

Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Thomas Gudermann



***Einfluss simulierter Körpertemperaturänderungen auf die
Signalweiterleitung und Genexpression in hypothalamischen Zellen***

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Dennis Michael Thomas Faro

aus

München

Jahr

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

| | |
|-----------------------------|---------------------------------------|
| Betreuerin: | Prof. Dr. rer. nat. Ingrid Boekhoff |
| Zweitgutachter: | Prof. Dr. rer. nat. Alexander Faußner |
| Dekan: | Prof. Dr. med. Thomas Gudermann |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 12.04.2022 |

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht in:

Faro, D., Boekhoff, I., Gudermann, T., Breit, A. (2021) Physiological temperature changes fine-tune β_2 -adrenergic receptor-induced cytosolic cAMP accumulation. Molecular Pharmacology

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Zusammenfassung | 10 |
| Abstract | 12 |
| 1. Einleitung..... | 14 |
| 1.1 Körpertemperatur | 14 |
| 1.1.1 Physiologische Körpertemperatur | 14 |
| 1.1.2 Pathophysiologische Körpertemperatur..... | 15 |
| 1.1.3 Die Regulation der Körpertemperatur | 15 |
| 1.1.4 Der <i>Nucleus suprachiasmaticus</i> und der circadiane Rhythmus | 17 |
| 1.2 Temperatursensitive Proteine mit Signalwirkung..... | 20 |
| 1.2.1 Hitzeschockproteine | 20 |
| 1.2.2 Kälteschockproteine | 22 |
| 1.2.3 <i>Transient receptor potential</i> -Kanäle..... | 24 |
| 1.2.4 Thermodynamische Prozesse | 27 |
| 1.3 Aufbau und Funktion des <i>Nucleus paraventricularis</i> | 29 |
| 1.3.1 Allgemeines | 29 |
| 1.3.2 Die Appetitregulation | 29 |
| 1.3.2.1 Thyreotroper Regelkreis | 31 |
| 1.3.2.2 Transkriptionsfaktor <i>cAMP response element-binding protein</i> | 32 |
| 1.3.2.3 Transkriptionsfaktoren <i>signal transducers and activators of transcription</i> | 35 |
| 1.3.2.4 Transkriptionsfaktoren <i>forkhead-box</i> -Protein O | 36 |
| 1.3.3 Die Thermogenese | 37 |
| 1.3.4 Verwendetes Zellsystem mHypoA-2/10..... | 40 |
| 1.4 G-Protein gekoppelte Rezeptoren | 41 |
| 1.4.1 Bradykininrezeptoren | 42 |
| 1.4.2 Die β_2 -Adrenozeptor-vermittelte cAMP-Produktion..... | 44 |
| 1.4.2.1 Ligandenbindung und G-Proteinaktivierung | 45 |
| 1.4.2.2 Adenylatzyklaseaktivität | 48 |
| 1.4.2.3 Rezeptordesensibilisierung | 50 |
| 1.4.2.4 Phosphodiesterase-Aktivität..... | 51 |
| 1.4.2.5 Transport von cAMP in den Extrazellularraum | 54 |
| 1.5 Zielsetzung | 55 |
| 2. Material..... | 58 |
| 2.1 Geräte | 58 |
| 2.2 Verbrauchsmaterialien | 59 |
| 2.2.1 Zellkultur | 59 |
| 2.2.2 Nährmedien..... | 59 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.2.3 | Reagenzien | 59 |
| 2.2.4 | Agonisten und Antagonisten | 60 |
| 2.2.5 | Antikörper | 61 |
| 2.2.6 | siRNA | 61 |
| 2.3 | Molekularbiologie | 61 |
| 2.3.1 | Bakterien | 61 |
| 2.3.2 | Plasmide | 62 |
| 2.3.3 | Reportergenkonstrukte | 62 |
| 2.4 | Verwendete Zelllinien | 62 |
| 3. | Methoden..... | 63 |
| 3.1 | Methoden der Zellkultur..... | 63 |
| 3.1.1 | Kultivierung von Zellen | 63 |
| 3.1.2 | Kryokonservierung | 64 |
| 3.1.3 | Auftauen kryokonservierter Zellen | 64 |
| 3.1.4 | Beschichtung von Mikrotiterplatten zur Förderung der Adhärenz | 65 |
| 3.1.5 | Präparation von Zellmembranen | 65 |
| 3.2 | Funktionelle Analysen..... | 66 |
| 3.2.1 | Bestimmung der Luciferaseaktivität | 66 |
| 3.2.1.1 | Messung der Luciferaseaktivität bei 37 °C | 67 |
| 3.2.1.2 | Messung der Luciferaseaktivität in Abhängigkeit von der Temperatur | 68 |
| 3.2.2 | Quantitative Echtzeit reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion | 70 |
| 3.2.2.1 | RNA-Isolierung | 70 |
| 3.2.2.2 | DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung | 71 |
| 3.2.2.3 | Reverse Transkription | 71 |
| 3.2.2.4 | Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion..... | 72 |
| 3.2.3 | Totale RNA-Sequenzierung | 75 |
| 3.2.4 | Bestimmung der intrazellulären Ca ²⁺ -Konzentration | 76 |
| 3.3 | Radiobiochemische Methoden | 77 |
| 3.3.1 | Bestimmung der Ligandenbindung..... | 77 |
| 3.3.1.1 | Sättigungsbindung | 77 |
| 3.3.1.2 | Kompetitive Bindungsexperimente | 78 |
| 3.3.1.3 | Bestimmung der Ligandenbindung an ganzen Zellen. | 79 |
| 3.3.1.4 | Messung der Endozytoserate | 80 |
| 3.3.1.5 | Beendigung der Reaktion | 81 |
| 3.3.2 | Bestimmung der cAMP-Konzentration | 82 |
| 3.3.2.1 | Bestimmung nach Inkubation im akuten Programm | 82 |
| 3.3.2.2 | Bestimmung nach Inkubation im circadianen Programm | 83 |
| 3.3.2.3 | Beendigung der Reaktion | 83 |
| 3.3.2.4 | Sequenzielle Säulenchromatographie..... | 83 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 3.3.3 | Messung der G-Proteinaktivierung..... | 84 |
| 3.3.4 | Messung der Phosphodiesteraseaktivität | 86 |
| 3.3.4.1 | Biosynthese von ^3H -cAMP durch mHypoA-2/10-Zellen | 86 |
| 3.3.4.2 | Verwendung von kommerziell erworbenen ^3H -cAMP | 87 |
| 3.3.5 | Flüssigszintillationsmessung | 88 |
| 3.4 | Proteinnachweis | 89 |
| 3.4.1 | Herstellung von Proteinlysaten..... | 89 |
| 3.4.2 | Polyacrylamidgelelektrophorese..... | 89 |
| 3.4.3 | Western Blot | 90 |
| 3.5 | Molekularbiologische Methoden | 91 |
| 3.5.1 | Transfektion..... | 91 |
| 3.5.1.1 | Transfektion mit TurboFect™ | 92 |
| 3.5.1.2 | Transfektion von siRNA mittels Elektroporation | 92 |
| 3.5.1.3 | Herstellung stabil exprimierender Zellen..... | 93 |
| 3.5.2 | Herstellung kompetenter Bakterien | 94 |
