Abb. 49A).

**MDA-MB-436:** In MDA-MB-436-Zellen resultierte die Capsaicin-Zugabe in einem Anstieg der Fluo-8-Fluoreszenzintensität in 5,2-65,8% der untersuchten Zellen (Abb.50B). 1,6-6,8% der reagierenden Zellen zeigten eine sofortige Calcium-Antwort nach Capsaicin-Zugabe (Abb.50C).

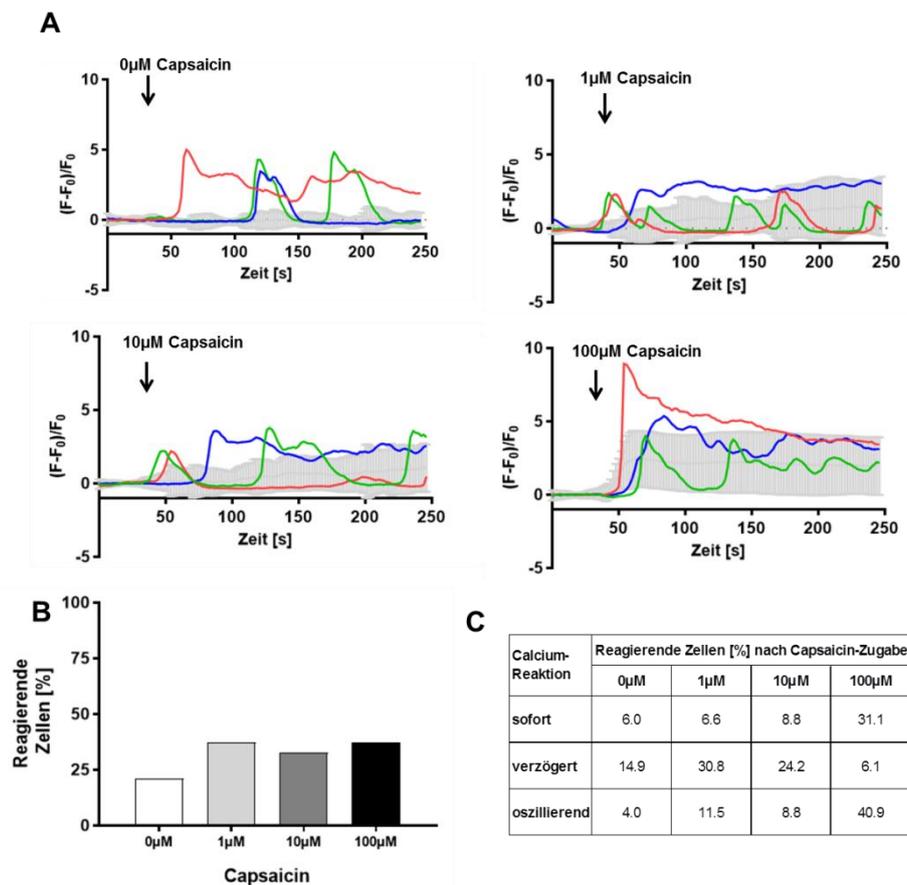


**Abbildung 50: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung der *HER2-enriched* MDA-MB-436-Brustkrebszelllinie nach Capsaicin-Zugabe.** Es wurden 160.000 Zellen pro 35mm Schale ausgesät. Nach 48h wurde die Fluo-8-Fluoreszenzintensität fluoreszenzmikroskopisch vor und nach der Zugabe von Capsaicin gemessen. A) Repräsentative Einzelzellmessungen (rot, blau, grün) und die mittlere Fluoreszenzintensität der Population (grau, MW + Stabw). B) Anteil reagierender Zellen nach Capsaicin Zugabe aus drei unabhängigen Experimenten. C) Tabellarische Zusammenfassung detektierter Calcium-Reaktionsmuster der untersuchten Zellen.

Zellen mit einer verzögerten Calcium-Reaktion wurden nach Stimulierung mit 10µM und 100µM detektiert. Die Stimulierung mit 100µM Capsaicin führte fast ausschließlich zur verzögerten Calcium-Reaktion in den reagierenden Zellen (63,1%) (Abb.50C).

### 3.10.1.4 Analyse der $[Ca^{2+}]_i$ in Zelllinien des *Basal-like* Subtyps (MDA-MB-468; HCC38)

**MDA-MB-468:** In MDA-MB-468-Zellen resultierte die Capsaicin-Zugabe in einem Anstieg der Fluo-8-Fluoreszenzintensität in 32,9-37,4% der untersuchten Zellen (Abb.51B). Reaktionsmuster aller drei Kategorien, sofort, verzögert und oszillierend, wurden dabei detektiert (Abb.51A).

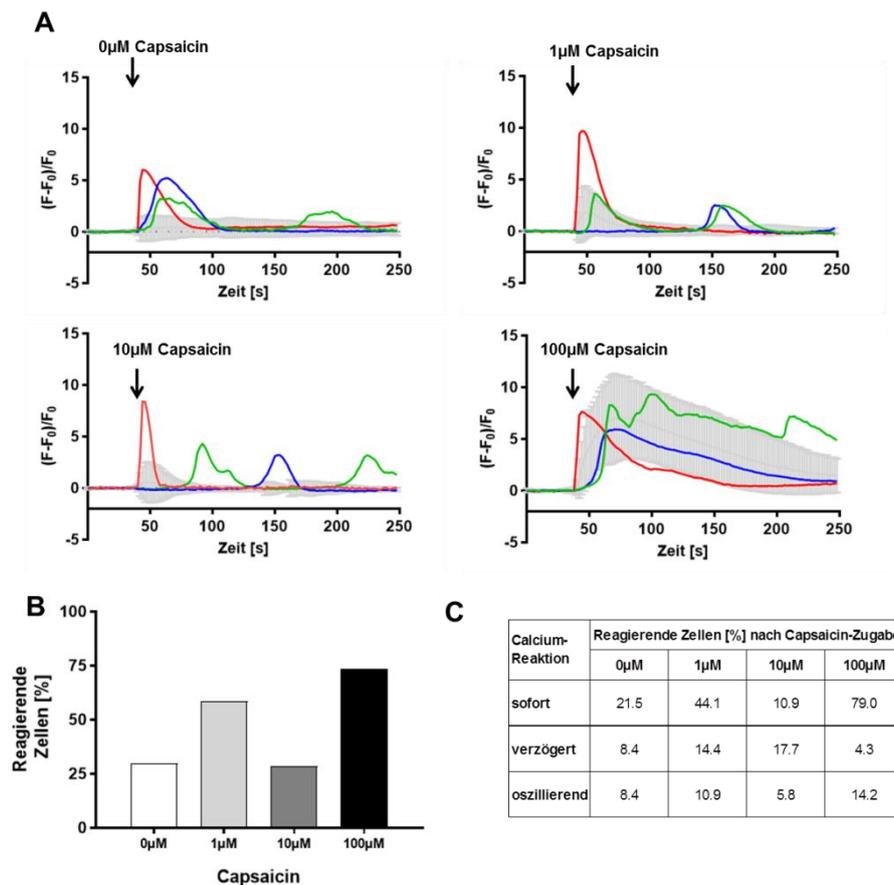


**Abbildung 51: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung der *Basal-like* MDA-MB-468-Brustkrebszelllinie nach Capsaicin-Zugabe.** Es wurden 160.000 Zellen pro 35mm Schale ausgesät. Nach 48h wurde die Fluo-8-Fluoreszenzintensität fluoreszenzmikroskopisch vor und nach der Zugabe von Capsaicin gemessen. A) Repräsentative Einzelzellmessungen (rot, blau, grün) und die mittlere Fluoreszenzintensität der Population (grau, MW + Stabw). B) Anteil reagierender Zellen nach Capsaicin Zugabe aus drei unabhängigen Experimenten. C) Tabellarische Zusammenfassung detektierter Calcium-Reaktionsmuster der untersuchten Zellen.

Bei Zugabe von 100μM Capsaicin wurden die höchsten relativen Änderungen der Fluo-8-Intensität sowie eine höhere Frequenz der  $Ca^{2+}$ -Oszillationen im Vergleich zur Zugabe von geringeren Capsaicin-Konzentrationen detektiert (Abb.51A). 21% der MDA-MB-468-Zellen reagierten auf die Zugabe von Capsaicin-freiem Puffer mit

einem Anstieg der Fluo-8-Fluoreszenzintensität, was möglicherweise auf einer mechanischen Stimulation von Ionenkanälen beruhen könnte.

**HCC38:** In HCC38-Zellen resultierte die Capsaicin-Zugabe in einem Anstieg der Fluo-8-Fluoreszenzintensität in 28,7-73,7% der untersuchten Zellen (Abb.52B). Reaktionsmuster aller drei Kategorien, sofort, verzögert und oszillierend, wurden dabei detektiert (Abb.52A).



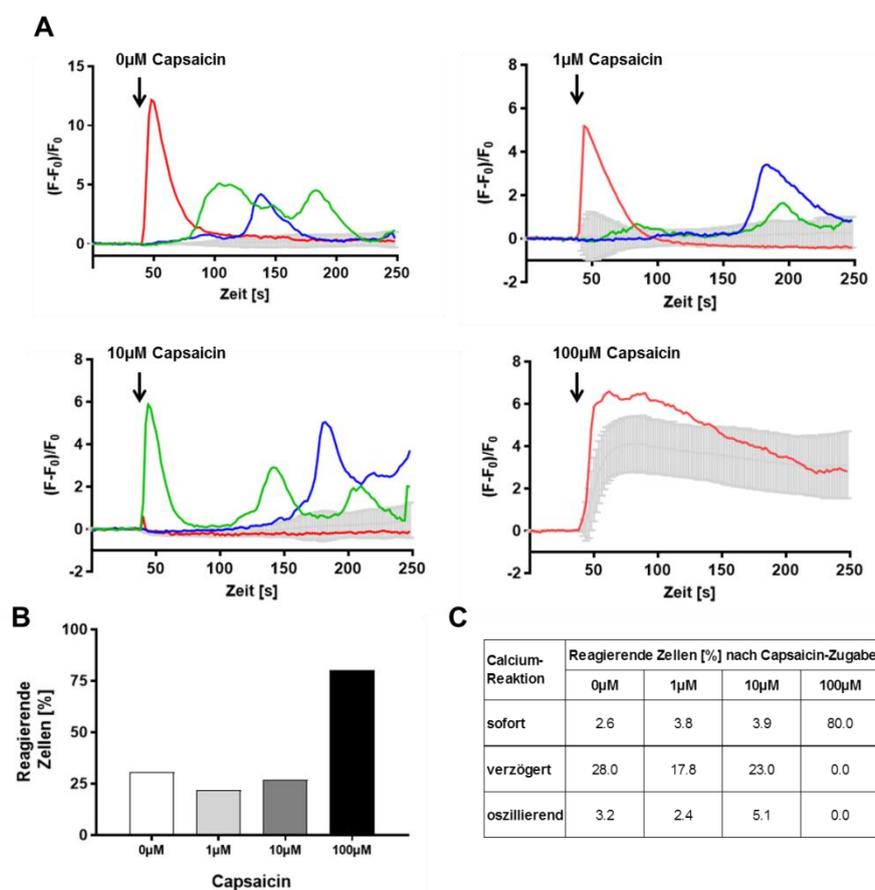
**Abbildung 52: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung der *Basal-like* HCC38-Brustkrebszelllinie nach Capsaicin-Zugabe.** Es wurden 160.000 Zellen pro 35mm Schale ausgesät. Nach 48h wurde die Fluo-8-Fluoreszenzintensität fluoreszenzmikroskopisch vor und nach der Zugabe von Capsaicin gemessen. A) Repräsentative Einzelzellmessungen (rot, blau, grün) und die mittlere Fluoreszenzintensität der Population (grau, MW + Stabw). B) Anteil reagierender Zellen nach Capsaicin Zugabe aus drei unabhängigen Experimenten. C) Tabellarische Zusammenfassung detektierter Calcium-Reaktionsmuster der untersuchten Zellen.

Nach einer Zugabe von 100µM Capsaicin wurden die höchsten relativen Änderungen der Fluo-8-Intensität detektiert (Abb.52A).  $Ca^{2+}$ -Oszillationen wurde nur in 5,8 - 14,2% der untersuchten Zellen detektiert. 29% der HCC38-Zellen reagierten auf die Zugabe von Capsaicin-freiem Puffer mit einem Anstieg der Fluo-8-

Fluoreszenzintensität, was möglicherweise auf einer mechanischen Stimulation von Ionenkanälen beruhen könnte.

### 3.10.1.5 Analyse der $[Ca^{2+}]_i$ in Zelllinien des *Claudin-low* Subtyps (MDA-MB-231)

**MDA-MB-231:** In MDA-MB-231-Zellen resultierte die Capsaicin-Zugabe in einem Anstieg der Fluo-8-Fluoreszenzintensität in 21,7-80% der untersuchten Zellen (Abb.53B). Reaktionsmuster aller drei Kategorien, sofort, verzögert und oszillierend, wurden nach Zugabe von 0 $\mu$ M, 1 $\mu$ M und 10 $\mu$ M Capsaicin detektiert (Abb.53A).



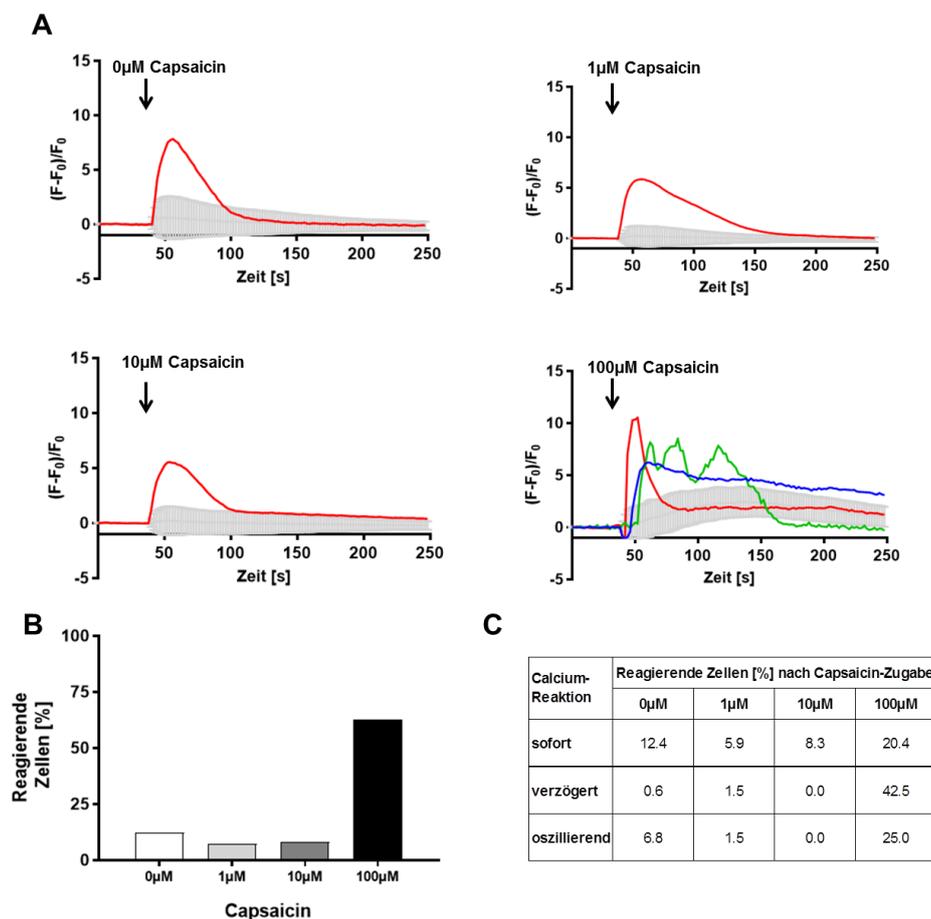
**Abbildung 53: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung der *Claudin-low* MDA-MB-231-Brustkrebszelllinie nach Capsaicin-Zugabe.** Es wurden 160.000 Zellen pro 35mm Schale ausgesät. Nach 48h wurde die Fluo-8-Fluoreszenzintensität fluoreszenzmikroskopisch vor und nach der Zugabe von Capsaicin gemessen. A) Repräsentative Einzelzellmessungen (rot, blau, grün) und die mittlere Fluoreszenzintensität der Population (grau, MW + Stabw). B) Anteil reagierender Zellen nach Capsaicin Zugabe aus drei unabhängigen Experimenten. C) Tabellarische Zusammenfassung detektierter Calcium-Reaktionsmuster der untersuchten Zellen.

Eine Stimulierung mit 100 $\mu$ M Capsaicin führte zum sofortigen Anstieg der Fluo-8-Fluoreszenzintensität (Abb. 53A). 30,7% der MDA-MB-231-Zellen reagierten auf die

Zugabe von Capsaicin-freiem Puffer mit einem Anstieg der Fluo-8-Fluoreszenzintensität, was möglicherweise auf einer mechanischen Stimulation von Ionenkanälen beruhen könnte.