| 3.5.3 | Transformation kompetenter Bakterien durch Hitzeschock | 94 |
| 3.5.4 | Plasmidisolation..... | 95 |
| 3.6 | Graphische Auswertung der Messergebnisse | 96 |
| 3.6.1 | Allgemeines | 96 |
| 3.6.2 | Normierung auf 37 °C | 96 |
| 3.6.3 | Berechnung der induzierten Aktivität und der Normierung auf 38 °C.... | 98 |
| 3.6.4 | Verwendung von Inhibitoren..... | 100 |
| 3.6.5 | Normierung der Daten aus der Dosis-Wirkungs-Kurve | 102 |
| 3.6.6 | mRNA-Expression mittels qRT-PCR..... | 102 |
| 3.6.7 | Berechnung der Ligandenbindung..... | 103 |
| 3.6.8 | Berechnung der hochaffinen Bindestelle..... | 104 |
| 3.6.9 | Endozytoserate..... | 104 |
| 3.6.10 | Phosphodiesteraseaktivität..... | 105 |
| 3.7 | Statistische Methoden | 106 |
| 4. | Ergebnisse | 107 |
| 4.1 | Etablierung der Temperaturinkubatoren und -programme | 107 |
| 4.1.1 | Akutes Programm (AP) | 108 |
| 4.1.2 | Circadianes Programm (CP)..... | 108 |
| 4.1.3 | 37 °C-Kontrollinkubation | 109 |
| 4.1.4 | Kontrolle der Inkubatoren..... | 111 |
| 4.2 | Einfluss der Temperatur auf die basale Promotoraktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren | 112 |
| 4.2.1 | Einfluss von Temperaturänderungen auf die basale BMAL1-Promotoraktivität | 112 |
| 4.2.2 | Einfluss von Temperaturänderungen auf die basale CREB-, STAT- und FOXO-Promotoraktivität im CP | 115 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 4.2.3 | Einfluss von Temperaturänderungen auf die basale CREB-, STAT- und FOXO-Promotoraktivität im AP | 117 |
| 4.2.4 | Einfluss von Temperaturänderungen auf die basale prepro-TRH-Promotoraktivität..... | 120 |
| 4.2.5 | Weitere Charakterisierung des cAMP-abhängigen Signalwegs | 121 |
| 4.2.5.1 | Erweiterung der untersuchten Kinetik..... | 121 |
| 4.2.5.2 | Erweiterung der untersuchten Inkubationstemperatur | 123 |
| 4.2.6 | Temperatursensitive Proteine mit Signalwirkung im Hypothalamus ... | 125 |
| 4.2.6.1 | Hitzeschockproteine | 125 |
| 4.2.6.2 | Kälteinduzierte Proteine | 127 |
| 4.2.6.3 | TRP-Kanäle | 133 |
| 4.3 | Einfluss der Temperatur auf die Liganden-induzierte Reporteraktivität.... | 139 |
| 4.3.1 | Einfluss auf die CRE-Reporteraktivität | 140 |
| 4.3.1.1 | Bradykininrezeptoren | 140 |
| 4.3.1.2 | Adrenerge Rezeptoren | 142 |
| 4.3.2 | Einfluss auf die prepro-TRH-Promotoraktivität | 144 |
| 4.3.3 | Einfluss auf die STAT-Promotoraktivität | 145 |
| 4.4 | Untersuchung der β -AR-induzierten cAMP-Produktion..... | 147 |
| 4.4.1 | Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor | 147 |
| 4.4.1.1 | Bestimmung der Sättigungsbindung | 148 |
| 4.4.1.2 | Untersuchung der Affinität zwischen Liganden und dem β_2 -AR... | 149 |
| 4.4.1.3 | Einfluss der Temperatur auf die Rezeptorkonformation | 153 |
| 4.4.1.4 | Rezeptorendozytose und -abbau..... | 157 |
| 4.4.2 | Untersuchung der G-Proteinaktivierung | 160 |
| 4.4.2.1 | Verwendung von [35 S]-GTP γ S..... | 160 |
| 4.4.2.2 | Bindung von Sal an intakte mHypoA-2/10-Zellen..... | 162 |
| 4.4.3 | Untersuchung der cAMP-Konzentration | 163 |
| 4.4.3.1 | Untersuchung der basalen cAMP-Akkumulation..... | 163 |
| 4.4.3.2 | Untersuchung der temperaturabhängigen Liganden-induzierten cAMP-Akkumulation..... | 166 |
| 4.4.3.3 | Vergleich der cAMP-Akkumulation zu einer 37 °C-Kontrollinkubation | 168 |
| 4.4.3.4 | Temperaturabhängige Dosis-Wirkungs-Beziehung | 169 |
| 4.4.3.5 | Kinetik der NA-induzierten cAMP-Akkumulation | 172 |
| 4.4.3.6 | Extrazelluläre cAMP-Akkumulation bei 37 °C..... | 174 |
| 4.4.3.7 | Extrazelluläre cAMP-Akkumulation in Abhängigkeit von der Temperatur | 177 |
| 4.4.4 | Untersuchung der Phosphodiesteraseaktivität | 180 |
| 4.4.4.1 | Etablierung der Messmethode | 180 |
| 4.4.4.2 | Temperaturabhängige Phosphodiesteraseaktivität | 184 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 4.5 | Übertragbarkeit der Befunde auf weitere Zellsysteme..... | 186 |
| 4.5.1 | Überprüfung der induzierbaren cAMP-Akkumulation bei 37 °C | 186 |
| 4.5.2 | Untersuchung der temperaturabhängigen induzierten cAMP-Akkumulation..... | 188 |
| 5. | Diskussion | 191 |
| 5.1 | Temperaturabhängigkeit des CRE-Promotors | 193 |
| 5.2 | Beteiligung temperatursensitiver Proteine an der CRE-Aktivität..... | 195 |
| 5.3 | Temperaturabhängige cAMP-Akkumulation..... | 200 |
| 5.4 | cAMP-Efflux und PDE-Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur | 205 |
| 5.5 | Modell der NA-induzierten Regulation des intrazellulären cAMP-Spiegels | 208 |
| 5.6 | Diskussion der verwendeten Temperaturprogramme | 210 |
| 5.7 | Spezifität der Befunde..... | 213 |
| 5.8 | Zusammenfassung und Ausblick | 215 |
| | Literaturverzeichnis | 217 |
| | Anhang | 258 |
| | Abbildungsverzeichnis | 258 |
| | Tabellenverzeichnis | 261 |
| | Abkürzungsverzeichnis | 262 |
| | Strukturformeln der verwendeten Agonisten und Inhibitoren | 265 |
| | Publikationsliste | 268 |
| | Affidavit | 269 |
| | Danksagung | 270 |

Zusammenfassung

In homoiothermen Lebewesen haben sich Mechanismen dahingehend entwickelt, dass die Körpertemperatur in einem circadianen Rhythmus oszilliert: In Ruhephasen ist die Temperatur verringert, während sie in Phasen gesteigerter Aktivität erhöht ist. Somit sind alle Körperzellen im Tagesverlauf kleinen Temperaturschwankungen ausgesetzt. Obwohl diese physiologischen Körpertemperaturänderungen ausgiebig untersucht wurden, liegen aktuell wenige Erkenntnisse zu möglichen Auswirkungen auf zelluläre Vorgänge, wie Rezeptoraktivierung oder Genexpression, vor.

In der vorliegenden Arbeit wurden eine murine hypothalamische Zelllinie, die Thyreoliberin [engl. *thyrotropin-releasing-hormone* (TRH)]-positiven Zellen des *Nucleus paraventricularis* ähnelt, sowie Präzisionsthermoinkubatoren verwendet, um die Effekte von Temperaturänderungen von ± 1 °C auf die basale Promotoraktivität des *brain and muscle ARNT-like 1* (BMAL1)-, *cAMP-response element binding protein* (CREB)-, *signal transducers and activators of transcription* (STAT)- und *forkhead box protein O* (FOXO)-abhängigen Reporters zu untersuchen. Die Aktivität der Promotoren war von direkten Temperaturänderungen im physiologischen Bereich (35,5 – 38,5 °C) abhängig. Eine Ausnahme stellte der FOXO-abhängige Promotor dar, welcher erst nach Simulation circadianer Temperaturwechsel moduliert wurde. Des Weiteren konnten temperatursensitive Proteine mit Signalwirkung identifiziert werden, die als Temperatursensoren agieren und zelluläre Ereignisse auslösen können. Es konnte gezeigt werden, dass *transient receptor potential channel melastatin-related* (TRPM)-Inhibitoren den temperaturbedingten Unterschied in der CREB-Aktivierung signifikant reduzieren.

Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass temperaturabhängig eine erhöhte Noradrenalin-, Salmeterol- und Forskolin-induzierte cAMP-Akkumulation mit einem erhöhten Maximaleffekt bei 36 gegenüber 38 °C eintrat. Die Aktivierung G-Proteingekoppelter Rezeptoren (GPCR), wie dem β_2 -Adrenozeptor, mit einer einhergehenden Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels, ist für eine Vielzahl physiologischer Vorgänge essenziell. Zelluläre Prozesse, die zu einer cAMP-Akkumulation führen, wie die Bindung an Rezeptoren mit nachfolgender G-Proteinaktivierung, sowie Mechanismen, die zu einer Beendigung der Signalkaskade führen, wie cAMP-Efflux und Phosphodiesteraseaktivität, wurden eingehend bezüglich der Auswirkung von Temperaturänderungen untersucht. In der vorliegenden Arbeit wird ein Mechanismus der

Feinabstimmung des intrazellulären cAMP-Spiegels nach Stimulierung mit Noradrenalin unter Beteiligung von temperaturabhängigem Efflux und Phosphodiesteraseaktivität vorgeschlagen. Damit kann ein bislang unterschätzter Zusammenhang zwischen der Körpertemperatur und der Aktivierung von Klasse A GPCRs hergestellt und beschrieben werden.

Auf diesen Befunden basierend wurde die Aktivität des prepro-TRH-Promotors nach Temperaturänderungen untersucht. In mHypoA-2/10-Zellen war sowohl die basale Aktivität des Promotors als auch die Noradrenalin-induzierte Promotoraktivierung von physiologischen Temperaturänderungen abhängig. Schließlich konnten diese Befunde teilweise noch auf weitere Zellsysteme und primäre Zelllinien übertragen werden.

Abstract

In the process of evolution mechanisms developed in homeothermic animals where core body temperature fluctuates in a circadian manner with lowest temperatures when the organism is resting and highest temperatures in its active phases. Consequently, all cells in the body are subject to subtle temperature changes in a 24-h rhythm. Even though these physiological body temperature changes are very well established, little is known so far whether and how they act on cellular events like receptor activation or gene expression.

In this work a murine hypothalamic cell line resembling thyrotropin-releasing hormone (TRH) positive neurons of the *Nucleus paraventricularis* and high-precision temperature incubators were employed to investigate the effects of temperature changes of ± 1 °C on basal transcription activity of a brain and muscle ARNT-like 1 (BMAL1)-, cAMP-responsive element binding protein (CREB)-, signal transducers and activators of transcription (STAT)- and forkhead box protein O (FOXO)-dependent reporter. It was found that all promoters were sensitive to temperature changes within the physiological range (35,5 – 38,5 °C) except for the FOXO-dependent promoter, where it was necessary to simulate circadian-like temperature fluctuations to induce temperature sensitivity. Moreover, we aimed to identify temperature sensitive proteins, like transient receptor potential (TRP) channels and cold-inducible proteins, which could act as temperature sensors and translate said temperature changes into cellular events. Inhibitors of the melastatin-related TRP subfamily were able to significantly reduce temperature-promoted differences in CREB-promoter activity.

Also, temperature-sensitive cAMP-formation in response to norepinephrine, salmeterol or forskolin was shown, with higher efficacy at 36 compared to 38 °C. Increasing cytosolic cAMP levels by activation of G protein-coupled receptors (GPCRs) such as the β_2 -adrenergic receptor (β_2 -AR) is essential for a plethora of physiological processes. Herein, first data linking physiologically relevant temperature fluctuations to β_2 -AR-induced cAMP signaling are provided by dissecting cellular events leading to cAMP-formation and the termination of the signaling cascade. In this work a model for the fine-tuning of the β_2 -AR-induced intracellular cAMP-level with participation of temperature dependent cAMP-efflux and phosphodiesterase activity is suggested. Hence, a so far unappreciated role for body temperature as a modulator of a class A GPCR is presented.

Based on these results, the activation of the prepro-TRH promoter in response to temperature changes was investigated. In mHypoA-2/10 cells the promoter activity was highly dependent on simulated body temperature changes on a basal level as well as after stimulation with norepinephrine. Finally, the aforementioned findings could be transferred in part to different cell lines and primary cells.

1. Einleitung

1.1 Körpertemperatur

1.1.1 Physiologische Körpertemperatur

Die durchschnittliche Körpertemperatur eines gesunden Erwachsenen beträgt 37,0 °C. Dieser Wert wurde erstmals in der Forschungsarbeit von Carl Reinhold August Wunderlich „Das Verhalten der Eigenwärme in Krankheiten“ (Wunderlich 1871) systematisch bestimmt. Wunderlich untersuchte die Körpertemperatur an einem Kollektiv von etwa 20 000 Patienten. Zu seinen Beobachtungen zählte einerseits der Einfluss von Alter, Geschlecht und Gesundheitszustand auf die Körpertemperatur und andererseits deren Oszillation in einem 24-h Rhythmus. Der Unterschied zwischen minimaler und maximaler Temperatur innerhalb eines Tages betrug etwa 0,5 – 1,0 °C. Die niedrigste Temperatur wurde in den frühen Morgenstunden, die höchste Temperatur in den frühen Abendstunden gemessen (Wunderlich 1871).

Neuere Studien zeigten eine durchschnittliche Körpertemperatur zwischen 35,5 °C und 37,0 °C (Sund-Levander, Forsberg et al. 2002, Lim, Byrne et al. 2008, White, Bosio et al. 2011, Dakappa and Mahabala 2015, Obermeyer, Samra et al. 2017, Reitman 2018, Chen 2019). Auch in diesen Studien konnten rhythmische Körpertemperaturänderungen im Tagesverlauf beobachtet werden: Die Körpertemperatur ist zwischen 03:00 Uhr und 06:00 Uhr am niedrigsten und zwischen 16:00 Uhr und 21:00 Uhr am höchsten (Gleeson 1998). Der Unterschied zwischen den Temperaturextrema beträgt etwa 1 °C, wobei abhängig vom untersuchten Individuum deutliche Abweichungen registriert werden können (Vansomeren 2000).