### 3.10.1.6 Analyse der $[Ca^{2+}]_i$ in nicht-malignen Brustepithel-Zelllinien (MCF12A; MCF10A)

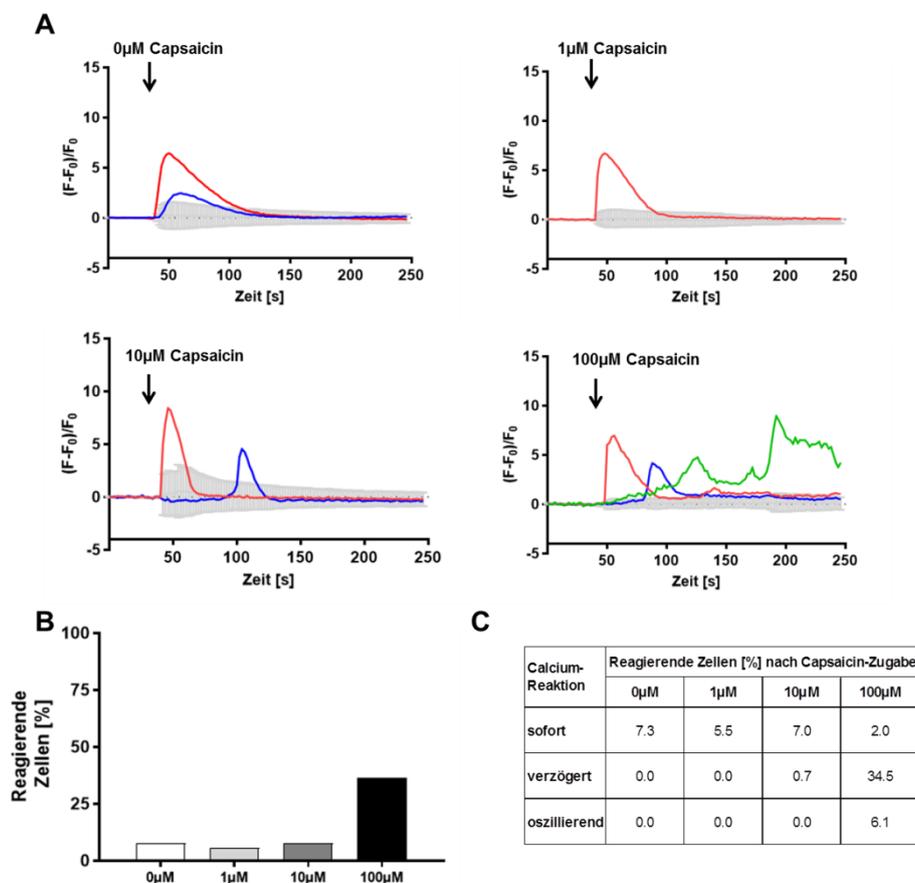
**MCF12A:** In MCF12A-Zellen resultierte die Capsaicin-Zugabe in einem Anstieg der Fluo-8-Fluoreszenzintensität in 7,4-62,9% der untersuchten Zellen (Abb.54B). Reaktionsmuster aller drei Kategorien, sofort, verzögert und oszillierend, wurden nur nach Zugabe von 100 $\mu$ M Capsaicin detektiert (Abb.54A).



**Abbildung 54: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der  $[Ca^{2+}]_i$  –Änderung der MCF12A-Brustzelllinie nach Capsaicin-Zugabe.** Es wurden 160.000 Zellen pro 35mm Schale ausgesät. Nach 48h wurde die Fluo-8-Fluoreszenzintensität fluoreszenzmikroskopisch vor und nach der Zugabe von Capsaicin gemessen. A) Repräsentative Einzelzellmessungen (rot, blau, grün) und die mittlere Fluoreszenzintensität der Population (grau, MW + Stabw). B) Anteil reagierender Zellen nach Capsaicin Zugabe aus drei unabhängigen Experimenten. C) Tabellarische Zusammenfassung detektierter Calcium-Reaktionsmuster der untersuchten Zellen.

12,4% der MCF12A-Zellen reagierten auf die Zugabe von Capsaicin-freiem Puffer mit einem Anstieg der Fluo-8-Fluoreszenzintensität, was möglicherweise auf einer mechanischen Stimulation von Ionenkanälen beruhen könnte.

**MCF10A:** In MCF10A-Zellen resultierte die Capsaicin-Zugabe in einem Anstieg der Fluo-8 Fluoreszenzintensität in 5,5-36,5% der untersuchten Zellen (Abb.55B). Reaktionsmuster aller drei Kategorien, sofort, verzögert und oszillierend, wurden nach Zugabe von 100 $\mu$ M Capsaicin detektiert (Abb.55A).



**Abbildung 55: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der  $[Ca^{2+}]_i$ -Änderung der MCF10A-Brustzelllinie nach Capsaicin-Zugabe.** Es wurden 160.000 Zellen pro 35mm Schale ausgesät. Nach 48h wurde die Fluo-8-Fluoreszenzintensität fluoreszenzmikroskopisch vor und nach der Zugabe von Capsaicin gemessen. A) Repräsentative Einzelzellmessungen (rot, blau, grün) und die mittlere Fluoreszenzintensität der Population (grau, MW + Stabw). B) Anteil reagierender Zellen nach Capsaicin Zugabe aus drei unabhängigen Experimenten. C) Tabellarische Zusammenfassung detektierter Calcium-Reaktionsmuster der untersuchten Zellen.

Nach einer Zugabe von 0 $\mu$ M und 10 $\mu$ M Capsaicin wurden sofortige und verzögerte Calcium-Reaktionsmuster detektiert. 7,3% der MCF10A-Zellen reagierten auf die Zugabe von Capsaicin-freiem Puffer mit einem Anstieg der Fluo-8-

Fluoreszenzintensität, was möglicherweise auf einer mechanischen Stimulation von Ionenkanälen beruhen könnte.

Zusammenfassend wurde in allen Brustkrebszelllinien als auch in den Brustepithelzelllinien Calcium-Antworten nach Aktivierung des TRPV1-Ionenkanals mit Capsaicin festgestellt. Es reagierten allerdings nie alle Zellen der jeweiligen Zelllinie.

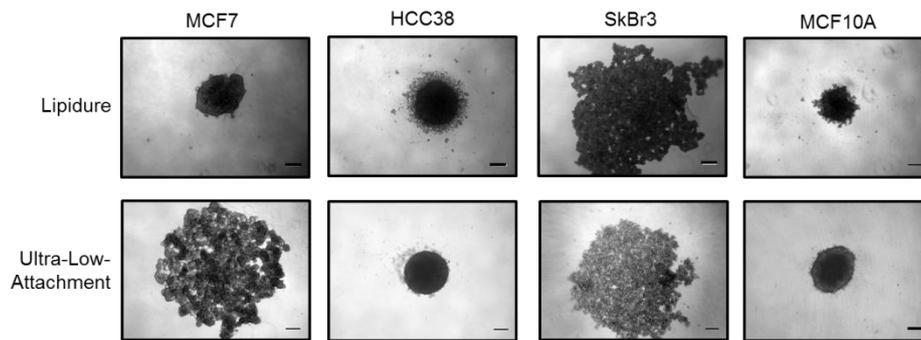
In den Zelllinien wurden verschiedene Calcium-Signalformen mit transientem, biphasischem und oszillierendem Signalverlauf beobachtet. In den Einzelzellmessungen zeigten Zellen entweder keinen, einen sofortigen oder einen verzögerten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ . Anhand der Resultate konnte keine spezifische Signatur für die einzelnen Subtypen der Brustkrebszelllinien identifiziert werden.

### **3.10.2 Herstellung von 3D-Sphäroiden aus Brustkrebszelllinien**

Drei Brustkrebszelllinien, die nach Capsaicin-Stimulierung einen deutlichen Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration sowie  $Ca^{2+}$ -Oszillationen zeigten, wurden für die Herstellung von 3D-Sphäroiden ausgewählt (MCF7, SkBr3, HCC38). Als Kontrolle diente die nicht-maligne Brustepithelzelllinie MCF10A. Die Herstellung der Sphäroide erfolgte in Mikrotiterplatten mit unterschiedlichen, zellabweisenden Oberflächen (Lipidure und ULA) (Abb. 56).

Die Inkubation der Zelllinien in den Mikrotiterplatten führte generell zur Ausbildung von Zellaggregaten. Kompakte runde Sphäroide mit einem SI  $>0,9$  bildeten HCC38-Zellen. Im Gegensatz dazu bildeten SkBr3-Zellen lockere Zellaggregate, unabhängig von der Beschichtung der Kulturgefäße. Kompakte Sphäroide aus MCF7-Zellen konnte nur in den Lipidure-beschichteten Mikrotiterplatten generiert werden. Mit MCF10A-Zellen wurden kompakte Sphäroide, unabhängig von der unterschiedlichen Beschichtung der Mikrotiterplatten, erhalten.

Zusammenfassend wurde die Generierung von 3D-Sphäroiden mit den Brustkrebszellen verschiedener Subtypen, sowie der nicht-karzinogenen Zelllinie, nachgewiesen. Für die nachfolgenden Experimente wurden ULA-Platten zur Herstellung der Sphäroide verwendet, da die Lipidure-Platten nicht mehr am Markt verfügbar waren.



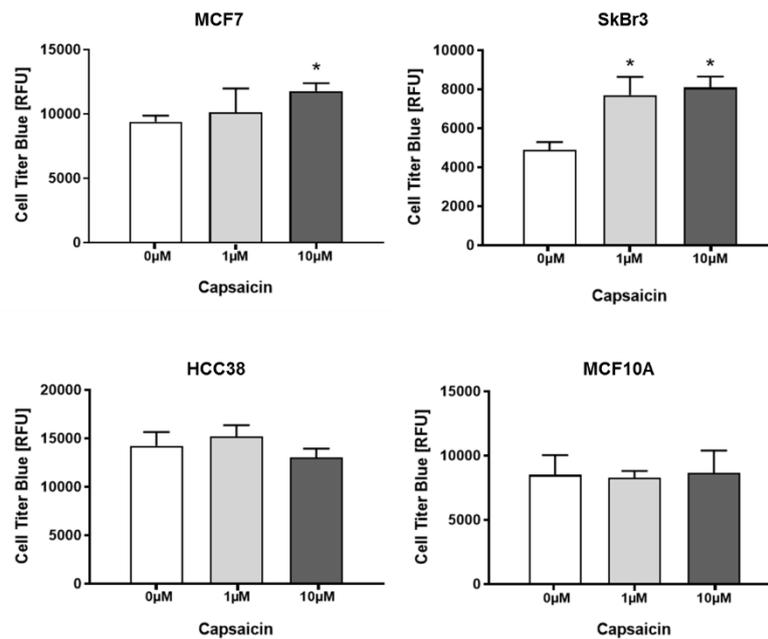
Lipidure					
Linie	Subtyp	Fläche [ $\mu\text{m}^2$ ]	Durchmesser [ $\mu\text{m}$ ]	Umfang [ $\mu\text{m}$ ]	SI
MCF7	Luminal A	141160 +/- 56614	399,0 +/- 83,6	1774,3 +/- 587,6	0,73 +/- 0,1
HCC38	Basal-like	67166 +/- 6842	279,7 +/- 14,9	951,6 +/- 50,4	0,92 +/- 0,05
SkBr3	Her2-enriched	593260 +/- 95353	832,3 +/- 66,5	4268,4 +/- 425	0,61 +/- 0,08
MCF10A	Non-cancer	58635 +/- 4714	262,2 +/- 10,6	1029,9 +/- 105	0,80 +/- 0,06

Ultra-Low-Attachment					
Linie	Subtyp	Fläche [ $\mu\text{m}^2$ ]	Durchmesser [ $\mu\text{m}$ ]	Umfang [ $\mu\text{m}$ ]	SI
MCF7	Luminal A	395836 +/- 100358	677,3 +/- 80,9	2835,9 +/- 457,7	0,75 +/- 0,06
HCC38	Basal-like	60853 +/- 10266	266,6 +/- 22,1	900,1 +/- 84,1	0,93 +/- 0,02
SkBr3	Her2-enriched	561225 +/- 174473	802,8 +/- 125,1	3047,3 +/- 472,6	0,83 +/- 0,06
MCF10A	Non-cancer	88639 +/- 11283	327,4 +/- 26,9	1267,4 +/- 211	0,82 +/- 0,09

**Abbildung 56: Mikroskopische Analyse der generierten 3D-Sphäroide.** Es wurden 10.000 Zellen pro Well einer zellabweisenden U-Bottom-96-Well-Mikrotiterplatte (Lipidure oder Ultra-Low-Attachment (ULA)) ausgesät und 48h kultiviert. A) Mikroskopische Überprüfung der generierten Sphäroide. B) Analyse der Sphäroid-Fläche, -Durchmesser, -Umfang und des Sphericity-Index (SI) von 11-17 Sphäroiden mit dem Programm AnaVisp.

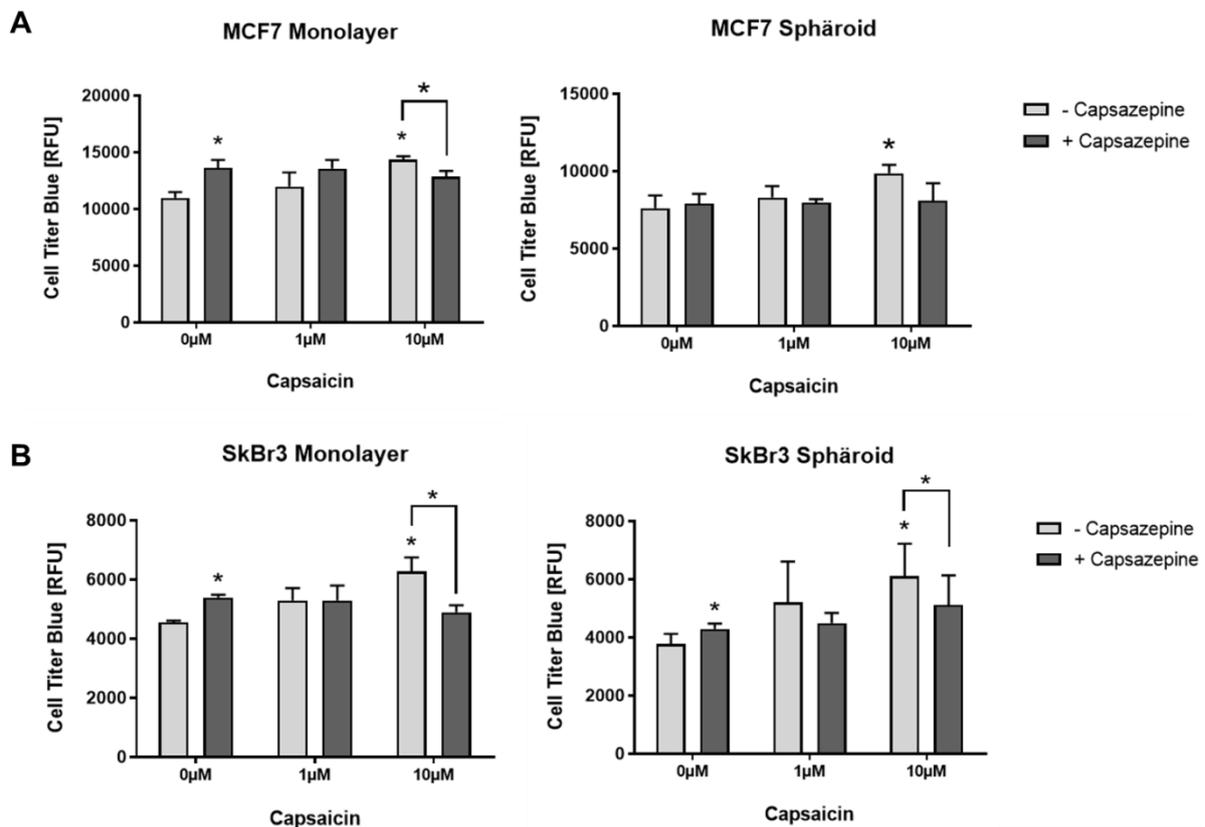
### 3.10.2.1 Einfluss der Capsaicin-vermittelten TRPV1-Aktivierung auf die Viabilität der 3D Sphäroide

Der Capsaicin-vermittelte Einfluss auf die Zellviabilität wurde zunächst in Monolayerkulturen der Zelllinien MCF7 (*Luminal A*), SkBr3 (*HER2-enriched*), HCC38 (*Basal-like*) und der nicht-malignen Brustepithelzelllinie MCF10A untersucht (Abb. 57).



**Abbildung 57: Einfluss von 1µM und 10µM Capsaicin auf die Zellviabilität der getesteten Zelllinien.** 10.000 Zellen wurden pro Well in eine 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät. Nach 24h wurden 0µM, 1µM und 10µM Capsaicin zugegeben. Nach weiteren 24h wurde ein Cell Titer Blue Viabilitätsassay durchgeführt. Gezeigt sind repräsentativ die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. \*P<0,05

Bei den Brustkrebszelllinien MCF7 und SkBr3 wurde nach 24-stündiger Behandlung mit Capsaicin eine signifikante Erhöhung der Viabilität gemessen (Abb.57). Dagegen konnte kein Einfluss der Capsaicin-Behandlung auf die Viabilität der Brustkrebszelllinie HCC38 und der Brustepithel-Zelllinie MCF10A im Beobachtungszeitraum festgestellt werden. Für eine vergleichende Analyse unter 3D-Zellkulturbedingungen wurde die Viabilität von 3D-Sphäroiden der Zelllinien SkBr3 und MCF7 nach Capsaicin-Behandlung untersucht. Zusätzlich wurden die Zellen bzw. die 3D-Sphäroide mit dem TRPV1-Antagonisten Capsazepine behandelt (Abb.58).