Diese Temperaturoszillationen, die circadian (lateinisch *circa* „ungefähr, etwa“; *dies* „Tag“) auftreten, das heißt etwa in einem 24-h-Rhythmus, sind für alle homoiothermen Lebewesen bekannt und können je nach Spezies variieren (Honma and Hiroshige 1978, Melanie, Kittrell et al. 1988, Prinzinger, Preßmar et al. 1991, Refinetti and Menaker 1992, Lee, Iida et al. 2005, Smith, Barnes et al. 2006, Liu, Li et al. 2007, Piccione, Fazio et al. 2009, Basso, Del Bello et al. 2016). Für Mäuse (*Mus musculus*) beispielsweise, konnte eine durchschnittliche Körpertemperatur von 37 °C mit einem tageszeitabhängigen Minimum von etwa 35,5 °C und Maximum von etwa 38,5 °C gezeigt werden (Kluger,

Conn et al. 1990, Conn, Franklin et al. 1991). Die täglichen Temperaturosillationen betragen hier also bis zu 3 °C.

1.1.2 Pathophysiologische Körpertemperatur

Findet eine gezielte Erhöhung der Körpertemperatur über den physiologischen Bereich hinaus statt ($> 37,9$ °C), so spricht man von Fieber (Bartfai and Conti 2010). Wenngleich gezeigt wurde, dass durch die Erhöhung der Körpertemperatur in febrilere Bereiche die Symptomatik und Überlebensrate des Individuums signifikant verbessert wird, sind die exakten Gründe hierfür bislang nicht vollständig geklärt (Ogoina 2011). Eine Erhöhung der Temperatur führt möglicherweise direkt zu einer Schädigung des Krankheitserregers (Long, Bliss et al. 1933, Kuhn 1949, Hasday and Singh 2000). So können erhöhte Konzentrationen an Hitzeschockproteinen (HSP) einerseits protektive Antworten in Wirtszellen, wie beispielsweise vermehrte Aktivität von Hämooxygenase-1 und Cu/Zn-Superoxiddismutase auslösen, oder andererseits indirekt cytotoxische Effekte auf die Erregerzelle durch Rekrutierung des Immunsystems bewirken (Ewing and Maines 1991, Jiang, Detolla et al. 1999). Es konnte ferner gezeigt werden, dass die Effektivität des Immunsystems direkt beeinflusst wird (Evans, Repasky et al. 2015, Shepard, Bharwani et al. 2016, Hampton 2019): Eine Vielzahl physiologischer Prozesse des Immunsystems, wie beispielsweise die Expression des Fc-Rezeptors, Pinozytose und Phagozytose in murinen Makrophagen oder die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies zur Eliminierung intrazellulärer Bakterien, zeigte bei simulierter febrilerer Temperatur *in vitro* eine erhöhte Aktivität (Yoshioka, Koga et al. 1990, van Bruggen, Robertson et al. 1991). Während Fieber also eine Reaktion des Körpers auf pathologische Ereignisse, wie z. B. Erregerkontakt, darstellt, tritt die zuvor beschriebene Fluktuation der Körpertemperatur im Tagesverlauf physiologisch auf (Kiyatkin 2007, Hetem, Mitchell et al. 2019).

1.1.3 Die Regulation der Körpertemperatur

Säugetiere gehören zu den homoiothermen Lebewesen, da sie weitestgehend unabhängig von der Umgebungstemperatur in der Lage sind, ihre Körpertemperatur in einem schmalen physiologischen Bereich konstant zu halten (Romanovsky 2018). Die hohe Körpertemperatur ist auf den etwa 15 bis 50-fach gesteigerten Metabolismus, im Vergleich zu wechselwarmen Lebensformen, zurückzuführen (Edelman 1976, Hammond

and Diamond 1997). Es herrscht Heterogenität bezüglich der wärmeproduzierenden und -abführenden Gewebe, weshalb zwischen der Körpertemperatur im Kern und der Temperatur im peripheren Gewebe unterschieden wird. Thorax- und Abdominaleingeweide, Gehirn sowie zentralvenöses und kardiales Blut zeichnen sich durch weitgehende Temperaturstabilität aus und werden daher dem Körperkern zugerechnet (Aschoff and Wever 1958, Lim, Byrne et al. 2008, Vinkers, Penning et al. 2013, Madden and Morrison 2019). Das periphere Gewebe hingegen unterliegt häufig Temperaturschwankungen über einen weiten Bereich. Die Temperatur in den Extremitäten beispielsweise unterscheidet sich auch unter physiologischen Bedingungen deutlich von der Temperatur des Körperkerns (Romanovsky 2014).

Die Haut bedeckt die Körperoberfläche und ist daher ideal geeignet, die Umgebungstemperatur mit zahlreichen ‚Thermosensoren‘ zu erfassen. Veränderungen in der Umgebungstemperatur werden zunächst durch Wärme- und Kälterezeptoren der Haut erfasst und über afferente Nervenbahnen an Spinalganglien projiziert (Nakamura 2011). Diese Signale werden über weitere Umschaltungen zu dem thermoregulatorischen Zentrum, der *Area praeoptica* (POA), weitergeleitet (Hammel 1968, Yadav, Jaryal et al. 2017, Boyles 2019, Schlader and Vargas 2019). Die POA ist eine Hirnregion des Hypothalamus, die aus verschiedenen Kerngebieten, den *Nuclei preoptici*, besteht. Dort findet eine Sollwertabgleichung mit dem Ist-Zustand der Körpertemperatur und nachfolgend gegebenenfalls eine Anpassung der Ausgangssignale statt (Liedtke 2017). Efferenzen projizieren zu den Effektororganen wie Haut, Muskel und braunem Fettgewebe und fördern bei Kälte Thermogenese und bei Wärme die vermehrte Wärmeabgabe (Morrison 2016). Die Haut ist in der Lage, große Wärmemengen über passive Strahlung und Verdunstungskälte abzuführen und damit die Körpertemperatur zu regulieren (Romanovsky 2018). Eine gesteigerte Durchblutung der peripheren Kapillargefäße führt zu einer Verschiebung des Körperkerns weiter in die Peripherie. Eine erhöhte Aktivität der Schweißdrüsen resultiert in einer gesteigerten Verdunstungskälte an der Hautoberfläche. Beides bewirkt letztendlich eine Absenkung der Körpertemperatur bis der Sollwert erreicht ist (Aschoff and Wever 1958). In kühler Umgebung hingegen wird durch wärmeproduzierende Maßnahmen wie Zittern, zitterfreie Wärmebildung durch Lipolyse oder wärmesparenden Maßnahmen die Körperkerntemperatur angehoben (Castellani and Young 2016). Die Regulation der Thermogenese auf einen Kältestimulus hin wird in Kapitel 1.3.3 ausführlich beschrieben.

1.1.4 Der *Nucleus suprachiasmaticus* und der circadiane Rhythmus

Der circadiane Rhythmus stellt die evolutionsbedingte biologische Antwort auf sich im Tagesrhythmus verändernde Umweltbedingungen dar und bezeichnet zunächst alle Vorgänge in einem Organismus, die eine Periodenlänge von etwa 24 h haben (Roenneberg, Kuehnle et al. 2007, Firsov and Bonny 2018, Rijo-Ferreira and Takahashi 2019). Bedingt durch die Rotation der Erde um die eigene Achse und daraus resultierender Tag- und Nachtperioden kommt es zu einschneidenden Veränderungen für alle Organismen. Der Tag-/Nachtrhythmus bedingt eine veränderte Umgebungstemperatur, Lichtverhältnisse und Verfügbarkeit von Nahrungsquellen. Die Ausbildung einer ‚inneren Uhr‘, die in Lebewesen aller Taxa zu finden ist, erlaubte eine Anpassung physiologischer Prozesse an diese veränderten Umweltbedingungen, was schließlich in einer gesteigerten Überlebensrate des Individuums resultierte (Ouyang, Andersson et al. 1998, Tauber and Kyriacou 2005, Foulkes, Whitmore et al. 2016, Bhadra, Thakkar et al. 2017).

Der *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) ist im ventralen Hypothalamus lokalisiert und agiert als zentraler Schrittmacher der circadianen Rhythmik in Säugetieren (Stephan and Zucker 1972, Welsh, Takahashi et al. 2010, Mohawk, Green et al. 2012). Er wird direkt über den retinohypothalamischen Trakt innerviert und erhält darüber Informationen über vorliegende Lichtverhältnisse (Herzog, Hermansteyne et al. 2017). Die Hell- bzw. Dunkelrhythmen der Tag- und Nachtperioden führen zur Synchronisation von Clockgenen (DNA-Abschnitte, die für die Komponenten der inneren Uhr kodieren) des SCN (Nelson und Zucker 1981). Doch nicht nur die veränderten Lichtverhältnisse führen zu einer Beeinflussung dieser inneren Uhr, sondern auch weitere Faktoren, wie der Zeitpunkt der Nahrungsaufnahme oder zeitzoneübergreifende Reisen (Oosterman, Kalsbeek et al. 2015, Musiek and Holtzman 2016, Manoogian and Panda 2017, Sulli, Manoogian et al. 2018, Paoli, Tinsley et al. 2019).

Die Synchronisation des SCN findet auf molekularer Ebene durch Transkription und Translation von einem Netzwerk an Genen in einem 24-h-Rhythmus mit negativer Rückkopplung statt. Die Aktivatoren *circadian locomotor output cycles kaput* (CLOCK) und *brain and muscle ARNT-Like 1* (BMAL1) steuern über die Bindung an *enhancer*-Boxen in der Promotorregion die Expression von *period 1* (PER1), *period 2* (PER2), Cryptochrom 1 (CRY1) und Cryptochrom 2 (CRY2) (Dunlap 1999). PER und CRY

dimerisieren und können schließlich über einen negativen Rückkopplungsmechanismus die BMAL1- und CLOCK-abhängige Transkription unterdrücken (Partch, Green et al. 2014, Cox and Takahashi 2019, Patke, Young et al. 2020). Darüber hinaus existiert eine weitere Rückkopplungsschleife mit Beteiligung von REV-ERBs und *retinoic acid receptor-related orphan receptors* (RORs), die ebenso BMAL1/CLOCK abhängig gebildet werden und ihrerseits die BMAL1-Expression regulieren können (Jin, Shearman et al. 1999, Lowrey and Takahashi 2004).

Alle Körperzellen exprimieren Komponenten der circadianen Rhythmik (Yagita, Tamanini et al. 2001). Da die meisten Zellen allerdings nicht in direktem Kontakt mit dem Sehnerv stehen, können sie auch nicht durch Lichtimpulse synchronisiert werden (Stetson and Watson-Whitmyre 1976). Der SCN als zentraler Schrittmacher bzw. höchste hierarchische Struktur der inneren Uhr, synchronisiert periphere Körperzellen daher an den zentralen Tag- bzw. Nachtrhythmus und agiert somit als Zeitgeber (Bruce 1960, Golombek and Rosenstein 2010, Schibler, Gotic et al. 2015, Heyde and Oster 2019, Begemann, Neumann et al. 2020). Das geschieht zum einen über die Aktivierung sympathischer und parasympathischer Signalwege (Kalsbeek, Bruinstroop et al. 2010). Es kommt hierbei vermittelt über das autonome Nervensystem zur Weiterleitung von photooptischen Signalen an periphere Oszillatoren, wie der Nebenniere (Buijs, Wortel et al. 1999, Buijs, van Eden et al. 2003, Thosar, Butler et al. 2018). Dort führt die Ausschüttung von *corticotropin-releasing hormone* (CRH) zu einer circadianen Expression von Glukokortikoidhormonen, wie beispielsweise Kortisol (Kaneko, Hiroshige et al. 1980). Über *glucocorticoide-response elements* (GRE) in der Promotorregion von Clockgenen peripherer Körperzellen können Glukokortikoide somit deren Expression modulieren (So, Bernal et al. 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit ist von besonderem Interesse, dass auch durch rhythmische Körpertemperaturänderungen eine Synchronisierung von peripheren Körperzellen an den zentralen Rhythmus erreicht wird (Jin, Shearman et al. 1999, Kräuchi 2002). Zwei wesentliche Prinzipien sind Voraussetzung für diesen Mechanismus. Zum einen müssen periphere Körperzellen sensitiv bezüglich kleiner, physiologisch auftretender Temperaturänderungen sein. Zahlreiche Publikationen konnten den Zusammenhang zwischen simulierten Körpertemperaturzyklen und der Synchronisation peripherer Uhren zeigen (Tsuchiya, Akashi et al. 2003, Refinetti 2010, Morf and Schibler 2013, Refinetti

2015, Abraham, Schlichting et al. 2018). So konnte beispielsweise *in vitro* an Fibroblasten der Ratte demonstriert werden, dass Temperaturfluktuationen zwischen 4 und 10 °C ausreichend sind, um eine rhythmische Genexpression von Clockgenen zu induzieren. (Brown, Zumbrunn et al. 2002). Neuere Studien zeigen, dass bereits Temperaturosillationen von 1 °C ausreichend sind, um synchronisierte Zellen im Takt zu halten und darüber hinaus einen Phasenwechsel zu initiieren (Saini, Morf et al. 2012). Die Autoren konnten damit zeigen, dass simulierte Körpertemperaturrhythmen als Zeitgeber für periphere circadiane Oszillatoren dienen. Diese Befunde verdeutlichen, dass periphere Körperzellen feine Temperaturunterschiede wahrnehmen können. Die zweite Voraussetzung für die Synchronisation dieser Zellen durch Temperaturrhythmen, ist die Temperaturkompensation des SCN, also die eigene Unempfindlichkeit gegenüber Temperaturschwankungen. Wäre der SCN selbst temperatursensibel, käme es zu Rückkopplungseffekten, welche die zentrale Synchronisation stören würden. Auch dies wurde bereits in einigen Publikationen gezeigt (Burgoon and Boulant 1998, Ruby, Burns et al. 1999, Burgoon and Boulant 2001, Brown, Zumbrunn et al. 2002, Shinohara, Koyama et al. 2017). Somit kann der zentrale circadiane Rhythmus durch feine Temperaturänderungen an periphere Körperzellen übermittelt werden.