**Abbildung 58: Einfluss von 1µM und 10µM Capsaicin auf die Viabilität in An- und Abwesenheit von Capsazepine in 2D und 3D-Zellkultur.** 10.000 Zellen (A SkBr3; B: MCF7) wurden pro Well in eine 96-Well-Mikrotiterplatte bzw. 96-Well-ULA-Platte ausgesät. Nach 24h wurden 0µM, 1µM und 10µM Capsaicin zugegeben, sowie einem Teil der Wells zusätzlich 3µM Capsazepine. Nach 24h wurde ein Cell Titer Blue Viabilitätsassay durchgeführt. Gezeigt sind repräsentativ die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. \*P<0,05

Sowohl im Monolayer als auch in 3D-Sphäroiden der Zelllinie MCF-7 konnte eine Erhöhung der Viabilität nach Behandlung mit 10µM Capsaicin gemessen werden. Bei gleichzeitiger Zugabe von 3µM Capsazepine wird dieser Effekt aufgehoben. Im Monolayer ohne Behandlung mit Capsaicin bewirkt die Capsazepine-Zugabe eine signifikante Erhöhung der Viabilität. Dieser Effekt ist in den 3D-Sphäroiden nicht feststellbar. Auch in den Monolayer-Zellen und den 3D-Sphäroiden der SkBr3-Zelllinie wurde eine Erhöhung der Viabilität unter 10µM Capsaicin-Behandlung als auch die Aufhebung dieses Effektes durch 3µM Capsazepine gemessen. Im Gegensatz zu den MCF-7 Zellen wurde in den SkBr3-Zellen sowohl im Monolayer als auch im 3D-Sphäroid eine signifikante Erhöhung der Viabilität durch alleinige Zugabe von Capsazepine (ohne Capsaicin) ermittelt (Abb.58).

Zusammengefasst konnte nachgewiesen werden, dass eine 24-stündige Behandlung mit dem TRPV1-Agonisten Capsaicin in den Brustkrebszellen MCF7 und SkBr3 eine

Erhöhung der Viabilität in Monolayer-Kulturen und 3D-Sphäroiden bewirkt. Die Kompensation dieses Effektes durch Zugabe des TRPV1-Antagonisten zeigt, dass die Erhöhung der Zellviabilität in den MCF7- als auch den SkBr3-Zellen durch Aktivierung des TRPV1-Ionenkanals vermittelt ist.

## 4. DISKUSSION

Das TRPV1-Transmembranprotein ist ein kationenselektiver und polymodaler Ionenkanal. Der TRPV1-Ionenkanal ist vor allem als Schmerz- und Hitzerezeptor in sensorischen Nervenendigungen bekannt, wird aber auch in nicht-neuronalen Geweben exprimiert. Fehlfunktionen oder eine gestörte Regulation des Ionenkanals scheinen neben den bekannten TRP-Ionenkanalerkrankungen (TRP-channelopathies; (Nilius & Owsianik, 2010) häufig mit weiteren Krankheiten, wie Arthritis, Atemwegserkrankungen, Blasenfunktionsstörungen, Diabetes, entzündliche Darmerkrankungen und Tumoren assoziiert zu sein. Aufgrund seiner vielfältigen Funktionen in Physiologie und Pathophysiologie stellt der TRPV1-Ionenkanal ein attraktives pharmakologisches Zielmolekül für die Wirkstoffentwicklung dar. Neben Rezeptoren und Enzymen gehören Ionenkanäle heute zu der drittgrößten Zielgruppe für die Entwicklung pharmakologischer Wirkstoffe. Zu den Vorteilen, die Ionenkanäle als Therapieziele zu nutzen, zählen ihre leichte Zugänglichkeit, die Existenz in der Natur vorkommender selektiver Blocker, die als Modellstrukturen für Therapeutika dienen können, und die Möglichkeit, ihre Funktion auf der Ebene eines einzelnen Moleküls und in Echtzeit über elektrophysiologische Verfahren messen zu können. Für den TRPV1-Ionenkanal wurden bereits Agonisten und Antagonisten entwickelt, die jedoch aufgrund von Nebenwirkungen klinisch nicht einsetzbar sind. Eine erfolgreiche Entwicklung TRPV1-spezifischer therapeutischer Strategien bedingt daher die Identifizierung neuer Wirkstoffe. Mit der vorliegenden Dissertation wurde diese Fragestellung bearbeitet. Es wurden zellbasierte Testsysteme entwickelt, mit denen pharmakologische Aktivitäten von neuen TRPV1-spezifischen Substanzen direkt im zellulären Kontext analysiert werden können. Dadurch soll eine zielgerichtete Identifizierung von neuen TRPV1-Wirkstoffen als auch eine Einschätzung möglicher Nebenwirkungen noch in der Vorklinik erreicht werden.

#### **4.1 CHO-Zellmodell mit regulierter Expression des humanen TRPV1**

Die CHO-K1-Zelllinie aus Hamster ist eine bevorzugte Säugetierzelllinie zur Herstellung rekombinanter Proteine und zur Identifizierung neuer pharmakologischer Wirkstoffe in zellbasierten HTS-Verfahren (Lai *et al.*, 2013; Sittampalam *et al.*, 2004). Die in CHO-Zellen erzeugten *N*-Glykanstrukturen sind den komplexen *N*-Glykosylierungsmustern humaner Proteine sehr ähnlich, so dass humane Glykoproteine in CHO-Zellen produziert werden können (Durocher & Butler, 2009).

Ein weiterer Vorteil für die Entwicklung der zellulären Testsysteme in CHO-Zellen beruhte darin, dass die CHO-K1-Zellen keinen endogenen TRPV1-Ionenkanal exprimieren, so dass in den etablierten Zellmodellen TRPV1-vermittelte zelluläre Antworten auf den heterolog exprimierten, humanen TRPV1-Ionenkanal (hTRPV1) zurückgeführt werden konnten (Sittampalam *et al.*, 2004; Zicha *et al.*, 2013).

Durch die Verwendung eines regulierbaren Expressionssystems konnten zytotoxische Effekte vermieden werden, die bei einer stabilen, konstitutiven TRPV1-Überexpression häufig auftreten (Szallasi *et al.*, 1999; Olah *et al.*, 2001). Die Regulation des in dieser Arbeit eingesetzten Tet-On 3G-Expressionssystems erfolgte mit dem Tetrazyklin-Derivat Doxyzyklin als Induktor-Molekül. Da bereits Konzentrationen von 500-1000ng/ml Doxyzyklin einen Einfluss auf den Zellmetabolismus und die Proliferationsrate zeigten (Moullan *et al.*, 2015; Ahler *et al.*, 2013), werden Tetrazyklin-regulierte Expressionssysteme kontrovers diskutiert. Im Tet-Off-Expressionssystem wurden die Zellen mit relativ hohen Doxyzyklin-Konzentration von beispielsweise 1µg/ml in MCF7-Tet-Off-hTRPV1-Zellen (Wu *et al.*, 2014) oder 1mg/ml in CHO-Tet-Off-rTRPV1-Zellen (Toth & Wang *et al.*, 2005) kultiviert, um eine Basalexpression des rekombinanten Gens so gering wie möglich zu halten. Daher wurde in dieser Arbeit das Tet-On 3G-Expressionssystem eingesetzt, mit dem im Vergleich zum vorhergehend entwickelten Tet-On-Advanced System eine 100-150-fach höhere Expression von Transgenen bei geringen Doxyzyklin-Konzentrationen (5-10ng/ml) erreicht werden kann (Clontech; (Zhou *et al.*, 2006; Loew *et al.*, 2010). Dementsprechend konnte in der entwickelten CHO-<sup>hTRPV1</sup>-Zelllinie die heterologe Expression des TRPV1 mit geringen Doxyzyklin-Konzentrationen von bereits 10ng/ml induziert werden. Die durchgeführte Propidiumiodid (PI)-Färbung zeigte, dass die gewählte Doxyzyklin-Konzentration keinen Einfluss auf die Viabilität der CHO-3G Parentallinie bewirkte (Abb. 28). Im

Gegensatz dazu nimmt die Viabilität der CHO<sup>-I-hTRPV1</sup>-Zelllinie bei einer Induktion mit 10ng/ml bzw. mit 100ng/ml Doxyzyklin und einer Induktionsdauer von 96h bzw. >72h ab, was aber durch die Expression des rekombinanten Fusionsproteins bedingt ist. Somit konnte für die etablierte CHO<sup>-I-hTRPV1</sup>-Zelllinie, die die Grundlage für das zelluläre Testsystem bildet, kein Einfluss des Induktors Doxyzyklin auf die Zellviabilität festgestellt werden.

Ein zweiter entscheidender Aspekt für die Wahl eines regulierbaren Expressionssystems beruht in der Möglichkeit, die Expressionshöhe des hTRPV1-mCherry-Fusionsproteins in den CHO<sup>-I-hTRPV1</sup>-Zellen in Abhängigkeit der Induktionskonzentration ( $EC_{50}$ :  $9,8 \pm 2$ ng/ml) und Induktionszeit zu variieren. Dies ermöglicht, pharmakologische Aktivitäten von Agonisten und Antagonisten in Abhängigkeit von unterschiedlichen TRPV1-Expressionshöhen zu analysieren. In Abwesenheit von Doxyzyklin konnte keine hTRPV1-mCherry-Expression in Einzelzellanalysen detektiert werden. Dies verdeutlicht, dass die TRPV1-Expression durch das Tet-On 3G-System im etablierten CHO-Zellmodell sehr genau reguliert werden kann und eine störende Basalexpression ohne Induktion nicht nachweisbar ist. Nicht-induzierte Zellen der entwickelten CHO<sup>-I-hTRPV1</sup>-Zelllinie eigneten sich daher ideal als Negativ-Kontrolle. Dies hatte den weiteren Vorteil, dass alle Analysen in der gleichen Zelllinie durchgeführt werden konnten und keine zusätzlichen Mock-Transfektanten generiert werden mussten. In den etablierten zellulären Testsystemen konnte durch die Regulierbarkeit der TRPV1-Expression eine sehr gute Standardisierung erreicht werden, was für den Einsatz in Hochdurchsatz-Screening-Verfahren einen entscheidenden Faktor für eine Reproduzierbarkeit der Daten darstellt.

Darüber hinaus erlaubt das regulierbare Expressionssystem, die Auswirkungen von unterschiedlichen TRPV1-Rezeptorzahlen und -dichten auf zelluläre Prozesse zu untersuchen. Veränderte Rezeptordichten können die Assemblierung der Rezeptoren und die Regulation des Zellzyklus beeinflussen. Beispielsweise kann eine hohe Rezeptordichte von c-erbB2 (HER-2) zu Homo- und Heterodimeren und einer Liganden-unabhängigen Zelltransformation führen (Olayioye *et al.*, 2000). In der Subfamilie der TRPV-Ionenkanäle besteht eine hohe Homologie zwischen den TRPV1-, TRPV2-, TRPV3- und TRPV4-Kanälen. Obwohl präferentiell homodimere

Kanäle gebildet werden, können heteromere Komplexe mit unterschiedlichen pharmakologischen Eigenschaften assemblieren (Cheng *et al.*, 2007; Zheng, 2013).

Durch die funktionelle Charakterisierung des TRPV1-Ionenkanals in den CHO-<sup>I</sup>-hTRPV1-Zellen konnte gezeigt werden, dass die pharmakologischen Eigenschaften des rekombinanten TRPV1-mCherry-Fusionsproteins vergleichbar mit endogen exprimierten TRPV1-Ionenkanälen sind. Der Nachweis der Expression von hTRPV1-mCherry im Western Blot zeigte eine Bande mit dem erwarteten Molekulargewicht von 122kDa als auch eine 131kDa große Bande, welche wahrscheinlich eine glykosylierte Form des Fusionsproteins darstellt. Die N-Glykosylierung des TRPV1-Proteins stellt eine wichtige Modifizierung für die durch Capsaicin ausgelöste Aktivierung und die Ionenpermeabilität des TRPV1-Ionenkanals dar (Veldhuis *et al.*, 2012). Eine spezifische Aktivierung des hTRPV1-mCherry-Ionenkanals mit dem Agonisten Capsaicin führte zu einer messbaren Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, was übereinstimmend für endogene als auch heterolog exprimierte TRPV1-Kanäle beschrieben wurde (Caterina *et al.*, 1997; Hayes *et al.*, 2000). Die Vorbehandlung der CHO-<sup>I</sup>-hTRPV1-Zellen mit dem kompetitiven Antagonisten Capsazepine inhibierte den durch Capsaicin induzierten Calciumeinstrom (Caterina *et al.*, 1997; Bevan *et al.*, 1992). Ein weiteres Merkmal endogener TRPV1-Ionenkanäle ist die Aktivierbarkeit durch Hitzestimulierung, welches ebenfalls im CHO-<sup>I</sup>-hTRPV1-Zellmodell nachgewiesen werden konnte (Caterina *et al.*, 1997; Hayes *et al.*, 2000) (Hayes *et al.*, 2000; Caterina *et al.*, 1997). Da bekannt ist, dass der C-Terminus maßgeblich an der durch Hitze induzierten Aktivierung des TRPV1 beteiligt ist, konnte damit gleichzeitig ein möglicher Einfluss der C-terminalen mCherry-Markierung des TRPV1-Ionenkanals auf die Hitzestimulierung ausgeschlossen werden. Zusammengefasst wurde nachgewiesen, dass der hTRPV1-mCherry-Ionenkanal die pharmakologischen Eigenschaften von in der Literatur beschriebenen endogenen als auch heterolog exprimierten TRPV1-Ionenkanälen widerspiegelt. Somit konnte gezeigt werden, dass der entwickelte TRPV1-spezifische zellbasierte Assay geeignet ist, um zur Identifizierung und Validierung neuer TRPV1-spezifischer Wirkstoffe eingesetzt zu werden.

Die Verwendung eines Fusionsproteins aus hTRPV1 mit einem C-terminalen mCherry-Fluoreszenztag ermöglichte die Überprüfung der subzellulären Lokalisation des heterolog exprimierten Ionenkanals als auch die Quantifizierung der Expression.

Allerdings können Fusionsproteine im Vergleich zum Zielprotein ohne Fusionsanteil eine andere subzelluläre Lokalisation einnehmen, was die Proteinfunktion beeinflussen kann. In den induzierten CHO-<sup>I-hTRPV1</sup>-Zellen wurde der membranständige Ionenkanal in der Plasmamembran sowie in Endomembranen, möglicherweise in der Membran des ER, detektiert, was in Übereinstimmung mit der Literatur ist (Gallego-Sandin *et al.*, 2009; Cheng *et al.*, 2007; Hellwig *et al.*, 2005). Eine Lokalisation für TRPV1 wird auch in Mitochondrien- (Miyake *et al.*, 2015) und in Golgi-Membranen beschrieben (Turner *et al.*, 2003) (Turner *et al.*, 2003). Durch weitere Untersuchungen mit ER-Membran- bzw. mitochondrial-lokalisierenden Farbstoffen könnte die hTRPV1-mCherry-Lokalisation in Endomembranen bestätigt werden. Die hier beobachtete Lokalisation von TRPV1 in der Kernmembran wurde ebenfalls von Gallego-Sandin *et al.*, für heterolog exprimierte TRPV1-Kanäle in der humanen Zelllinie HEK293 beobachtet.

Aufgrund der ermittelten Resultate aus der Charakterisierung des CHO-<sup>I-hTRPV1</sup>-Zellmodells in Verbindung mit der eingesetzten Messmethode zur Quantifizierung der  $[Ca^{2+}]_i$  konnte gezeigt werden, dass dieser TRPV1-spezifische Assay geeignet ist, um als zelluläres Testsystem für hochparallele Analyseverfahren weitergehend entwickelt zu werden.

#### **4.2 Entwicklung und Validierung des 2D-CHO-<sup>I-hTRPV1</sup>-Testsystems**

Die pharmakologischen Analysen mit Capsaicin und Capsazepine im entwickelten TRPV1-spezifischen CHO-<sup>I-hTRPV1</sup>-Zellmodell basierten im Wesentlichen auf Einzelzellanalysen im Fluoreszenzmikroskop. Dadurch konnte bereits zuverlässig nachgewiesen werden, dass sich dieser zellbasierte Assay für eine Unterscheidung von Wirkstoffkandidaten eignet. Allerdings funktioniert ein zunächst für Einzelzellanalysen entwickelter Assay nicht automatisch für ein Mikrotiterplatten (MTP)-basiertes Hochdurchsatz-Verfahren im Mikroplattenreader. Ein essentieller nächster Schritt bestand daher in der Validierung des CHO-<sup>I-hTRPV1</sup>-Zellassays im MTP-Format mit pharmakologischen Substanzen, die eine bekannte Wirkungsspezifität für den TRPV1-Ionenkanal aufweisen. Grundvoraussetzung für die Validierung im Hochdurchsatz-Format war zunächst die Optimierung verschiedener Parameter, wie beispielsweise Zelldichte, Induktionszeiten und konz-

entrationen von Doxyzyklin, Fluo-8-Konzentration und Fluo-8-Beladungszeit. Durch die Optimierung dieser Parameter konnte erreicht werden, dass sich der CHO-<sup>I</sup>-hTRPV1-Zellassay auch im MTP-Format für die Quantifizierung von  $[Ca^{2+}]_i$  nach pharmakologischer Modulation des TRPV1-Ionenkanals eignet. Die Validierung des zellulären CHO-<sup>I</sup>-hTRPV1-Testsystems erfolgte über die Analyse von Dosis-Wirkungs-Beziehungen mit jeweils fünf bekannten Agonisten und Antagonisten des TRPV1-Ionenkanals. Die ermittelten EC<sub>50</sub>- bzw. IC<sub>50</sub>-Potenzen wurden mit in der Literatur beschriebenen Werten verglichen (Tab. 17; 18).

**Tabelle 17: EC<sub>50</sub>-Potenzen von TRPV1-Agonisten im 2D-CHO-<sup>I</sup>-hTRPV1-Testsystem.**

\*MW ± Stabw; \*\*MW ± SF

Agonist	EC <sub>50</sub> [nM]	Hintergrund	Expression	Zellsystem	Messmethode	Referenz
Capsaicin	25,5 ± 6,2*	Human	heterolog	CHO- <sup>I</sup> -hTRPV1	Fluoreszenz-basierte Ca <sup>2+</sup> -Messung (Fluo-8)	diese Arbeit
	12,5 ± 3,0**	Human	heterolog	HEK293	Fluoreszenz-basierte Ca <sup>2+</sup> -Messung (Fluo-4)	Witte <i>et al.</i> , 2002
	38 ± 19*	Human	heterolog	CHO	<sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> Aufnahme Messung	Gavva <i>et al.</i> , 2004
	711	Ratte	heterolog	<i>Xenopus</i> Oozyt	Patch Clamp	Caterina <i>et al.</i> , 1997
	26 ± 8*	Human	heterolog	HEK293	Fluoreszenz-basierte Ca <sup>2+</sup> -Messung (Fluo-3)	Huang <i>et al.</i> , 2002
	129 ± 31**	Human	heterolog	CHO	Fluoreszenz-basierte Ca <sup>2+</sup> -Messung (Fura 2)	Phillips <i>et al.</i> , 2004
	77 ± 4**	Human	heterolog	HEK293	<sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> Aufnahme Messung	Kaszas <i>et al.</i> , 2012
	36,1 ± 6**	Human	heterolog	HEK293	Fluoreszenz-basierte Ca <sup>2+</sup> -Messung (Calcium-4)	Reilly <i>et al.</i> , 2012
	390 ± 50**	Ratte	heterolog	HEK293	Patch Clamp	Kim <i>et al.</i> , 2006
	1100 ± 190**	Ratte	endogen	DRG Neuronen	Patch Clamp	Kim <i>et al.</i> , 2006
	21,4 ± 4**	Ratte	heterolog	HEK293	Fluoreszenz-basierte Ca <sup>2+</sup> -Messung (Fluo-3)	Ralevic <i>et al.</i> , 2001
	27,6 ± 3**	Ratte	endogen	DRG Neuronen	Fluoreszenz-basierte Ca <sup>2+</sup> -Messung (Fluo-3)	Ralevic <i>et al.</i> , 2001
	29,7 ± 33,7*	Ratte	heterolog	HEK293	Fluoreszenz-basierte Ca <sup>2+</sup> -Messung (Fluo-4)	Schneider <i>et al.</i> , 2016

Resiniferatoxin	14,7 ± 4,9*	Human	heterolog	CHO- <sup>I-hTRPV1</sup>	Fluoreszenz-basierte Ca <sup>2+</sup> -Messung (Fluo-8)	diese Arbeit
	6,9 ± 1**	Human	heterolog	HEK-293	Fluoreszenz-basierte Ca <sup>2+</sup> -Messung (Fluo-3)	Witte <i>et al.</i> , 2002
	5 ± 2*	Human	heterolog	CHO	<sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> Aufnahme Messung	Gavva <i>et al.</i> , 2004
	29 ± 7**	Human	heterolog	CHO	Fluoreszenz-basierte Ca <sup>2+</sup> -Messung (Fura 2)	Phillips <i>et al.</i> , 2004
	3 ± 1*	Ratte	heterolog	CHO	<sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> Aufnahme Messung	Gavva <i>et al.</i> , 2004
	11,9 ± 5**	Ratte	endogen	DRG Neuron	Fluoreszenz-basierte Ca <sup>2+</sup> -Messung (Fluo-3)	Ralevic <i>et al.</i> , 2001
Olvanil	108,7 ± 42,7*	Human	heterolog	CHO- <sup>I-hTRPV1</sup>	Fluoreszenz-basierte Ca <sup>2+</sup> -Messung (Fluo-8)	diese Arbeit
	69,2 ± 10**	Human	heterolog	HEK-293	Fluoreszenz-basierte Ca <sup>2+</sup> -Messung (Fluo-3)	Witte <i>et al.</i> , 2002
	56 ± 21*	Human	heterolog	CHO	<sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> Aufnahme Messung	Gavva <i>et al.</i> , 2004
	33 ± 8**	Human	Heterolog	CHO	Fluoreszenz-basierte Ca <sup>2+</sup> -Messung (Fura 2)	Phillips <i>et al.</i> , 2004
	12 ± 5*	Ratte	heterolog	CHO	<sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> Aufnahme Messung	Gavva <i>et al.</i> , 2004
	46,8 ± 8**	Ratte	endogen	DRG	Fluoreszenz-basierte Ca <sup>2+</sup> -Messung (Fluo-3)	Ralevic <i>et al.</i> , 2001
NADA	2636 ± 779*	Human	Heterolog	CHO- <sup>I-hTRPV1</sup>	Fluoreszenz-basierte Ca <sup>2+</sup> -Messung (Fluo-8)	diese Arbeit
	1265 ± 378**	Human	heterolog	HEK293	Fluoreszenz-basierte Ca <sup>2+</sup> -Messung (Calcium-4)	Reilly <i>et al.</i> , 2012
	4500 ± 400*	Human	heterolog	CHO	<sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> Aufnahme Messung	Gavva <i>et al.</i> , 2004
	3480 ± 361*	Ratte	heterolog	CHO	<sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> Aufnahme Messung	Gavva <i>et al.</i> , 2004
	40 ± 6*	Ratte	heterolog	HEK293	Fluoreszenz-basierte Ca <sup>2+</sup> -Messung (Fluo-3)	Huang <i>et al.</i> , 2002
	794 ± 95*	Ratte	endogen	DRG Neuronen	Fluoreszenz-basierte Ca <sup>2+</sup> -Messung (Fura 2)	Huang <i>et al.</i> , 2002
	4480 ± 660**	Human	heterolog	HEK293	<sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> Aufnahme Messung	Kaszas <i>et al.</i> , 2012
NOD	10257 ± 4568*	Human	heterolog	CHO- <sup>I-hTRPV1</sup>	Fluoreszenz-basierte Ca <sup>2+</sup> -Messung (Fluo-8)	diese Arbeit
	7100 ± 800**	Ratte	heterolog	HEK293	Fluoreszenz-basierte Ca <sup>2+</sup> -Messung (Fura-2)	Pretze <i>et al.</i> , 2016

Ein direkter Vergleich der in dieser Arbeit ermittelten EC<sub>50</sub>-Werte für Agonisten des TRPV1-Kanals mit Literaturangaben ist allerdings nur bedingt möglich, da die EC<sub>50</sub>-Potenzen in Zellsystemen, die teilweise aus unterschiedlichen Gewebetypen und/oder verschiedenen Spezies stammen, ermittelt wurden. Darüber hinaus wurden unterschiedliche Messmethoden zur Ermittlung der EC<sub>50</sub>-Werte herangezogen. Bei den Zellsystemen mit heterolog exprimierten TRPV-Ionenkanälen wurden außerdem verschiedene Expressionssysteme eingesetzt, was ebenso zu einer Beeinflussung der EC<sub>50</sub>-Werte beitragen kann. Trotz dieser Unterschiede konnte bei einem Vergleich der EC<sub>50</sub>-Werte der Agonisten Capsaicin, Resiniferatoxin und Olvanil in den verschiedenen CHO-Zellsystemen eine gute Korrelation zu den in dieser Arbeit aufgezeigten EC<sub>50</sub>-Werten nachgewiesen werden. NADA wirkt im CHO<sup>-I-hTRPV1</sup>-Testsystem als schwacher Agonist mit einer sehr geringen Effizienz von 51,6%, was aber sehr gut mit Studien von NADA in *Xenopus* Oozyten mit heterolog exprimierten TRPV1, sowie in endogen exprimierten TRPV1 in Dorsalwurzel-Neuronen der Ratte korreliert (Premkumar *et al.*, 2004; Raisinghani *et al.*, 2005).

Die mit dem CHO<sup>-I-hTRPV1</sup>-Testsystem ermittelte Rangfolge der Agonist-Potenzen von RTX > Capsaicin > Olvanil > NADA > NOD stimmt mit den Literaturwerten weitgehend überein (Witte *et al.*, 2002; Smart *et al.*, 2001; Lam *et al.*, 2007; Gavva *et al.*, 2004; Pretze *et al.*, 2016). Für den Agonisten NOD sind bislang keine EC<sub>50</sub>-Potenzen für den humanen TRPV1-Ionenkanal veröffentlicht. Daher wurde für einen Vergleich der NOD-Wirksamkeit der EC<sub>50</sub>-Wert genutzt, der mit Hilfe des TRPV1-Ionenkanals der Ratte ermittelt wurde (Pretze *et al.*, 2016) (Pretze *et al.*, 2016). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch NOD eine Erhöhung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> durch Aktivierung eines heterolog exprimierten, humanen TRPV1-Ionenkanal resultiert.

Die in der Arbeit ermittelte Potenzrangfolge von Olvanil und Capsaicin wird in der Literatur nicht einheitlich beschrieben. In dem zellulären CHO<sup>-I-hTRPV1</sup>-Testsystem wurde eine niedrigere Potenz von Olvanil im Vergleich zu Capsaicin detektiert, was in Übereinstimmung mit den Daten von Witte *et al.*, 2002, Gavva *et al.*, 2004 und Lam *et al.*, 2007 ist. Smart und Kollegen detektierten eine höhere Potenz von Olvanil als Capsaicin in der humanen Zelllinie HEK293 mit rekombinanter Expression von hTRPV1 (Smart *et al.*, 2001). In diesem Zellmodell wurde der hTRPV1 allerdings

konstitutiv exprimiert und die intrazelluläre Calcium-Konzentration mittels Fluo-3 und FLIPR™ gemessen.

Zusätzlich zur Analyse der oben genannten Agonisten wurden für die Validierung des zellulären CHO<sup>-I-hTRPV1</sup>-Testsystems Dosis-Wirkungs-Kurven von fünf bekannten TRPV1-Antagonisten ermittelt und die berechneten IC<sub>50</sub>-Werte mit Literaturwerten verglichen (Tab.18).

**Tabelle 18: IC<sub>50</sub>-Potenzen von TRPV1-Antagonisten 2D-CHO<sup>-I-hTRPV1</sup>-Testsystem.**

\*MW ± Stabw; \*\*MW ± SF

Antagonist	IC <sub>50</sub> [nM]	Hintergrund	Expression	Zellsystem	Messmethode	Referenz
AMG-9810	82,0 ± 32,1*	Human	heterolog	CHO <sup>-I-hTRPV1</sup>	Fluoreszenz-basierte Ca <sup>2+</sup> -Messung (Fluo-8)	diese Arbeit
	24,5 ± 15,7*	Human	heterolog	CHO-K1	<sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> Aufnahme Messung	Gavva, Tamir & Qu <i>et al.</i> , 2005
	163 ± 2**	Ratte	endogen	DRG Neuronen	Patch Clamp	Park <i>et al.</i> , 2011
	85,6 ± 39,4*	Ratte	heterolog	CHO	<sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> Aufnahme Messung	Gavva, Tamir & Qu <i>et al.</i> , 2005
SB-366791	470,3 ± 15,7*	Human	heterolog	CHO <sup>-I-hTRPV1</sup>	Fluoreszenz-basierte Ca <sup>2+</sup> -Messung (Fluo-8)	diese Arbeit
	147 ± 7*	Human	heterolog	CHO	<sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> Aufnahme Messung	Gavva, Tamir & Qu <i>et al.</i> , 2005
	651	Ratte	endogen	Trigeminal Ganglion (rat)	Fluoreszenz-basierte Calcium-Messung (Fura-2)	Varga <i>et al.</i> , 2005
	937 ± 207*	Ratte	heterolog	CHO	<sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> Aufnahme Messung	Gavva, Tamir & Klionsky <i>et al.</i> , 2005
	547 ± 231*	Ratte	heterolog	CHO	<sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> Aufnahme Messung	Gavva, Tamir & Qu <i>et al.</i> , 2005
Capsazepine	273,6 ± 42,4*	Human	heterolog	CHO <sup>-I-hTRPV1</sup>	Fluoreszenz-basierte Ca <sup>2+</sup> -Messung (Fluo-8)	diese Arbeit
	53 ± 3*	Human	heterolog	CHO	<sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> Aufnahme Messung	Gavva, Tamir & Qu <i>et al.</i> , 2005
	141 ± 40**	Human	heterolog	HEK293	Fluoreszenz-basierte Ca <sup>2+</sup> -Messung (Fluo-4)	El Kouhen <i>et al.</i> , 2005

	283	Ratte	heterolog	<i>Xenopus</i> Oozyt	Patch Clamp	Caterina <i>et al.</i> , 1997
	93 ± 2**	Human	heterolog	CHO	Fluoreszenz- basierte Ca <sup>2+</sup> - Messung (Fura 2)	Phillips <i>et al.</i> , 2004
	659 ± 155*	Ratte	heterolog	CHO	<sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> Aufnahme Messung	Gavva, Tamir & Klionsky <i>et al.</i> , 2005
	887 ± 340*	Ratte	heterolog	CHO	<sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> Aufnahme Messung	Gavva, Tamir & Qu <i>et al.</i> , 2005
	562	Ratte	Heterolog	CHO	Patch Clamp	Seabrook <i>et al.</i> , 2002
	118	Human	heterolog	CHO	Patch Clamp	Seabrook <i>et al.</i> , 2002
	420 ± 46**	Ratte	endogen	DRG Neuronen	<sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> Aufnahme Messung	(Bevan <i>et al.</i> , 1992)
	29,3 ± 35,0*	Ratte	heterolog	HEK293	Fluoreszenz- basierte Ca <sup>2+</sup> - Messung (Fluo-4)	Schneider eit <i>et al.</i> , 2016
<b>BCTC</b>	8,4 ± 4,1*	Human	heterolog	CHO- <sup>I-hTRPV1</sup>	Fluoreszenz- basierte Ca <sup>2+</sup> - Messung (Fluo-8)	diese Arbeit
	6 ± 2*	Human	heterolog	CHO	<sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> Aufnahme Messung	Gavva <i>et al.</i> , 2004
	34,9 ± 19,4**	Ratte	heterolog	HEK293	Fluoreszenz- basierte Ca <sup>2+</sup> - Messung (Fluo-4)	Valenzan o <i>et al.</i> , 2003
	5 ± 1*	Human	heterolog	CHO	<sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> Aufnahme Messung	Gavva <i>et al.</i> , 2004
	0,4 ± 0,1*	Ratte	heterolog	CHO	<sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> Aufnahme Messung	Gavva, Tamir & Klionsky <i>et al.</i> , 2005
<b>Rutheni- um Red</b>	109,9 ± 40,5*	Human	heterolog	CHO- <sup>I-hTRPV1</sup>	Fluoreszenz- basierte Ca <sup>2+</sup> - Messung (Fluo-8)	diese Arbeit
	501,2 ± 20**	Human	heterolog	HEK293	Fluoreszenz- basierte Ca <sup>2+</sup> - Messung (Fluo-4)	El Kouhen <i>et al.</i> , 2005
	1.370 ± 290*	Human	heterolog	CHO	<sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> Aufnahme Messung	Gavva <i>et al.</i> , 2004
	1021 ± 365*	Ratte	heterolog	CHO	<sup>45</sup> Ca <sup>2+</sup> Aufnahme Messung	Gavva <i>et al.</i> , 2004

Auch bei einem Vergleich der in dieser Arbeit ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte mit Literaturwerten sind die verschiedenen Zellsysteme und Messmethoden zu berücksichtigen, die die Wirksamkeit der getesteten Antagonisten beeinflussen

können. Trotz dieser Unterschiede konnte in dem entwickelten CHO<sup>-I-hTRPV1-</sup> Testsystem für die Antagonisten AMG-9810 und BCTC sehr ähnliche Werte im Vergleich zu anderen CHO-Zellsystemen erreicht werden. Die IC<sub>50</sub>-Werte für Capsazepine, SB-366791 und Ruthenium Red streuten etwas stärker, folgen aber einer ähnlichen Größenordnung.

Die Rangfolge der gemessenen IC<sub>50</sub>-Potenzen der getesteten TRPV1-Antagonisten (BCTC > AMG-9810 > Ruthenium Red > Capsazepine > SB-366791) ist mit in der Literatur angegebenen Daten sehr ähnlich. Beispielsweise beschrieben Gavva und Kollegen eine Rangfolge von BCTC > AMG-9810 > Capsazepine > SB-366791 (Gavva, Tamir & Qu *et al.*, 2005). Zur Rangfolge von Capsazepine und Ruthenium Red sind unterschiedliche Daten veröffentlicht. El Kouhen *et al.* detektierten höhere IC<sub>50</sub>-Potenzen für Ruthenium Red (RR) als für Capsazepine (IC<sub>50</sub> RR: 501nM vs. IC<sub>50</sub> Capsazepine: 141nM). Diese Rangfolge wurde ebenso von Gavva *et al.* beschrieben (IC<sub>50</sub> Capsazepine: 53nM vs. IC<sub>50</sub> RR: 1370nM) (Gavva, Tamir & Qu *et al.*, 2005; El Kouhen *et al.*, 2005). In der Arbeit von Smart *et al.*, wurde dagegen eine höhere IC<sub>50</sub>-Potenz für Capsazepine als für RR detektiert (Smart *et al.*, 2001). Wie bereits bei den EC<sub>50</sub>-Werten der Agonisten diskutiert, liegen den Analysen verschiedene Zellsysteme und unterschiedliche Messmethoden zugrunde, was die Wirksamkeitsreihenfolgen beeinflussen kann.