In zahlreichen Arbeiten wurde der Zusammenhang zwischen einer veränderten circadianen Rhythmik und pathologischen Prozessen thematisiert (Drake 2010, Wulff, Gatti et al. 2010, Zee, Attarian et al. 2013, Breen, Vuono et al. 2014, McAlpine and Swirski 2016, Jagannath, Taylor et al. 2017, Firsov and Bonny 2018, Rijo-Ferreira and Takahashi 2019, Zimmet, Alberti et al. 2019). In einigen Studien wurde beispielsweise der Einfluss von Schichtarbeit im Vergleich zu klassischen Arbeitszeiten untersucht. Es konnte eine erhöhte Prävalenz für metabolische Erkrankungen wie Typ II Diabetes (Qian and Scheer 2016), neurologische Erkrankungen wie Parkinson (Lauretti, Di Meco et al. 2017) oder Alzheimer Erkrankung (Wu, Dunnett et al. 2019) sowie kardiovaskuläre Ereignisse wie Myokardinfarkt, Apoplex oder ventrikuläre Arrhythmien (Scheer, Hilton et al. 2009, Morris, Purvis et al. 2016), nachgewiesen werden. In den letzten Jahrzehnten konnte eine deutliche Zunahme von nichtorganischen Störungen des Schlaf-Wach-Rhythmus verzeichnet werden, was vermutlich ein Resultat aus veränderten Anforderungen an das Individuum und damit einhergehenden Verhaltensänderungen ist (Kecklund and Axelsson 2016). So sind 15 bis 20 % der arbeitenden Weltbevölkerung, zumindest zeitweise, in Schichtarbeit oder zeitzoneübergreifend beschäftigt. Etwa 80 %

der Amerikaner sind nachts künstlichem Licht ausgesetzt, und die Nahrungsaufnahme findet häufig unregelmäßig oder nächtlich statt (Haus and Smolensky 2006, Navara and Nelson 2007, Mattson, Allison et al. 2014). Durch diese extrinsischen und intrinsischen Störungen des zentralen circadianen Rhythmus kommt es folglich auch zu einer veränderten Körpertemperatur im Tagesverlauf, wodurch sich, wie zuvor beschrieben, Auswirkungen auf die zellulären Uhren von peripheren Körperzellen ergeben können (Colquhoun and Edwards 1970, Knauth, Emde et al. 1981, Jang, Kim et al. 2017).

1.2 Temperatursensitive Proteine mit Signalwirkung

Betrachtet man verschiedene Möglichkeiten, durch die Änderungen der Körpertemperatur einen Einfluss auf Signalweiterleitung und Genexpression nehmen können, gilt es zwei grundlegende Mechanismen zu unterscheiden. Ein Temperaturimpuls kann einerseits eine Sofortwirkung haben und beispielsweise direkt thermodynamische Prozesse beeinflussen oder zu einer veränderten Offenwahrscheinlichkeit von thermosensitiven Ionenkanälen führen und dadurch Ca^{2+} -abhängige Prozesse beeinflussen (Clapham 2003). Andererseits kann der gleiche Temperaturstimulus auch zu einer veränderten Genexpression führen, die ihre Wirkung erst Stunden später zeigt: Wenn es beispielsweise, vermittelt durch Ionenkanäle, zu einer Ca^{2+} -abhängigen Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren kommt, und somit zeitversetzt eine temperaturabhängige Genexpression initiiert wird. Die circadiane Temperaturrehythmik könnte zudem auch noch ein komplexes Wechselspiel bewirken: Die Temperaturänderungen im Ruhezustand könnten, aufgrund von einer verzögerten Proteinexpression, erst im aktiven Zustand (und umgekehrt) zu einer zellulären Wirkung führen. Im Folgenden wird genauer auf temperatursensitive Proteine und Möglichkeiten der Beeinflussung physiologischer Prozesse durch Temperaturänderungen eingegangen.

1.2.1 Hitzeschockproteine

Bei Proteinen besteht ein fragiles Gleichgewicht zwischen Stabilität und Reaktivität, weshalb sie unter anderem anfällig für Temperaturänderungen sind (Somero 1995). Weicht die Temperatur bereits in geringem Maß von der optimalen Temperatur ab, kann dies zu Protein- und Zellschädigungen führen (Perozzo, Folkers et al. 2004, Bischof and He 2005, Meersman, Smeller et al. 2006, Pucci, Dhanani et al. 2014, Sajib, Albers et al.

2020). So kann es zu Proteinfehlfaltungen, Ansammlung von Proteinaggregaten bis hin zu Fehlbildungen des Zytoskeletts und Zellzyklusarrest kommen, wenn nicht rasch und effektiv auf den schädlichen Hitzestimulus reagiert wird (Pincus 2020).

Alle Lebewesen haben daher einen Schutzmechanismus entwickelt, der die Zellen vor unphysiologischen Temperaturen schützt (Jacob, Hirt et al. 2017). Die Hitzeschockantwort ist ein schnell initiiertes Programm, das die transiente Genexpression steuern und effektive Gegenmaßnahmen einleiten kann (Richter, Haslbeck et al. 2010). Sie besteht aus einer Vielzahl von Komponenten, wobei die Hitzeschockproteine (HSP) die wichtigste regulatorische Einheit darstellen.

HSPs bestehen aus fünf Familien: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 und sHSP (Ellis, van der Vies et al. 1989, Jakob, Muse et al. 1999). Diese werden nicht nur auf einen Hitzeschock hin synthetisiert, sondern erfüllen auch bei physiologischen Temperaturen wichtige Aufgaben bei der *de-novo*-Proteinsynthese (Ellis, van der Vies et al. 1989). Naszierende Proteine werden durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert, wodurch Fehlfaltungen verhindert werden (Gragerov, Martin et al. 1991). HSPs liegen innerhalb der Zelle in großer Zahl vor, da sie stöchiometrisch mit Proteinen interagieren müssen, um diese zu stabilisieren (Kiefhaber, Rudolph et al. 1991). Die Regulation der HSP-Synthese wird durch *heat shock factor 1* (hsf1) gesteuert.

Hsf1 ist ein Transkriptionsfaktor, der zytosolisch inaktiv als Monomer im Komplex mit HSPs wie Hsp90 vorliegt (Mahat, Salamanca et al. 2016, Garbuz 2017, Gomez-Pastor, Burchfiel et al. 2018, Masser, Ciccarelli et al. 2020). Werden HSPs bei einem Hitzeschock rekrutiert, wird hsf1 aus dem Komplex freigesetzt und kann durch Homotrimerisierung aktiviert werden, was zu einer Translokation in den Zellkern führt. Dort wird hsf1 hyperphosphoryliert, kann an DNA-Abschnitte mit Hitzeschockelementen (HSE) binden und somit temperaturabhängig die Transkription von HSPs initiieren (Iijima-Ando, Wu et al. 2005, Kwon, Kim et al. 2019). Wenn diese dann im Zytosol wieder in ausreichender Zahl vorliegen, wird hsf1 als Monomer zurück in den inaktiven Komplex mit Hsp90 gebracht (Gomez-Pastor, Burchfiel et al. 2018).