In dieser Arbeit wurde die Aktivierung bzw. Inhibierung des TRPV1-Ionenkanals über die Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration bestimmt, wozu der Calcium-sensitive Fluoreszenzindikator Fluo-8 eingesetzt wurde. Diese fluorimetrische Messmethode wird weit verbreitet im Wirkstoff-Screening eingesetzt, da eine Reihe von sensitiven Indikatormolekülen zur Verfügung stehen und die Fluoreszenz ein einfach und schnell auszuwertendes Signal in den Mikroplatten-Lesegeräten ist. Neben Mikroplattenreader-basierten Calcium-Messungen werden auch automatisierte, fluoreszenzmikroskopische High-Content Screening (HCS)-Technologien in der Wirkstofffindung eingesetzt (Schneidereit *et al.*, 2016). Die HCS-Technologie bietet den Vorteil, biologische Veränderungen von Einzelzellen untersuchen und dabei mehr Daten erfassen zu können als mit anderen, meist biochemischen Assay-Systemen. In einer Studie von Heusinkveld *et al.*, wurden fluoreszenzmikroskopische Calcium-Messungen mit Mikroplattenreader-basierten Messungen von PC12-Zellen (Zelllinie aus einem Tumor des Nebennierenmarks der

Ratte) verglichen. Im Plattenreader wurde eine anhaltende hohe Calciumindikatorfluoreszenz nach Stimulierung detektiert, während die Messungen der Einzelzellen eine transiente Calcium-Reaktion zeigten; ähnlich den hier erhaltenen Ergebnissen der Calcium-Messungen im CHO<sup>-I-hTRPV1</sup>-Modell (Abb.26 bzw. Abb.32). Die anhaltende hohe Fluoreszenz des Calciumindikators ist durch organische Anionentransporter bedingt, die den Farbstoff aus der Zelle in das Medium transportieren. Typischerweise kann der Farbstoffverlust durch Probenecid, einem Inhibitor organischer Anionen-Transporter, weitgehend verhindert werden. Daher wurde in dieser Arbeit der Inhibitor Probenecid bei den Calcium-Messungen eingesetzt, um den Farbstoffverlust zu reduzieren. In den Studien von Heusinkveld wurde die Verwendung von Probenecid jedoch kritisch beurteilt, da sie Depolarisations-vermittelte Erhöhungen der intrazellulären Calcium-Konzentration in PC12-Zellen verhinderte (Heusinkveld & Westerink, 2011).

Zusätzlich zur pharmakologischen Validierung wurde durch die Bestimmung des Z'-Faktors das Potenzial des entwickelten CHO<sup>-I-hTRPV1</sup>-Zellassays für den Einsatz als Hochdurchsatz-Screening-System für die Wirkstoffsuche beurteilt. Der Z'-Faktor berücksichtigt den dynamischen Messbereich und die Messvarianz des Assays und stellt somit eine geeignete Kennzahl für den Vergleich, aber auch für die Evaluierung und die Optimierung von Assays dar (Zhang *et al.*, 1999). Für den in dieser Arbeit entwickelten und validierten 2D-CHO<sup>-I-hTRPV1</sup>-Zellassay wurde ein Z'-Faktor von  $0,66 \pm 0,09$  ermittelt, was den Assay als ein sehr gutes Testsystem für die Wirkstofffindung in Hochdurchsatzverfahren ausweist.

Zusammenfassend belegen die Ergebnisse der Validierung und der Z'-Faktor-Bestimmung, dass das hier entwickelte CHO<sup>-I-hTRPV1</sup>-Zellmodell in Verbindung mit der fluorimetrischen Messung der  $[Ca^{2+}]_i$  als sensibles Testsystem für die pharmakologische Analyse von TRPV1-spezifischen Wirkstoffen in Hochdurchsatz-Verfahren geeignet ist. Darüber hinaus beinhaltet das 2D-CHO<sup>-I-hTRPV1</sup>-Testsystem weitere Vorteile im Vergleich zu zellfreien Screening-Systemen. Der humane hTRPV1-Ionenkanal kann ohne störende endogene TRPV1-Expression im zellulären Kontext reguliert exprimiert werden. Weiterhin können in Screening-Verfahren und Analysen von TRPV1-spezifischen Wirkstoffen bereits zu einem frühen Zeitpunkt zytotoxische Testsubstanzen identifiziert werden.

### 4.3 Entwicklung und Validierung des 3D-CHO<sup>-I-hTRPV1</sup>-Testsystems

Dreidimensionale Zellkulturen verfügen über das Potenzial, spezifische Eigenschaften des Ursprungsgewebes mit höherer Ähnlichkeit widerzuspiegeln als zweidimensionale Zellmodelle. Sie eignen sich daher als Testsysteme für die Identifizierung von Zielmolekülen, für die Wirkstofffindung und -validierung von potenziellen Wirkstoffen als auch für präklinische Studien. Trotzdem ist eine breite Anwendung der 3D-Zellkulturmodelle in der Industrie noch nicht erreicht. Dies beruht vor allem in der unzureichenden Standardisierung in der Präparation der unterschiedlichen 3D-Zellkulturmodelle und einer fehlenden Automatisierung des Screening-Verfahrens. Darüber hinaus ist für viele der bisher stark in der Forschung eingesetzten 3D-Zellkulturmodelle die Aussagekraft hinsichtlich der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die *in-vivo* Situation noch unvollständig. In der vorliegenden Arbeit wurden die formulierten Anforderungen bei der Entwicklung des 3D-CHO<sup>-I-hTRPV1</sup>-Testsystems berücksichtigt.

Das zunächst als Monolayer entwickelte CHO<sup>-I-hTRPV1</sup>-Zellmodell wurde anschließend als dreidimensionales Zellkulturmodell etabliert, was einen direkten Vergleich der Wirksamkeiten von TRPV1-spezifischen Wirkstoffen im 2D- vs. 3D-Testsystem erlaubte. Für einen Einsatz in Hochdurchsatz-Screening-Verfahren ist eine reproduzierbare Sphäroidbildung essentiell. Daher wurde das dreidimensionale CHO<sup>-I-hTRPV1</sup>-Testsystem als matrixfreies 3D-Sphäroid-Modell etabliert. Mit der „forced-floating“-Technik, bei der Mikrotiterplatten mit anti-adhäsiven Oberflächenbeschichtungen eingesetzt wurden, konnten Sphäroide abhängig von der Zellzahl reproduzierbar in verschiedenen Größen generiert werden. Für das 3D-Testsystem wurden Sphäroide mit einem Durchmesser von  $369 \pm 7 \mu\text{m}$  eingesetzt. Die Sphäroide wiesen einen hohen Sphericity-Index von  $0,93 \pm 0,003$  auf. Zaroni *et al.* zeigten, dass ein hoher Sphericity-Index der Sphäroide mit einer gleichmäßigeren Verteilung der verschiedenen metabolischen Zonen innerhalb eines Sphäroids korreliert und die Datenvariabilität auf ein Minimum beschränkt ist (Zaroni *et al.*, 2016). Ein weiterer kritischer Aspekt bei der Generierung von 3D-Zellkulturmodellen beruht häufig in der längeren Kultivierungszeit der 3D-Zellmodelle im Vergleich zum Monolayer. In dieser Arbeit konnten mit der „forced-floating“-Technik bei ausgesäten Zelldichten von 5000 bis 40.000 CHO<sup>-I-hTRPV1</sup>-Zellen bereits nach 24h Sphäroide bei allen Zellzahlen generiert werden. Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden,

dass auf der Grundlage eines kommerziell erhältlichen, standardisierten Mikrotiterplattensystems reproduzierbare Ergebnisse bei der Sphäroidbildung bereits nach 24h erzielt und eine hohe Standardisierung bei der Probenpräparation erreicht wurde.

Die komplexe und teilweise fehlende Standardisierung in der Analyse von 3D-Zellkulturmodellen stellt im Vergleich zu zellfreien oder Monolayer-Systemen einen weiteren Grund für die relativ geringe Anwendungsbreite der 3D-Zellsysteme in der Wirkstoffentwicklung dar. Im vorliegenden 3D-CHO<sup>I-hTRPV1</sup>-Testsystem sollte daher durch eine fluorimetrische Messung mit Fluo-8 eine verlässliche Quantifizierung der  $[Ca^{2+}]_i$  im 3D-Sphäroid erreicht werden. Exemplarisch sollte dies durch eine Analyse einzelner Sphäroide vor und nach Behandlung mit TRPV1-spezifischen Agonisten und Antagonisten gezeigt werden.

Sphäroide zeigen meist eine Schichtstruktur, die auf der unterschiedlichen Verteilung von Sauerstoff, Nährstoffen und Abfallprodukten beruht. Der äußere Bereich von Sphäroiden wird als Zone von proliferierenden Zellen beschrieben, während der mittlere Bereich von zumeist ruhenden Zellen gebildet wird (G0-Phase). Im Zentrum eines Sphäroids kann ein nekrotischer Kern entstehen, allerdings zumeist erst bei einem Sphäroid-Durchmesser von 500-600µm (Lin & Chang, 2008). Die in dieser Arbeit eingesetzten 3D-Sphäroide hatten einen Durchmesser von ca. 370 µm und damit sehr wahrscheinlich keinen nekrotischen Kern. Mittels Hoechst 33342-Färbung wurde in Kryoschnitten der Sphäroide eine über das Sphäroid einheitlich verteilte Fluoreszenzintensität gemessen, wodurch ausgeschlossen werden konnte, dass in der Mitte der Sphäroide die Zellzahl geringer ist. Allerdings färbt der membrangängige Farbstoff neben vitalen Zellen auch Zellkerne apoptotischer bzw. teils abgestorbener Zellen an. Zur eindeutigen Identifizierung von nekrotischen Zellen, deren Plasmamembran im Gegensatz zu apoptotischen Zellen zerstört ist, könnte man parallel Membran-impermeable Farbstoffe, beispielsweise Sytox, einsetzen, um spezifisch nekrotische Zellen zu markieren.

In den 3D-CHO<sup>I-hTRPV1</sup>-Sphäroiden wurde in einer äußeren Zellschicht von insgesamt ca. 50µm Dicke eine höhere hTRPV1-mCherry-Fluoreszenzintensität nach Induktion mit Doxyzyklin detektiert als im inneren Bereich der Sphäroide. Die höhere Expression von hTRPV1-mCherry in der äußeren Zellzone korrelierte mit einer höheren relativen Änderung der Fluo-8-Intensität in den äußeren Zellschichten der

Sphäroide (ca. 60µm) im Vergleich zum Mittelbereich, nachdem die TRPV1-Ionenkanäle durch Capsaicin-Behandlung aktiviert wurden. Obwohl die Fluo-8-Fluoreszenzintensität in den äußeren Zellschichten des Sphäroids höher als im Mittelbereich war reagierten alle Zellen des Sphäroids mit einem sofortigen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  auf eine Capsaicin-Stimulierung. Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivierung der rekombinant exprimierten TRPV1-Ionenkanäle über die Messung der  $[Ca^{2+}]_i$  mit Fluo-8 auch in 3D-CHO<sup>I-hTRPV1</sup>-Sphäroiden quantifiziert werden kann. Dies erlaubte die Analyse von Dosis-Wirkungs-Beziehungen von TRPV1-Wirkstoffen in den ca. 370µm großen 3D-Sphäroiden im Mikroplattenreader mit Hilfe der etablierten „Well Scan“-Methode.

Analog zum Monolayer-Modell wurden die Dosis-Wirkungs-Kurven für jeweils fünf bekannte TRPV1-Agonisten und -Antagonisten in den 3D-Sphäroiden ermittelt. Im Vergleich zu dem 2D-CHO<sup>I-hTRPV1</sup>-Testsystem zeigten die Rangfolge der ermittelten EC<sub>50</sub>-Werte bzw. IC<sub>50</sub>-Werte und die gemessenen Hill-Koeffizienten keine signifikanten Unterschiede im 3D-Sphäroidmodell. Die Potenz- und die Effizienz-Werte waren in beiden Testsystemen zwar ähnlich, zeigten aber für einige Wirkstoffe signifikante Unterschiede. Im 3D-Sphäroid-Zellmodell wurden im Vergleich zum Monolayer signifikant niedrigere EC<sub>50</sub>-Werte für die Agonisten Capsaicin, RTX und NOD, als auch eine höhere Maximalwirkung für NADA, RTX und NOD ermittelt. Die höchste Änderung in der Effizienz wurde bei der Untersuchung des Agonisten NADA detektiert. Die Maximalwirkung im Monolayer betrug 51,6%, im Sphäroid dagegen 83,7%. Zwei Antagonisten (SB-366791 und RR) zeigten im 3D-Sphäroid-Modell eine signifikant niedrigere inhibitorische Potenz als im Monolayer. Die unterschiedlichen Sensitivitäten der Zellen im 3D-Sphäroid für die TRPV1-Agonisten Capsaicin, RTX und NOD als auch für die Antagonisten SB-366791 und RR könnten durch Veränderungen der Regulation der TRPV1-Ionenkanalfunktion durch die 3D-Zellkultivierung bedingt sein, was allerdings anhand der vorliegenden Daten nicht bewiesen werden kann. Bei der Ermittlung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen in den Sphäroiden ist zu berücksichtigen, dass der Effekt der eingesetzten TRPV1-spezifischen Agonisten und Antagonisten immer als Gesamtreaktion aller im Sphäroid vorhandenen Zellen gemessen wird. Das entwickelte CHO<sup>I-hTRPV1</sup>-Sphäroidmodell weist einerseits die Vorteile eines 3D-*in-vitro* Testsystems mit

zuverlässiger Quantifizierung der Messdaten auf, andererseits werden Wirkstoffeffekte an einzelnen Zellen im Sphäroid nicht orts aufgelöst analysiert.

Für das 3D-CHO-<sup>I-hTRPV1</sup>-Testsystem wurde ein Z'-Faktor von  $0,45 \pm 0,05$  ermittelt, der zwar niedriger als der Z'-Faktor des 2D-Testsystems ist, aber noch die minimalen Anforderungen an ein Hochdurchsatz-Screening-Verfahren erfüllt. Die unterschiedlichen Z'-Faktoren sind wahrscheinlich durch die verschiedenen Methoden bedingt, die bei der Calcium-Messung eingesetzt wurden; die „orbital averaging“-Methode im Monolayer-Modell im Gegensatz zur „Well Scan“-Methode im 3D-Sphäroid-Modell.

Das entwickelte 3D-CHO-<sup>I-hTRPV1</sup>-Testsystem setzt die Anforderungen nach höherer Standardisierung der Probenpräparation (hier Sphäroidbildung) und Analytik sehr gut um. Exemplarisch konnte gezeigt werden, dass das 3D-CHO-<sup>I-hTRPV1</sup>-Testsystem für die pharmakologische Analyse von TRPV1-spezifischen Wirkstoffen auch in einem höheren Durchsatz geeignet ist.

#### **4.5 Krankheitsrelevante Zellmodelle mit endogener TRPV1-Expression**

Die Aktivierung von endogenem TRPV1 mit dem spezifischen Agonisten Capsaicin kann unterschiedliche zelluläre Antworten und biologische Prozesse in Krebszellen auslösen (Pecze & Blum *et al.*, 2016; Pecze & Josvay *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2014; Malagarie-Cazenave *et al.*, 2009; Thoennissen *et al.*, 2010). Die räumlichen und zeitlichen Eigenschaften von Calcium-Signalen steuern in der Zelle verschiedene Calcium-abhängige Prozesse. Oszillierende  $Ca^{2+}$ -Ströme beeinflussen die Effizienz der Signalübertragung auf Zielproteine in der Zelle, die eine Rolle in der Calcium-vermittelten Signaltransduktion spielen (Akagi *et al.*, 1999; Morelli *et al.*, 2014).

In dieser Arbeit wurden Brustkrebszelllinien unterschiedlicher Subtypen (*Luminal A*, *Luminal B*, *HER2-enriched*, *Basal-like*, *Claudin-low*) auf Capsaicin-induzierte Calcium-Reaktionen untersucht. Alle Zelllinien wurden als Monolayer kultiviert. Drei Brustkrebszelllinien (MCF7, SkBr3, HCC38), die nach Capsaicin-Stimulierung einen deutlichen Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration sowie  $Ca^{2+}$ -Oszillationen zeigten, wurden mittels der „forced-floating“-Technik, als 3D-Sphäroide kultiviert und in den Capsaicin-abhängigen Viabilitätsanalysen eingesetzt.

Die Zugabe von Capsaicin führte in allen getesteten 2D-Zelllinien zu einer Änderung der intrazellulären Calcium-Konzentration (Abb.45-55). Nach Capsaicin-Stimulierung konnten drei Kategorien von Calcium-Reaktionen fluoreszenzmikroskopisch unterschieden werden: (i) sofort, (ii) verzögert und (iii) oszillierend. Dies ist in Übereinstimmung mit beschriebenen Untersuchungen an Brustkrebszelllinien und Prostatakrebszelllinien (Pecze & Blum *et al.*, 2016). Die Anteile Capsaicin-reagierender Zellen variierten zwischen den untersuchten Zelllinien. Es wurden keine Subtyp-spezifischen Unterschiede in den Capsaicin-induzierten Calcium-Reaktionen detektiert. In allen untersuchten Zelllinien wurden Zellen detektiert, die auch auf eine Zugabe Capsaicin-freien Puffers mit einem Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration reagierten. Die Expression mechanosensitiver Ionenkanäle in Brustkrebszellen könnte dies erklären (Li *et al.*, 2015; Aydar *et al.*, 2009).

Die Kultivierung in Anwesenheit von Capsaicin resultierte in einem signifikanten Anstieg der Viabilität in den Brustkrebszelllinien SkBr3 und MCF7, unabhängig des verwendeten Kultivierungssystems (2D vs. 3D). Der beobachtete Effekt der Capsaicin-induzierten Erhöhung der Zellviabilität, wurde durch die Zugabe des TRPV1-Antagonisten Capsazepine kompensiert. Dies ist in Übereinstimmung mit den von Malagarie-Cazneve erhaltenen Daten in Prostatakrebszellen (Malagarie-Cazenave *et al.*, 2009) und ist ein weiterer Hinweis, dass der Effekt TRPV1-vermittelt ist. Interessanterweise führte bereits die Inkubation mit Capsazepine alleine zu einem Anstieg der Zellviabilität in MCF7- und SkBr3-Zellen. Capsazepine wurde auch als Inhibitor des TRPM8-Ionenkanals identifiziert (Behrendt *et al.*, 2004), der ebenfalls in den Brustkrebszelllinien MCF7 und SkBr3 exprimiert wird (Liu *et al.*, 2014). In Prostatakrebszellen führte die Inhibierung von TRPM8 durch Capsazepine allerdings zu einer Verminderung der Viabilität (Zhang & Barritt, 2004). Der Mechanismus des hier gemessenen Anstiegs der Viabilität durch Zugabe von Capsazepine zu den Zelllinien SkBr3 und MCF7 bleibt unklar. Obwohl in dieser Arbeit eine Erhöhung der Viabilität nach Capsaicin-Stimulierung detektiert wurde, gibt es Nachweise für eine nekrotische bzw. apoptotische Wirkung des Capsaicins in Brustkrebszellen (Thoennissen *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2014). Thoennissen *et al.* zeigten für die Linien MCF7, SkBr3, BT-474, T47D, MDA-MB-231 und MCF10A eine Abnahme der Viabilität bzw. eine Apoptose-Induktion mit ansteigender Capsaicin-Konzentration mit  $EC_{50}$ -Werten zwischen 50-200  $\mu$ M Capsaicin. Allerdings ist dieser Effekt TRPV1-unabhängig. In einem induzierbaren TRPV1-Überexpressionsmodell in

MCF7-TetOff-Zellen führte eine 24-stündige Capsaicin-Inkubation zum Zelltod, die in Relation zur TRPV1-Expressionshöhe stand (Wu *et al.*, 2014). In diesem Modell war bereits eine Capsaicin-Konzentration von 3µM ausreichend, um Nekrose auszulösen. Wu und Kollegen postulieren, dass aufgrund der Überexpression des TRPV1-Ionenkanals die Inkubation mit Capsaicin zu einem starken Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration führte, wodurch Nekrose induziert werden kann. Im generierten CHO-<sup>hTRPV1</sup>-Zellmodell wurde ebenfalls eine TRPV1-vermittelte Toxizität in Abhängigkeit der Capsaicin-Konzentration über 24h beobachtet. Die Wirkung von Capsaicin scheint also in starker Relation zur TRPV1-Expressionshöhe zu stehen.

#### **4.6 Schlussfolgerung**

In der vorliegenden Arbeit wurden zelluläre 2D- und 3D-Testsysteme entwickelt, mit denen TRPV1-Wirkstoffmoleküle identifiziert und charakterisiert werden können. Die Optimierung des Zellmodells für eine 3D-Kultivierung erlaubt die Untersuchung von TRPV1-Modulatoren in einer *in-vivo*-ähnlichen Umgebung. Der entwickelte Calcium-Assay wurde sowohl im 2D-Monolayer als auch im 3D-Sphäroidmodell als robustes Screening-System mit hoher Sensitivität und Datenreproduzierbarkeit etabliert. Damit setzt das entwickelte Testverfahren verschiedene Anforderungen um, die für den Einsatz in Wirkstoff-Screening-Verfahren mit mittlerem und hohem Durchsatz grundlegend sind. Die Regulierbarkeit der TRPV1-Expressionshöhe vermindert zum einen toxische Effekte einer konstitutiven TRPV1-Expression und zum anderen ermöglicht sie die gezielte Untersuchung der Auswirkung unterschiedlicher TRPV1-Expressionshöhen. Die Fluoreszenzmarkierung des TRPV1-Ionenkanals erlaubt die Untersuchung der subzellulären TRPV1-Lokalisation in Abhängigkeit von der Expressionshöhe sowie von verschiedenen Wirkstoffen. Die Analyse der Brustkrebszellmodelle mit endogener TRPV1-Expression zeigte, dass krankheitsrelevante Zellmodelle eine wichtige Rolle in der Zielmolekül-basierter Wirkstofffindung darstellen. Die Kombination von Überexpressionsmodellen, Modellen mit endogener Expression, sowie die Anpassung dieser an 2D- und 3D-Kultivierungsmethoden ermöglicht eine umfassende pharmakologische Identifizierung, Charakterisierung und Validierung von TRPV1-Wirkstoffen.

## LITERATURVERZEICHNIS

**Ahler, E., Sullivan, W. J., Cass, A., Braas, D., York, A. G., Bensinger, S. J., Graeber, T. G. & Christofk, H. R. (2013).** Doxycycline alters metabolism and proliferation of human cell lines. *PloS one* **8**, e64561.

**Akagi, K., Nagao, T. & Urushidani, T. (1999).** Correlation between  $Ca^{2+}$  oscillation and cell proliferation via CCKB/gastrin receptor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1452**, 243–253.

**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 beta cells modulates insulin secretion in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **321**, 219–225.

**Amantini, C., Ballarini, P., Caprodossi, S., Nabissi, M., Morelli, M. B., Lucciarini, R., Cardarelli, M. A., Mammana, G. & Santoni, G. (2009).** Triggering of transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) by capsaicin induces Fas/CD95-mediated apoptosis of urothelial cancer cells in an ATM-dependent manner. *Carcinogenesis* **30**, 1320–1329.

**Appendino, G., Petrocellis, L. de, Trevisani, M., Minassi, A., Daddario, N., Moriello, A. S., Gazzieri, D., Ligresti, A. & Campi, B. & other authors (2005).** Development of the first ultra-potent "capsaicinoid" agonist at transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) channels and its therapeutic potential. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **312**, 561–570.

**Arkin, M. R., Connor, P. R., Emkey, R., Garbison, K. E., Heinz, B. A., Wiernicki, T. R., Johnston, P. A., Kandasamy, R. A., Rankl, N. B. & Sittampalam, S. (2004).** FLIPR assays for GPCR and ion channel targets. *Assay Guidance Manual*. Edited by G. S. Sittampalam, N. P. Coussens, K. Brimacombe, A. Grossman, M. Arkin, D. Auld, C. Austin, B. Bejcek & M. Glicksman & other editors. Bethesda (MD).

**Asbury, A. K. (1989).** Pain. By Howard L. Fields, MD, PhD New York, McGraw-Hill, 1987 354 pp, *Annals of Neurology* **25**, 108.

**Aydar, E., Yeo, S., Djamgoz, M. & Palmer, C. (2009).** Abnormal expression, localization and interaction of canonical transient receptor potential ion channels in human breast cancer cell lines and tissues: a potential target for breast cancer diagnosis and therapy. *Cancer cell international* **9**, 23.

- Baharvand, H., Hashemi, S. M., Kazemi Ashtiani, S. & Farrokhi, A. (2006).** Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems in vitro. *The International Journal of Developmental Biology* **50**, 645–652.
- Bandell, M., Story, G. M., Hwang, S. W., Viswanath, V., Eid, S. R., Petrus, M. J., Earley, T. J. & Patapoutian, A. (2004).** Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* **41**, 849–857.
- Baranidharan, G., Das, S. & Bhaskar, A. (2013).** A review of the high-concentration capsaicin patch and experience in its use in the management of neuropathic pain. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders* **6**, 287–297.
- Basu, S. & Srivastava, P. (2005).** Immunological role of neuronal receptor vanilloid receptor 1 expressed on dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 5120–5125.
- Behrendt, H.-J., Germann, T., Gillen, C., Hatt, H. & Jostock, R. (2004).** Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor type-1 VR1 using a fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay. *British Journal of Pharmacology* **141**, 737–745.
- Bevan, S., Hothi, S., Hughes, G., James, I. F., Rang, H. P., Shah, K., Walpole, C. S. & Yeats, J. C. (1992).** Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *British Journal of Pharmacology* **107**, 544–552.
- Birnbaumer, L., Yildirim, E. & Abramowitz, J. (2003).** A comparison of the genes coding for canonical TRP channels and their M, V and P relatives. *Cell Calcium* **33**, 419–432.
- Bissell, M. J., Hall, H. G. & Parry, G. (1982).** How does the extracellular matrix direct gene expression? *Journal of Theoretical Biology* **99**, 31–68.
- Bohlen, C. J., Priel, A., Zhou, S., King, D., Siemens, J. & Julius, D. (2010).** A bivalent tarantula toxin activates the capsaicin receptor, TRPV1, by targeting the outer pore domain. *Cell* **141**, 834–845.
- Bolanz, K. A., Hediger, M. A. & Landowski, C. P. (2008).** The role of TRPV6 in breast carcinogenesis. *Molecular Cancer Therapeutics* **7**, 271–279.
- Brauchi, S., Orta, G., Salazar, M., Rosenmann, E. & Latorre, R. (2006).** A hot-sensing cold receptor: C-terminal domain determines thermosensation in transient receptor potential channels. *The Journal of Neuroscience* **26**, 4835–4840.
- Brederson, J.-D., Kym, P. R. & Szallasi, A. (2013).** Targeting TRP channels for pain relief. *European Journal of Pharmacology* **716**, 61–76.

- Breslin, S. & O'Driscoll, L. (2013).** Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug discovery today* **18**, 240–249.
- Cao, E., Liao, M., Cheng, Y. & Julius, D. (2013).** TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature* **504**, 113–118.
- Carnevale, V. & Rohacs, T. (2016).** TRPV1: A target for rational drug design. *Pharmaceuticals* **9**, 1-20.
- Caterina, M. J., Rosen, T. A., Tominaga, M., Brake, A. J. & Julius, D. (1999).** A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* **398**, 436–441.
- 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**, 816–824.
- Chen, T. (2010).** *A practical guide to assay development and high-throughput screening in drug discovery*. Boca Raton: CRC Press.
- Cheng, W., Yang, F., Takanishi, C. L. & Zheng, J. (2007).** Thermosensitive TRPV channel subunits coassemble into heteromeric channels with intermediate conductance and gating properties. *The Journal of General Physiology* **129**, 191–207.
- Chung, M.-K., Guler, A. D. & Caterina, M. J. (2008).** TRPV1 shows dynamic ionic selectivity during agonist stimulation. *Nature Neuroscience* **11**, 555–564.
- Clackson, T. (2000).** Regulated gene expression systems. *Gene therapy* **7**, 120–125.
- Clapham, D. E. (2003).** TRP channels as cellular sensors. *Nature* **426**, 517–524.
- Cosens, D. J. & Manning, A. (1969).** Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* **224**, 285–287.
- Cui, C., Merritt, R., Fu, L. & Pan, Z. (2017).** Targeting calcium signaling in cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica* **7**, 3–17.
- Cui, M., Gosu, V., Basith, S., Hong, S. & Choi, S. (2016).** Polymodal transient receptor potential vanilloid type 1 nociceptor: structure, modulators, and therapeutic applications. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* **104**, 81–125.
- Curran, J. & Mohler, P. J. (2015).** Alternative paradigms for ion channelopathies: disorders of ion channel membrane trafficking and posttranslational modification. *Annual Review of Physiology* **77**, 505–524.

- Cuyppers, E., Yanagihara, A., Rainier, J. D. & Tytgat, J. (2007).** TRPV1 as a key determinant in ciguatera and neurotoxic shellfish poisoning. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **361**, 214–217.
- Czifra, G., Varga, A., Nyeste, K., Marincsak, R., Toth, B. I., Kovacs, I., Kovacs, L. & Biro, T. (2009).** Increased expressions of cannabinoid receptor-1 and transient receptor potential vanilloid-1 in human prostate carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **135**, 507–514.
- Dhennin-Duthille, I., Gautier, M., Faouzi, M., Guilbert, A., Brevet, M., Vaudry, D., Ahidouch, A., Sevestre, H. & Ouadid-Ahidouch, H. (2011).** High expression of transient receptor potential channels in human breast cancer epithelial cells and tissues: correlation with pathological parameters. *Cellular Physiology and Biochemistry* **28**, 813–822.
- Di Virgilio, F., Steinberg, T. H. & Silverstein, S. C. (1989).** Organic-anion transport inhibitors to facilitate measurement of cytosolic free Ca<sup>2+</sup> with fura-2. *Methods in Cell Biology* **31**, 453–462.
- Docherty, R. J., Yeats, J. C. & Piper, A. S. (1997).** Capsazepine block of voltage-activated calcium channels in adult rat dorsal root ganglion neurones in culture. *British Journal of Pharmacology* **121**, 1461–1467.
- Domotor, A., Peidl, Z., Vincze, A., Hunyady, B., Szolcsanyi, J., Kereskay, L., Szekeres, G. & Mozsik, G. (2005).** Immunohistochemical distribution of vanilloid receptor, calcitonin-gene related peptide and substance P in gastrointestinal mucosa of patients with different gastrointestinal disorders. *Inflammopharmacology* **13**, 161–177.
- Dray, A., Forbes, C. A. & Burgess, G. M. (1990).** Ruthenium red blocks the capsaicin-induced increase in intracellular calcium and activation of membrane currents in sensory neurones as well as the activation of peripheral nociceptors in vitro. *Neuroscience Letters* **110**, 52–59.
- Duncan, L. M., Deeds, J., Hunter, J., Shao, J., Holmgren, L. M., Woolf, E. A., Tepper, R. I. & Shyjan, A. W. (1998).** Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Research* **58**, 1515–1520.
- Durocher, Y. & Butler, M. (2009).** Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Current Opinion in Biotechnology* **20**, 700–707.
- Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F. & Yang, L. (2014).** Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and Drug Development Technologies* **12**, 207–218.

- El Kouhen, R., Surowy, C. S., Bianchi, B. R., Neelands, T. R., McDonald, H. A., Niforatos, W., Gomtsyan, A., Lee, C.-H. & Honore, P. & other authors (2005).** A-425619 1-isoquinolin-5-yl-3-(4-trifluoromethyl-benzyl)-urea, a novel and selective transient receptor potential type V1 receptor antagonist, blocks channel activation by vanilloids, heat, and acid. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **314**, 400–409.
- Elbaz, M., Ahirwar, D., Xiaoli, Z., Zhou, X., Lustberg, M., Nasser, M. W., Shilo, K. & Ganju, R. K. (2016).** TRPV2 is a novel biomarker and therapeutic target in triple negative breast cancer. *Oncotarget* **5**, 1-12.
- Eroles, P., Bosch, A., Perez-Fidalgo, J. A. & Lluch, A. (2012).** Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treatment Reviews* **38**, 698–707.
- Fernandes, E. S., Fernandes, M. A. & Keeble, J. E. (2012).** The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. *British Journal of Pharmacology* **166**, 510–521.
- Friedrich, J., Seidel, C., Ebner, R. & Kunz-Schughart, L. A. (2009).** Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nature Protocols* **4**, 309–324.
- Fuessel, S., Sickert, D., Meye, A., Klenk, U., Schmidt, U., Schmitz, M., Rost, A.-K., Weigle, B., Kiessling, A. & Wirth, M. P. (2003).** Multiple tumor marker analyses (PSA, hK2, PSCA, trp-p8) in primary prostate cancers using quantitative RT-PCR. *International Journal of Oncology* **23**, 221–228.
- Gallego-Sandin, S., Rodriguez-Garcia, A., Alonso, M. T. & Garcia-Sancho, J. (2009).** The endoplasmic reticulum of dorsal root ganglion neurons contains functional TRPV1 channels. *The Journal of Biological Chemistry* **284**, 32591–32601.
- Garcia-Sanz, N., Fernandez-Carvajal, A., Morenilla-Palao, C., Planells-Cases, R., Fajardo-Sanchez, E., Fernandez-Ballester, G. & Ferrer-Montiel, A. (2004).** Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor. *The Journal of Neuroscience* **24**, 5307–5314.
- Gavva, N. R., Bannon, A. W., Surapaneni, S., Hovland, D. N., JR, Lehto, S. G., Gore, A., Juan, T., Deng, H. & Han, B. & other authors (2007).** The vanilloid receptor TRPV1 is tonically activated in vivo and involved in body temperature regulation. *The Journal of Neuroscience* **27**, 3366–3374.
- Gavva, N. R., Klionsky, L., Qu, Y., Shi, L., Tamir, R., Edenson, S., Zhang, T. J., Viswanadhan, V. N. & Toth, A. & other authors (2004).** Molecular determinants of vanilloid sensitivity in TRPV1. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 20283–20295.

- Gavva, N. R., Tamir, R., Klionsky, L., Norman, M. H., Louis, J.-C., Wild, K. D. & Treanor, J. J. S. (2005).** Proton activation does not alter antagonist interaction with the capsaicin-binding pocket of TRPV1. *Molecular Pharmacology* **68**, 1524–1533.
- Gavva, N. R., Tamir, R., Qu, Y., Klionsky, L., Zhang, T. J., Immke, D., Wang, J., Zhu, D. & Vanderah, T. W. & other authors (2005).** AMG 9810 (E)-3-(4-t-butylphenyl)-N-(2,3-dihydrobenzob[1,4-dioxin-6-yl]acrylamide, a novel vanilloid receptor 1 (TRPV1) antagonist with antihyperalgesic properties. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **313**, 474–484.
- Gavva, N. R., Treanor, J. J. S., Garami, A., Fang, L., Surapaneni, S., Akrami, A., Alvarez, F., Bak, A. & Darling, M. & other authors (2008).** Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans. *Pain* **136**, 202–210.
- Geppetti, P., ed. (1996).** *Neurogenic Inflammation*. Boca Raton, Fla.: CRC Press.
- Gibson, H. E., Edwards, J. G., Page, R. S., van Hook, M. J. & Kauer, J. A. (2008).** TRPV1 channels mediate long-term depression at synapses on hippocampal interneurons. *Neuron* **57**, 746–759.
- Gore, V. K., Ma, V. V., Tamir, R., Gavva, N. R., Treanor, J. J. S. & Norman, M. H. (2007).** Structure-activity relationship (SAR) investigations of substituted imidazole analogs as TRPV1 antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **17**, 5825–5830.
- Gossen, M. & Bujard, H. (1992).** Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 5547–5551.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W. & Bujard, H. (1995).** Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* **268**, 1766–1769.
- Goverdhan, S., Puntel, M., Xiong, W., Zirger, J. M., Barcia, C., Curtin, J. F., Soffer, E. B., Mondkar, S. & King, G. D. & other authors (2005).** Regulatable gene expression systems for gene therapy applications: progress and future challenges. *Molecular Therapy* **12**, 189–211.
- Grandl, J., Kim, S. E., Uzzell, V., Bursulaya, B., Petrus, M., Bandell, M. & Patapoutian, A. (2010).** Temperature-induced opening of TRPV1 ion channel is stabilized by the pore domain. *Nature Neuroscience* **13**, 708–714.
- Greffrath, W. (2006).** Der capsaicinrezeptor. ein TRP zur transduktion schmerzhafter reize. *Schmerz* **20**, 219–225.