Doch nicht nur HSP-Gene enthalten Bindestellen für hsf1. Auch z. B. der PER2-Promotor weist HSEs auf. Es wird vermutet, dass Temperaturzyklen durch die hsf1-abhängige Aktivierung von PER2 zu einer Synchronisierung peripherer Uhren beitragen (Brown, Zumbrunn et al. 2002). Die Expression einiger HSPs oszilliert in einem ähnlichen

Rhythmus wie PER2 (Brown, Zumbrunn et al. 2002, Kornmann, Schaad et al. 2007). Außerdem konnte durch die Inhibition der hsf1-Transkription mit KNK437, der Phasenwechsel eines Kältepulses nachgeahmt und der Phasenwechsel nach einem Wärmepuls inhibiert werden (Buhr, Yoo et al. 2010). Zusätzlich führt die kurzzeitige Inkubation der Zellen bei wärmeren Temperaturen zu einer Verringerung der PER2-Expression, die bei einer Verringerung der Temperatur wieder erhöht wurde (Kornmann, Schaad et al. 2007).

Es wird auch ein kinetisches Modell für die hsf1-Aktivierung diskutiert: hsf1 agiert hier als Thermosensor, der abhängig von der Umgebungstemperatur trimerisieren und damit direkt temperaturabhängig aktiviert werden kann (Hentze, Le Breton et al. 2016). Bereits kleine Abweichungen von der physiologischen Körpertemperatur sind ausreichend, um die hsf1-Aktivität durch Trimerisierung zu modulieren. Eine weitere Forschergruppe konnte zeigen, dass Temperaturfluktuationen zwischen 35 und 39 °C ausreichend sind, um rhythmische hsf1-abhängige Genexpression im Zellsystem zu provozieren (Reinke, Saini et al. 2008). HSPs können mit β -Adrenozeptor (AR)-abhängigen Signalwegen (siehe Kapitel 1.4.2) interagieren: HSP27 führt im Komplex mit β -Arrestin zu einer verminderten Apoptoserate (Rojanathammanee, Harmon et al. 2009). Diese Befunde zeigen einerseits, dass Temperaturänderungen eine Aktivierung von hsf1 bedingen, was als Transkriptionsfaktor somit temperaturabhängig die Expression von Zielgenen über Bindung an HSEs moduliert. Andererseits führt hsf1 auch zu einer temperaturabhängigen Induktion von HSPs, was aufgrund deren Eigenschaft als Chaperone, in einer erhöhten Stabilisierung von Proteinen, wie Transkriptionsfaktoren oder Kinasen, resultiert und daher intrazelluläre Signalwege beeinflussen kann.

1.2.2 Kälteschockproteine

Sinkt die Körpertemperatur abrupt ab, wird in Pro- und Eukaryoten eine Kälteschockantwort induziert. Dies wurde zunächst bei *Escherichia coli* (E. coli)-Bakterien festgestellt. Bei absinkender Umgebungstemperatur wird die Komposition der Zellmembran angepasst: Durch eine erhöhte Synthese von ungesättigten Fettsäuren wird die Fluidität der Zellmembran erhöht, was eine gleichbleibende Funktionalität des Organismus, trotz einer verringerten Temperatur, bewirkt (Sakamoto and Bryant 1997, Thieringer, Jones et al. 1998). Darüber hinaus induzieren diese Bakterien die Synthese von Proteinen, sogenannten Kälteschockproteinen (KSP), die die bei Kälte reduzierte

Transkription, Translation und Replikation überwinden können, was letztlich zu einer gesteigerten Überlebensrate führt (Graumann and Marahiel 1998, Sommerville 1999, Yamanaka 1999, Liao, Tong et al. 2017). In jüngerer Zeit wurde zunehmend bekannt, dass KSPs auch an vielfältigen weiteren physiologischen Aufgaben mitwirken, wie beispielsweise Rekrutierung des Immunsystems, Beteiligung an der Entzündungsreaktion oder Eingriff in den Zellzyklus (Qiang, Yang et al. 2013, Lujan, Ochoa et al. 2018, Roilo, Kullmann et al. 2018, Jin, Aziz et al. 2019, Sun, Bergemeier et al. 2020).

Eines der bekanntesten KSPs ist *cold inducible RNA-binding protein* (CIRP). CIRP wird vermehrt bei moderater Kälte, oxidativem Stress, Hypoxie oder Entzündungsreaktionen gebildet (Zhu, Bühner et al. 2016). CIRP enthält ein RNA-Erkennungsmotiv und kann darüber direkt an RNA binden und diese posttranskriptionell modulieren. Dies erfordert meist die Bindung innerhalb der 3'-*untranslated region* zwischen Stopkodon und Poly-A-Schwanz (Nishiyama, Itoh et al. 1997). Durch Bindung der Ziel-RNA wird diese stabilisiert und der Abbau verlangsamt, was zu einer erhöhten Expression der Zielproteine führt. So bewirkt beispielsweise UV-Strahlung die CIRP-abhängige Stabilisierung von Thioredoxin-mRNA, was als Radikalfänger die schädliche UV-Wirkung abmildern kann (Yang and Carrier 2001).

Schon eine milde Verringerung der Körpertemperatur führt zu einer gesteigerten CIRP-Expression in BALB/3T3-Mausfibroblasten (Nishiyama, Itoh et al. 1997). Dort führte die Verringerung der Inkubationstemperatur von 37 auf 32 °C zu einer signifikanten Induktion von CIRP. Außerdem konnte demonstriert werden, dass CIRP in einem 24-h-Rhythmus oszilliert. Die höchste Expression ist bei der niedrigsten Körpertemperatur nachgewiesen worden (Nishiyama, Xue et al. 1998, Gotic, Omid et al. 2016). Diese Oszillation von CIRP erhöht auch die circadiane Expression von Transkriptionsfaktoren der inneren Uhr, wie beispielsweise CLOCK, was in einem robusteren circadianen Rhythmus resultiert (Morf, Rey et al. 2012). Die direkte Interaktion zwischen CIRP und CLOCK-mRNA konnte zwar bereits nachgewiesen werden (Morf and Schibler 2013), dennoch ist noch nicht abschließend geklärt, ob diese Interaktion direkt zu einer erhöhten Proteinexpression von CLOCK führt (Schibler, Gotic et al. 2015). Ferner konnte bereits gezeigt werden, dass CIRP-mRNA direkt durch Temperaturänderungen, unabhängig von Komponenten des circadianen Rhythmus, reguliert wird (Kornmann, Schaad et al. 2007). Die temperaturabhängigen CIRP-mRNA-Spiegel sind auf posttranskriptionelle

Mechanismen zurückzuführen (Shiina and Shimizu 2020, Xie, Geng et al. 2020). So kommt es aufgrund eines Splicing-abhängigen regulativen Elements im Intron 1 der CIRP-DNA zu einer durch Temperatur veränderten CIRP-mRNA-Expression. In diesem Zusammenhang konnten Preußner und Kollegen Clk1/4-kinase und Proteinphosphatase 1 identifizieren, die temperaturabhängig die Phosphorylierung von SR-Proteinen modulieren (Preussner and Heyd 2018). Bei SR-Proteinen handelt es sich um RNA-bindende Proteine mit einem Serin/Arginin-reichen C-Terminus (Lin and Fu 2007, Fu and Ares 2014, Jeong 2017). Der Phosphorylierungsstatus der SR-Proteine führt zu alternativem Splicing von beispielsweise CIRP mit daraus resultierender temperaturabhängiger Expression (Preußner, Goldammer et al. 2017). Die Arbeitsgruppe um Preußner konnte hier zeigen, dass diese temperaturabhängige Phosphorylierung ausschließlich auf Temperaturänderungen zurückzuführen war. Die Oszillation von CIRP war demnach keine Konsequenz der circadianen Clockgen-Expression, sondern vielmehr direkt abhängig von kleinen Temperaturänderungen im Tagesverlauf. Mit CIRP ist somit ein Protein beschrieben, dass bei physiologischen Änderungen der Körpertemperatur reguliert wird und über Stabilisierung von mRNA-Transkripten die Proteinbiosynthese beeinflussen kann.