- Gui, J., Liu, B., Cao, G., Lipchik, A. M., Perez, M., Dekan, Z., Mobli, M., Daly, N. L. & Alewood, P. F. & other authors (2014).** A tarantula-venom peptide antagonizes the TRPA1 nociceptor ion channel by binding to the S1-S4 gating domain. *Current Biology* **24**, 473–483.
- Guler, A. D., Lee, H., Iida, T., Shimizu, I., Tominaga, M. & Caterina, M. (2002).** Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *The Journal of Neuroscience* **22**, 6408–6414.
- Gunthorpe, M. J., Rami, H. K., Jerman, J. C., Smart, D., Gill, C. H., Soffin, E. M., Luis Hannan, S., Lappin, S. C. & Egerton, J. & other authors (2004).** Identification and characterisation of SB-366791, a potent and selective vanilloid receptor (VR1/TRPV1) antagonist. *Neuropharmacology* **46**, 133–149.
- Hanson, S. M., Newstead, S., Swartz, K. J. & Sansom, M. S. P. (2015).** Capsaicin interaction with TRPV1 channels in a lipid bilayer: molecular dynamics simulation. *Biophysical Journal* **108**, 1425–1434.
- Hardie, R. C. & Minke, B. (1992).** The *trp* gene is essential for a light-activated Ca<sup>2+</sup> channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* **8**, 643–651.
- Hartel, M., Di Mola, F. F., Selvaggi, F., Mascetta, G., Wente, M. N., Felix, K., Giese, N. A., Hinz, U. & Di Sebastiano, P. & other authors (2006).** Vanilloids in pancreatic cancer: potential for chemotherapy and pain management. *Gut* **55**, 519–528.
- Haugland, R. P. (2002).** *Handbook of fluorescent probes and research products*, 9th edn. Eugene, Or.: Molecular Probes Inc.
- Hayes, P., Meadows, H. J., Gunthorpe, M. J., Harries, M. H., Duckworth, D. M., Cairns, W., Harrison, D. C., Clarke, C. E. & Ellington, K. & other authors (2000).** Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1. *Pain* **88**, 205–215.
- Hellwig, N., Albrecht, N., Harteneck, C., Schultz, G. & Schaefer, M. (2005).** Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits. *Journal of Cell Science* **118**, 917–928.
- Heusinkveld, H. J. & Westerink, R. H. S. (2011).** Caveats and limitations of plate reader-based high-throughput kinetic measurements of intracellular calcium levels. *Toxicology and Applied Pharmacology* **255**, 1–8.
- Hillen, W. & Berens, C. (1994).** Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annual Review of Microbiology* **48**, 345–369.
- Hillen, W. & Berens, C. (2002).** Tetracyclin-gesteuerte Genregulation: vom bakteriellen Ursprung zum eukaryotischen Werkzeug. *BIOspektrum* **8**, 355–358.

- Holzer, P. (1988).** Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience* **24**, 739–768.
- Holzer, P. (1991).** Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacological Reviews* **43**, 143–201.
- Huang, S. M., Bisogno, T., Trevisani, M., Al-Hayani, A., Petrocellis, L., Fezza, F., Tognetto, M., Petros, T. J. & Krey, J. F. & other authors (2002).** An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 8400–8405.
- Hwang, S. W., Cho, H., Kwak, J., Lee, S. Y., Kang, C. J., Jung, J., Cho, S., Min, K. H. & Suh, Y. G. & other authors (2000).** Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 6155–6160.
- Inoue, K., Koizumi, S., Fuziwara, S., Denda, S., Inoue, K. & Denda, M. (2002).** Functional vanilloid receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **291**, 124–129.
- Ivascu, A. & Kubbies, M. (2006).** Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *Journal of Biomolecular Screening* **11**, 922–932.
- Ivascu, A. & Kubbies, M. (2007).** Diversity of cell-mediated adhesions in breast cancer spheroids. *International Journal of Oncology* **31**, 1403–1413.
- Jones, J., Nivitchanyong, T., Giblin, C., Ciccarone, V., Judd, D., Gorfien, S., Krag, S. S. & Betenbaugh, M. J. (2005).** Optimization of tetracycline-responsive recombinant protein production and effect on cell growth and ER stress in mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering* **91**, 722–732.
- Jordt, S. E., Tominaga, M. & Julius, D. (2000).** Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 8134–8139.
- Jordt, S.-E. & Julius, D. (2002).** Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. *Cell* **108**, 421–430.
- Julius, D. & Basbaum, A. I. (2001).** Molecular mechanisms of nociception. *Nature* **413**, 203–210.

- Kaneko, Y. & Szallasi, A. (2014).** Transient receptor potential (TRP) channels: a clinical perspective. *British Journal of Pharmacology* **171**, 2474–2507.
- Karlsson, H., Fryknas, M., Larsson, R. & Nygren, P. (2012).** Loss of cancer drug activity in colon cancer HCT-116 cells during spheroid formation in a new 3-D spheroid cell culture system. *Experimental Cell Research* **318**, 1577–1585.
- Kaszas, K., Keller, J. M., Coddou, C., Mishra, S. K., Hoon, M. A., Stojilkovic, S., Jacobson, K. A. & Iadarola, M. J. (2012).** Small molecule positive allosteric modulation of TRPV1 activation by vanilloids and acidic pH. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **340**, 152–160.
- Kelm, J. M., Timmins, N. E., Brown, C. J., Fussenegger, M. & Nielsen, L. K. (2003).** Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnology and Bioengineering* **83**, 173–180.
- Kim, S., Kang, C., Shin, C. Y., Hwang, S. W., Yang, Y. D., Shim, W. S., Park, M.-Y., Kim, E. & Kim, M. & other authors (2006).** TRPV1 recapitulates native capsaicin receptor in sensory neurons in association with Fas-associated factor 1. *The Journal of Neuroscience* **26**, 2403–2412.
- Kitaguchi, T. & Swartz, K. J. (2005).** An inhibitor of TRPV1 channels isolated from funnel Web spider venom. *Biochemistry* **44**, 15544–15549.
- Klein, F., Striebel, T., Fischer, J., Jiang, Z., Franz, C. M., Freymann, G. von, Wegener, M. & Bastmeyer, M. (2010).** Elastic fully three-dimensional microstructure scaffolds for cell force measurements. *Advanced Materials* **22**, 868–871.
- Kleinman, H. K. & Martin, G. R. (2005).** Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Seminars in cancer biology* **15**, 378–386.
- Knight, E. & Przyborski, S. (2015).** Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. *Journal of Anatomy* **227**, 746–756.
- Knotkova, H., Pappagallo, M. & Szallasi, A. (2008).** Capsaicin (TRPV1 agonist) therapy for pain relief: farewell or revival? *The Clinical Journal of Pain* **24**, 142–154.
- Kurosawa, H. (2007).** Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **103**, 389–398.
- Kwon, Y., Kim, S. H., Ronderos, D. S., Lee, Y., Akitake, B., Woodward, O. M., Guggino, W. B., Smith, D. P. & Montell, C. (2010).** Drosophila TRPA1 channel is required to avoid the naturally occurring insect repellent citronellal. *Current biology* **20**, 1672–1678.

- Lai, T., Yang, Y. & Ng, S. K. (2013).** Advances in Mammalian cell line development technologies for recombinant protein production. *Pharmaceuticals* **6**, 579–603.
- Lam, P. M. W., Hainsworth, A. H., Smith, G. D., Owen, D. E., Davies, J. & Lambert, D. G. (2007).** Activation of recombinant human TRPV1 receptors expressed in SH-SY5Y human neuroblastoma cells increases  $Ca^{2+}(i)$ , initiates neurotransmitter release and promotes delayed cell death. *Journal of Neurochemistry* **102**, 801–811.
- Lazzeri, M., Vannucchi, M. G., Spinelli, M., Bizzoco, E., Beneforti, P., Turini, D. & Faussone-Pellegrini, M.-S. (2005).** Transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) expression changes from normal urothelium to transitional cell carcinoma of human bladder. *European Urology* **48**, 691–698.
- Lembeck, F. (1953).** Zur Frage der zentralen Übertragung afferenter Impulse. III. das Vorkommen und die Bedeutung der Substanz P in den dorsalen Wurzeln des Rückenmarks. *Naunyn-Schmiedeberg's Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* **219**, 197–213.
- Li, C., Rezaei, S., Kammerer, S., Sokolowski, A., Devaney, T., Gorischek, A., Jahn, S., Hackl, H. & Groschner, K. & other authors (2015).** Piezo1 forms mechanosensitive ion channels in the human MCF-7 breast cancer cell line. *Scientific Reports* **5**, 8364.
- Li, H.-B., Mao, R.-R., Zhang, J.-C., Yang, Y., Cao, J. & Xu, L. (2008).** Antistress effect of TRPV1 channel on synaptic plasticity and spatial memory. *Biological Psychiatry* **64**, 286–292.
- Li, W., Kang, L., Piggott, B. J., Feng, Z. & Xu, X. Z. S. (2011).** The neural circuits and sensory channels mediating harsh touch sensation in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Communications* **2**, 315.
- Liao, M., Cao, E., Julius, D. & Cheng, Y. (2013).** Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature* **504**, 107–112.
- Liman, E. R., Corey, D. P. & Dulac, C. (1999).** TRP2. A candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 5791–5796.
- Lin, R.-Z. & Chang, H.-Y. (2008).** Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology Journal* **3**, 1172–1184.
- 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.

- Liu, J., Chen, Y., Shuai, S., Ding, D., Li, R. & Luo, R. (2014).** TRPM8 promotes aggressiveness of breast cancer cells by regulating EMT via activating AKT/GSK-3beta pathway. *Tumour Biology* **35**, 8969–8977.
- Liu, L. & Simon, S. A. (1997).** Capsazepine, a vanilloid receptor antagonist, inhibits nicotinic acetylcholine receptors in rat trigeminal ganglia. *Neuroscience Letters* **228**, 29–32.
- Loessner, D., Stok, K. S., Lutolf, M. P., Hutmacher, D. W., Clements, J. A. & Rizzi, S. C. (2010).** Bioengineered 3D platform to explore cell-ECM interactions and drug resistance of epithelial ovarian cancer cells. *Biomaterials* **31**, 8494–8506.
- Loew, R., Heinz, N., Hampf, M., Bujard, H. & Gossen, M. (2010).** Improved tet-responsive promoters with minimized background expression. *BMC Biotechnology* **10**, 81.
- Lu, H. H., El-Amin, S. F., Scott, K. D. & Laurencin, C. T. (2003).** Three-dimensional, bioactive, biodegradable, polymer-bioactive glass composite scaffolds with improved mechanical properties support collagen synthesis and mineralization of human osteoblast-like cells in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* **64**, 465–474.
- Malagarie-Cazenave, S., Olea-Herrero, N., Vara, D. & Diaz-Laviada, I. (2009).** Capsaicin, a component of red peppers, induces expression of androgen receptor via PI3K and MAPK pathways in prostate LNCaP cells. *FEBS Letters* **583**, 141–147.
- Mandadi, S., Tominaga, T., Numazaki, M., Murayama, N., Saito, N., Armati, P. J., Roufogalis, B. D. & Tominaga, M. (2006).** Increased sensitivity of desensitized TRPV1 by PMA occurs through PKCepsilon-mediated phosphorylation at S800. *Pain* **123**, 106–116.
- McKemy, D. D., Neuhausser, W. M. & Julius, D. (2002).** Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* **416**, 52–58.
- McLeod, R. L., Fernandez, X., Correll, C. C., Phelps, T. P., Jia, Y., Wang, X. & Hey, J. A. (2006).** TRPV1 antagonists attenuate antigen-provoked cough in ovalbumin sensitized guinea pigs. *Cough* **2**, 10.
- Miyake, T., Shirakawa, H., Nakagawa, T. & Kaneko, S. (2015).** Activation of mitochondrial transient receptor potential vanilloid 1 channel contributes to microglial migration. *Glia* **63**, 1870–1882.
- Monteith, G. R., McAndrew, D., Faddy, H. M. & Roberts-Thomson, S. J. (2007).** Calcium and cancer: targeting Ca<sup>2+</sup> transport. *Nature Reviews* **7**, 519–530.
- Montell, C. & Rubin, G. M. (1989).** Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* **2**, 1313–1323.

- Moran, M. M., McAlexander, M. A., Biro, T. & Szallasi, A. (2011).** Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nature Reviews* **10**, 601–620.
- Morelli, M. B., Amantini, C., Nabissi, M., Liberati, S., Cardinali, C., Farfariello, V., Tomassoni, D., Quaglia, W. & Piergentili, A. & other authors (2014).** Cross-talk between alpha1D-adrenoceptors and transient receptor potential vanilloid type 1 triggers prostate cancer cell proliferation. *BMC Cancer* **14**, 921.
- Moullan, N., Mouchiroud, L., Wang, X., Ryu, D., Williams, E. G., Mottis, A., Jovaisaite, V., Frochoux, M. V. & Quiros, P. M. & other authors (2015).** Tetracyclines disturb mitochondrial function across eukaryotic models: a call for caution in biomedical research. *Cell Reports* **10**, 1681-1691.
- Nilius, B. & Owsianik, G. (2010).** Transient receptor potential channelopathies. *European Journal of Physiology* **460**, 437–450.
- Nilius, B. & Owsianik, G. (2011).** The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biology* **12**, 218.
- Nilius, B., Owsianik, G., Voets, T. & Peters, J. A. (2007).** Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiological Reviews* **87**, 165–217.
- Oh, U., Hwang, S. W. & Kim, D. (1996).** Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurons. *The Journal of Neuroscience* **16**, 1659–1667.
- Olah, Z., Karai, L. & Iadarola, M. J. (2001).** Anandamide activates vanilloid receptor 1 (VR1) at acidic pH in dorsal root ganglia neurons and cells ectopically expressing VR1. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 31163–31170.
- Olayioye, M. A., Neve, R. M., Lane, H. A. & Hynes, N. E. (2000).** The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *The EMBO Journal* **19**, 3159–3167.
- Ouadid-Ahidouch, H., Dhennin-Duthille, I., Gautier, M., Sevestre, H. & Ahidouch, A. (2013).** TRP channels: diagnostic markers and therapeutic targets for breast cancer? *Trends in Molecular Medicine* **19**, 117–124.
- Palmer, C. P., Zhou, X. L., Lin, J., Loukin, S. H., Kung, C. & Saimi, Y. (2001).** A TRP homolog in *saccharomyces cerevisiae* forms an intracellular Ca<sup>2+</sup>-permeable channel in the yeast vacuolar membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 7801–7805.

- Pampaloni, F., Reynaud, E. G. & Stelzer, E. H. K. (2007).** The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Reviews* **8**, 839–845.
- Park, C.-K., Lu, N., Xu, Z.-Z., Liu, T., Serhan, C. N. & Ji, R.-R. (2011).** Resolving TRPV1- and TNF-alpha-mediated spinal cord synaptic plasticity and inflammatory pain with neuroprotectin D1. *The Journal of neuroscience* **31**, 15072–15085.
- Park, M. C., Jeong, H., Son, S. H., Kim, Y., Han, D., Goughnour, P. C., Kang, T., Kwon, N. H. & Moon, H. E. & other authors (2016).** Novel morphologic and genetic analysis of cancer cells in a 3D microenvironment identifies STAT3 as a regulator of tumor permeability barrier function. *Cancer Research* **76**, 1044–1054.
- Pecze, L., Blum, W., Henzi, T. & Schwaller, B. (2016).** Endogenous TRPV1 stimulation leads to the activation of the inositol phospholipid pathway necessary for sustained Ca<sup>2+</sup> oscillations. *Biochimica et Biophysica Acta* **1863**, 2905–2915.
- Pecze, L., Josvay, K., Blum, W., Petrovics, G., Vizler, C., Olah, Z. & Schwaller, B. (2016).** Activation of endogenous TRPV1 fails to induce overstimulation-based cytotoxicity in breast and prostate cancer cells but not in pain-sensing neurons. *Biochimica et Biophysica Acta* **1863**, 2054–2064.
- Phillips, E., Reeve, A., Bevan, S. & McIntyre, P. (2004).** Identification of species-specific determinants of the action of the antagonist capsazepine and the agonist PPAHV on TRPV1. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 17165–17172.
- Piccinini, F. (2015).** AnaSP: a software suite for automatic image analysis of multicellular spheroids. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* **119**, 43–52.
- Piccinini, F., Tesei, A., Arienti, C. & Bevilacqua, A. (2015).** Cancer multicellular spheroids: volume assessment from a single 2D projection. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* **118**, 95–106.
- Prat, A. & Perou, C. M. (2009).** Mammary development meets cancer genomics. *Nature Medicine* **15**, 842–844.
- Premkumar, L. S., Qi, Z.-H., van Buren, J. & Raisinghani, M. (2004).** Enhancement of potency and efficacy of NADA by PKC-mediated phosphorylation of vanilloid receptor. *Journal of Neurophysiology* **91**, 1442–1449.
- Pretze, M., Pallavi, P., Roscher, M., Klotz, S., Caballero, J., Binzen, U., Greffrath, W., Treede, R.-D. & Harmsen, M. C. & other authors (2016).** Radiofluorinated N-Octanoyl dopamine (18FF-NOD) as tool to study tissue distribution and elimination of NOD in vitro and in vivo. *Journal of Medicinal Chemistry* **59**, 9855-9865.

- Puopolo, M., Binshtok, A. M., Yao, G.-L., Oh, S. B., Woolf, C. J. & Bean, B. P. (2013).** Permeation and block of TRPV1 channels by the cationic lidocaine derivative QX-314. *Journal of Neurophysiology* **109**, 1704–1712.
- Raisinghani, M., Pabbidi, R. M. & Premkumar, L. S. (2005).** Activation of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) by resiniferatoxin. *The Journal of Physiology* **567**, 771–786.
- Ralevic, V., Kendall, D. A., Jerman, J. C., Middlemiss, D. N. & Smart, D. (2001).** Cannabinoid activation of recombinant and endogenous vanilloid receptors. *European Journal of Pharmacology* **424**, 211–219.
- Reilly, R. M., McDonald, H. A., Puttfarcken, P. S., Joshi, S. K., Lewis, L., Pai, M., Franklin, P. H., Segreti, J. A. & Neelands, T. R. & other authors (2012).** Pharmacology of modality-specific transient receptor potential vanilloid-1 antagonists that do not alter body temperature. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **342**, 416–428.
- Reubish, D., Emerling, D., Defalco, J., Steiger, D., Victoria, C. & Vincent, F. (2009).** Functional assessment of temperature-gated ion-channel activity using a real-time PCR machine. *BioTechniques* **47**, iii–ix.
- Rios, A. C., Fu, N. Y., Lindeman, G. J. & Visvader, J. E. (2014).** In situ identification of bipotent stem cells in the mammary gland. *Nature* **506**, 322–327.
- Rohrbach, P., Friedrich, O., Hentschel, J., Plattner, H., Fink, R. H. A. & Lanzer, M. (2005).** Quantitative calcium measurements in subcellular compartments of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 27960–27969.
- Saenger, Orth, Kisker, Hillen & Hinrichs (2000).** The tetracycline repressor-A paradigm for a biological switch. *Angewandte Chemie* **39**, 2042–2052.
- 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.
- Sanchez, M. G., Sanchez, A. M., Collado, B., Malagarie-Cazenave, S., Olea, N., Carmena, M. J., Prieto, J. C. & Diaz-Laviada I, I. (2005).** Expression of the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) in LNCaP and PC-3 prostate cancer cells and in human prostate tissue. *European Journal of Pharmacology* **515**, 20–27.
- Schneidereit, D., Kraus, L., Meier, J. C., Friedrich, O. & Gilbert, D. F. (2016).** Step-by-step guide to building an inexpensive 3D printed motorized positioning stage for automated high-content screening microscopy. *Biosensors & Bioelectronics* **92**, 472-481.

- Schwarz, S., Greffrath, W., Büsselberg, D. & Treede, R.-D. (2000).** Inactivation and tachyphylaxis of heat-evoked inward currents in nociceptive primary sensory neurones of rats. *The Journal of Physiology* **528**, 539–549.
- Seabrook, G. R., Sutton, K. G., Jarolimek, W., Hollingworth, G. J., Teague, S., Webb, J., Clark, N., Boyce, S. & Kerby, J. & other authors (2002).** Functional properties of the high-affinity TRPV1 (VR1) vanilloid receptor antagonist (4-hydroxy-5-iodo-3-methoxyphenylacetate ester) iodo-resiniferatoxin. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **303**, 1052–1060.
- Shapovalov, G., Lehen'kyi, V., Skryma, R. & Prevarskaya, N. (2011).** TRP channels in cell survival and cell death in normal and transformed cells. *Cell Calcium* **50**, 295–302.
- Shield, K., Ackland, M. L., Ahmed, N. & Rice, G. E. (2009).** Multicellular spheroids in ovarian cancer metastases: Biology and pathology. *Gynecologic Oncology* **113**, 143–148.
- Sidi, S., Friedrich, R. W. & Nicolson, T. (2003).** NompC TRP channel required for vertebrate sensory hair cell mechanotransduction. *Science* **301**, 96–99.
- Siemens, J., Zhou, S., Piskorowski, R., Nikai, T., Lumpkin, E. A., Basbaum, A. I., King, D. & Julius, D. (2006).** Spider toxins activate the capsaicin receptor to produce inflammatory pain. *Nature* **444**, 208–212.
- Sikand, P. & Premkumar, L. S. (2007).** Potentiation of glutamatergic synaptic transmission by protein kinase C-mediated sensitization of TRPV1 at the first sensory synapse. *The Journal of Physiology* **581**, 631–647.
- Sittampalam, G. S., Coussens, N. P., Brimacombe, K., Grossman, A., Arkin, M., Auld, D., Austin, C., Bejcek, B., Glicksman, M., Inglese, J., Iversen, P. W., Li, Z., McGee, J., McManus, O., Minor, L., Napper, A., Peltier, J. M., Riss, T., Trask, O. J. O. J. & Weidner, J., eds. (2004).** *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD).
- Smart, D., Jerman, J. C., Gunthorpe, M. J., Brough, S. J., Ranson, J., Cairns, W., Hayes, P. D., Randall, A. D. & Davis, J. B. (2001).** Characterisation using FLIPR of human vanilloid VR1 receptor pharmacology. *European Journal of Pharmacology* **417**, 51–58.
- Song, K., Wang, H., Kamm, G. B., Pohle, J., Reis, F. d. C., Heppenstall, P., Wende, H. & Siemens, J. (2016).** The TRPM2 channel is a hypothalamic heat sensor that limits fever and can drive hypothermia. *Science* **353**, 1393–1398.
- Story, G. M., Peier, A. M., Reeve, A. J., Eid, S. R., Mosbacher, J., Hricik, T. R., Earley, T. J., Hergarden, A. C. & Andersson, D. A. & other authors (2003).** ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* **112**, 819–829.

- Sun, Y., Liu, L., Ben-Shahar, Y., Jacobs, J. S., Eberl, D. F. & Welsh, M. J. (2009).** TRPA channels distinguish gravity sensing from hearing in Johnston's organ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 13606–13611.
- 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.
- Szallasi, A., Blumberg, P. M., Annicelli, L. L., Krause, J. E. & Cortright, D. N. (1999).** The cloned rat vanilloid receptor VR1 mediates both R-type binding and C-type calcium response in dorsal root ganglion neurons. *Molecular Pharmacology* **56**, 581–587.
- Thoennissen, N. H., O'Kelly, J., Lu, D., Iwanski, G. B., La, D. T., Abbassi, S., Leiter, A., Karlan, B., Mehta, R. & Koeffler, H. P. (2010).** Capsaicin causes cell-cycle arrest and apoptosis in ER-positive and -negative breast cancer cells by modulating the EGFR/HER-2 pathway. *Oncogene* **29**, 285–296.
- Thomas, C. H., Collier, J. H., Sfeir, C. S. & Healy, K. E. (2002).** Engineering gene expression and protein synthesis by modulation of nuclear shape. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 1972–1977.
- Tibbitt, M. W. & Anseth, K. S. (2009).** Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnology and Bioengineering* **103**, 655–663.
- 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.
- Toth, A., Boczan, J., Kedei, N., Lizanecz, E., Bagi, Z., Papp, Z., Edes, I., Csiba, L. & Blumberg, P. M. (2005).** Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. *Brain Research* **135**, 162–168.
- Toth, A., Kedei, N., Szabo, T., Wang, Y. & Blumberg, P. M. (2002).** Thapsigargin binds to and inhibits the cloned vanilloid receptor-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **293**, 777–782.
- Toth, A., Kedei, N., Wang, Y. & Blumberg, P. M. (2003).** Arachidonyl dopamine as a ligand for the vanilloid receptor VR1 of the rat. *Life Sciences* **73**, 487–498.
- Toth, A., Wang, Y., Kedei, N., Tran, R., Pearce, L. V., Kang, S.-U., Jin, M.-K., Choi, H.-K., Lee, J. & Blumberg, P. M. (2005).** Different vanilloid agonists cause different patterns of calcium response in CHO cells heterologously expressing rat TRPV1. *Life Sciences* **76**, 2921–2932.

- Tsagogiorgas, C., Wedel, J., Hottenrott, M., Schneider, M. O., Binzen, U., Greffrath, W., Treede, R.-D., Theisinger, B. & Theisinger, S. & other authors (2012).** N-octanoyl-dopamine is an agonist at the capsaicin receptor TRPV1 and mitigates ischemia-induced corrected acute kidney injury in rat. *PloS One* **7**, e43525.
- Turner, H., Fleig, A., Stokes, A., Kinet, J.-P. & Penner, R. (2003).** Discrimination of intracellular calcium store subcompartments using TRPV1 (transient receptor potential channel, vanilloid subfamily member 1) release channel activity. *The Biochemical Journal* **371**, 341–350.
- Valenzano, K. J., Grant, E. R., Wu, G., Hachicha, M., Schmid, L., Tafesse, L., Sun, Q., Rotshteyn, Y. & Francis, J. & other authors (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. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **306**, 377–386.
- van den Dolder, J., Spauwen, P. H. M. & Jansen, J. A. (2003).** Evaluation of various seeding techniques for culturing osteogenic cells on titanium fiber mesh. *Tissue Engineering* **9**, 315–325.
- Varga, A., Nemeth, J., Szabo, A., McDougall, J. J., Zhang, C., Elekes, K., Pinter, E., Szolcsanyi, J. & Helyes, Z. (2005).** Effects of the novel TRPV1 receptor antagonist SB366791 in vitro and in vivo in the rat. *Neuroscience Letters* **385**, 137–142.
- Vay, L., Gu, C. & McNaughton, P. A. (2012).** The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. *British Journal of Pharmacology* **165**, 787–801.
- Veldhuis, N. A., Lew, M. J., Abogadie, F. C., Poole, D. P., Jennings, E. A., Ivanusic, J. J., Eilers, H., Bunnett, N. W. & McIntyre, P. (2012).** N-glycosylation determines ionic permeability and desensitization of the TRPV1 capsaicin receptor. *The Journal of Biological Chemistry* **287**, 21765–21772.
- Vergani, L., Grattarola, M. & Nicolini, C. (2004).** Modifications of chromatin structure and gene expression following induced alterations of cellular shape. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **36**, 1447–1461.
- Veronesi, B. (2005).** The TRPV1 receptor. target of toxicants and therapeutics. *Toxicological Sciences* **89**, 1–3.
- Vriens, J., Appendino, G. & Nilius, B. (2009).** Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels. *Molecular Pharmacology* **75**, 1262–1279.

- Walker, R. G. (2000).** A *Drosophila* mechanosensory transduction channel. *Science* **287**, 2229–2234.
- Walpole, C. S. J., Wrigglesworth, R., Bevan, S., Campbell, E. A., Dray, A., James, I. F., Masdin, K. J., Perkins, M. N. & Winter, J. (1993).** Analogs of capsaicin with agonist activity as novel analgesic agents; structure-activity studies. 2. The amide bond "B-region". *Journal of Medical Chemistry* **36**, 2373–2380.
- Weber, L. V., Al-Refae, K., Wolk, G., Bonatz, G., Altmüller, J., Becker, C., Gisselmann, G. & Hatt, H. (2016).** Expression and functionality of TRPV1 in breast cancer cells. *Breast Cancer* **8**, 243–252.
- Welman, A., Barraclough, J. & Dive, C. (2007).** Tetracycline regulated systems in functional oncogenomics. *Translational Oncogenomics* **2**, 17–33.
- White, J. P. M., Urban, L. & Nagy, I. (2011).** TRPV1 function in health and disease. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **12**, 130–144.
- Willerth, S. M., Arendas, K. J., Gottlieb, D. I. & Sakiyama-Elbert, S. E. (2006).** Optimization of fibrin scaffolds for differentiation of murine embryonic stem cells into neural lineage cells. *Biomaterials* **27**, 5990–6003.
- Witte, D. G., Cassar, S. C., Masters, J. N., Esbenshade, T. & Hancock, A. A. (2002).** Use of a fluorescent imaging plate reader-based calcium assay to assess pharmacological differences between the human and rat vanilloid receptor. *Journal of Biomolecular Screening* **7**, 466–475.
- Wong, G. Y. & Gavva, N. R. (2009).** Therapeutic potential of vanilloid receptor TRPV1 agonists and antagonists as analgesics: Recent advances and setbacks. *Brain Research Reviews* **60**, 267–277.
- Wu, T. T. L., Peters, A. A., Tan, P. T., Roberts-Thomson, S. J. & Monteith, G. R. (2014).** Consequences of activating the calcium-permeable ion channel TRPV1 in breast cancer cells with regulated TRPV1 expression. *Cell Calcium* **56**, 59–67.
- Xu, H., Delling, M., Jun, J. C. & Clapham, D. E. (2006).** Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nature Neuroscience* **9**, 628–635.
- Xu, H., Ramsey, I. S., Kotecha, S. A., Moran, M. M., Chong, J. A., Lawson, D., Ge, P., Lilly, J. & Silos-Santiago, I. & other authors (2002).** TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* **418**, 181–186.

- Xue, T., Do, M. T. H., Riccio, A., Jiang, Z., Hsieh, J., Wang, H. C., Merbs, S. L., Welsbie, D. S. & Yoshioka, T. & other authors (2011).** Melanopsin signalling in mammalian iris and retina. *Nature* **479**, 67–73.
- Yajuan, X., Xin, L. & Zhiyuan, L. (2012).** A comparison of the performance and application differences between manual and automated patch-clamp techniques. *Current Chemical Genomics* **6**, 87–92.
- Yang, B. H., Piao, Z. G., Kim, Y.-B., Lee, C.-H., Lee, J. K., Park, K., Kim, J. S. & Oh, S. B. (2003).** Activation of vanilloid receptor 1 (VR1) by eugenol. *Journal of Dental Research* **82**, 781–785.
- Yee, N. S., Zhou, W. & Lee, M. (2010).** Transient receptor potential channel TRPM8 is over-expressed and required for cellular proliferation in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Letters* **297**, 49–55.
- Yiangou, Y., Facer, P., Ford, A., Brady, C., Wiseman, O., Fowler, C. J. & Anand, P. (2001).** Capsaicin receptor VR1 and ATP-gated ion channel P2X3 in human urinary bladder. *BJU International* **87**, 774–779.
- Yu, H.-b., Li, M., Wang, W.-p. & Wang, X.-l. (2016).** High throughput screening technologies for ion channels. *Acta Pharmacologica Sinica* **37**, 34–43.
- Zanoni, M., Piccinini, F., Arienti, C., Zamagni, A., Santi, S., Polico, R., Bevilacqua, A. & Tesei, A. (2016).** 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Scientific Reports* **6**, 19103.
- Zhang, Chung & Oldenburg (1999).** A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *Journal of Biomolecular Screening* **4**, 67–73.
- Zhang, L. & Barritt, G. J. (2004).** Evidence that TRPM8 is an androgen-dependent Ca<sup>2+</sup> channel required for the survival of prostate cancer cells. *Cancer Research* **64**, 8365–8373.
- Zhang, Y., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Mueller, K. L., Cook, B., Wu, D., Zuker, C. S. & Ryba, N. J. P. (2003).** Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* **112**, 293–301.
- Zheng, J. (2013).** Molecular mechanism of TRP channels. *Comprehensive Physiology* **3**, 221–242.
- Zhou, X., Vink, M., Klaver, B., Berkhout, B. & Das, A. T. (2006).** Optimization of the Tet-On system for regulated gene expression through viral evolution. *Gene Therapy* **13**, 1382–1390.

**Zhou, X.-L., Loukin, S. H., Coria, R., Kung, C. & Saimi, Y. (2005).** Heterologously expressed fungal transient receptor potential channels retain mechanosensitivity in vitro and osmotic response in vivo. *European Biophysics Journal* **34**, 413–422.

**Zhu, M. X. (2011).** *TRP Channels*. Hoboken: CRC Press.

**Zicha, S., Radresa, O., Laplante, P., Morton, M., Jones, K., Main, M., Trivedi, S., Julien, R. P. & Griffin, A. & other authors (2013).** Novel methodology to identify TRPV1 antagonists independent of capsaicin activation. *Journal of Biomolecular Screening* **18**, 544–555.

**Zietarska, M., Maugard, C. M., Filali-Mouhim, A., Alam-Fahmy, M., Tonin, P. N., Provencher, D. M. & Mes-Masson, A.-M. (2007).** Molecular description of a 3D in vitro model for the study of epithelial ovarian cancer (EOC). *Molecular Carcinogenesis* **46**, 872–885.

**Zygmunt, P. M., Petersson, J., Andersson, D. A., Chuang, H., Sorgard, M., Di Marzo, V., Julius, D. & Hogestatt, E. D. (1999).** Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* **400**, 452–457.

## **DANKSAGUNG**

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke im Besonderen Herrn Prof. Dr. Reinhard Fischer für die Ermöglichung meiner Promotion und die Betreuung der Doktorarbeit.

Ich danke Frau Prof. Dr. Petra Kioschis für die Überlassung des Themas, die Betreuung an der Hochschule Mannheim und die Übernahme des Korreferats. Ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft haben wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Ein ganz herzlicher Dank gilt Andreas Holloschi für die fachlichen Diskussionen, Hilfsbereitschaft und seinen beständigen Optimismus.

Ich danke Sebastian Schwamb, Friedel Heintz, Franziska Wild, Anett Pomowski, Ariane Tomsche, Alex Lang, Katharina Wieden, Anne Wursthorn, Hella-Monika Kuhn sowie allen weiteren Professoren, Mitarbeitern, Doktoranden und HiWis des MZB-Labors für die fachliche Unterstützung und die schöne gemeinsame Zeit.

Ich danke dem BMBF für die finanzielle Förderung im Rahmen des NANOKAT-Promotionskollegs.

Meiner Familie und meinen Freunden gilt mein besonderer Dank, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