1.2.3 *Transient receptor potential-Kanäle*

Transient receptor potential channel (TRP-Kanäle) sind Kanalproteine, die aus sechs Transmembrandomänen aufgebaut und unselektiv für Kationen permeabel sind (Harteneck 2005). Sie werden aufgrund von Sequenzhomologien in Säugetieren in sechs Unterfamilien eingeteilt (TRPC, TRPA, TRPV, TRPM, TRPP und TRPML) und bilden insgesamt 27 Mitglieder (Voets, Janssens et al. 2004, Ramsey, Delling et al. 2006). Sie vermitteln den Einstrom von Kationen wie Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} oder Na^{+} und können daher den intrazellulären Spiegel dieser Ionen beeinflussen (Saito and Tominaga 2015). TRP-Kanäle werden ubiquitär exprimiert und sind an einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt. So sind sie maßgeblich an der Wahrnehmung von Schmerz, Temperatur und Druck beteiligt (Julius 2013, Tomilin, Mamenko et al. 2016, Yang, Feng et al. 2017, Dong and Dong 2018, Samanta, Hughes et al. 2018, Falcón, Galeano-Otero et al. 2019). Im Rahmen dieser Arbeit ist allerdings die Expression und Temperaturwahrnehmung der TRP-Kanäle im zentralen Nervensystem von besonderem Interesse.

Auf der Suche nach einem Capsaicin-sensitiven Rezeptor wurde die Vanilloid-Rezeptor-1-cDNA aus sensorischen Neuronen isoliert (Caterina, Schumacher et al. 1997). Die Sequenzhomologie zu dem TRP-Kanal in *Drosophila melanogaster* führte zu der Entdeckung des ersten humanen TRP-Kanals. TRPV1 wird nicht nur durch das Vanilloid Capsaicin, sondern auch durch schädliche Hitze über 43 °C aktiviert (Caterina, Schumacher et al. 1997). Wenngleich häufig von einer ‚Temperaturschwelle‘ gesprochen wird, ab der die jeweiligen Kanäle aktiviert werden können, handelt es sich vielmehr um eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Zunahme der Offenwahrscheinlichkeit, denn auch bei Temperaturen unterhalb dieser ‚Schwelle‘ kann eine Aktivität des Kanals nachgewiesen werden (Güler, Lee et al. 2002, Castillo, Diaz-Franulic et al. 2018, Vriens and Voets 2018). Es wurden noch einige weitere TRP-Kanäle entdeckt, die durch Hitze oder Kälte aktivierbar sind. Diese werden seitdem als ‚Thermo-TRPs‘ bezeichnet (Patapoutian, Peier et al. 2003). Dazu gehören neben TRPV1 auch TRPV2 (> 52 °C), TRPV3 (31 – 39 °C) und TRPV4 (25 – 34 °C), die durch Hitze aktiviert werden. TRPA1, TRPC5 und TRPM8 (< 25 °C) hingegen sind durch Kälte aktivierbar (Caterina, Rosen et al. 1999, Güler, Lee et al. 2002, Mckemy, Neuhausser et al. 2002, Peier 2002, Xu, Ramsey et al. 2002). Darüber hinaus sind in weiteren Studien auch TRPM2 (33 – 47 °C) (Kashio and Tominaga 2017), TRPM3 (< 40 °C) (Held, Voets et al. 2015, Vriens and Voets 2018), TRPM4 und TRPM5 (je 15 – 35 °C) (Saito and Tominaga 2015) als temperatursensitive TRP-Kanäle identifiziert worden.

Eine Aktivierung von TRP-Kanälen kann eine Vielzahl zellulärer Prozesse auslösen. So kann der TRP-vermittelte Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu einer Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen Enzymen, wie beispielsweise der Phosphatase Calcineurin, führen, woraufhin die *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT)-abhängige Genexpression gesteigert wird (Kuwahara, Wang et al. 2006, Soni and Adebisi 2016). Die Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen Kinasen, wie Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Kinase (CaMK) II, kann zu einer Ca^{2+} -abhängigen Phosphorylierung von Zielproteinen führen (Hu, Zhao et al. 2019). TRPM6 und 7 können aufgrund ihrer intrazellulären Kinasedomäne direkt durch Phosphorylierung die Aktivität von Proteinen, wie beispielsweise *elongation factor 2 kinase*, phospholipase $\text{C}\gamma 2$ oder Annexin A1 beeinflussen (Dorovkov and Ryazanov 2004, Deason-Towne, Perraud et al. 2012). Diese Kanäle können durch ihre stark ausgeprägte Mg^{2+} -Leitfähigkeit auch die Aktivität Mg^{2+} -sensitiver intrazellulärer Kinasen modifizieren (Zou, Rios et al. 2019). Die Aktivierung

von TRPC-Kanälen kann zu einer Phosphorylierung von *cAMP response element-binding protein* (CREB) führen und damit die CRE (*cAMP response element*)-abhängige Genexpression von Zielgenen, wie c-fos, beeinflussen (Jia, Zhou et al. 2007). Auch können TRP-Kanäle die Phosphorylierung von *extracellular regulated kinase 1/2* (ERK1/2) vermitteln (Lesch, Rössler et al. 2017), was nachfolgend ebenso zu einer veränderten CREB-abhängigen Genexpression (siehe Kapitel 1.3.2.2) führen könnte.

Aufgrund ihrer ubiquitären Expression und Beeinflussung des intrazellulären Milieus sind TRP-Kanäle an zahlreichen pathologischen Prozessen, wie chronischen Schmerzen und Entzündungsreaktionen, Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts (GIT), Tumorerkrankungen, Fehlregulationen des Immunsystems sowie Lungen- und Herzerkrankungen (Nilius, Voets et al. 2005, Kanewska, Ito et al. 2020) beteiligt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass TRP-Kanäle die Wahrnehmung von noxischen Hitzestimuli bewirken (Clapham 2003, Fealey 2013, Watanabe, Piché et al. 2015). Ein TRP-Kanal-Trio, bestehend aus TRPM3, TRPV1 und TRPA1, vermittelt die Reaktion von Mäusen auf akute Hitzestimuli (Vandewauw, De Clercq et al. 2018). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass die TRP-Kanäle TRPV3 und TRPM8 zur Induktion von CIRP in primären murinen Lungenzellen notwendig sind (Fujita, Liu et al. 2018): Die Induktion von CIRP nach einem Temperaturwechsel von 37 auf 32 °C bleibt in dem TRP-Knockout aus. Eine weitere Gruppe konnte zeigen, dass die Simulierung von Fieber (hier: 42 °C) in Myoblasten TRPV1-vermittelt zu einer Aktivierung von Proteinkinase C (PKC) mit nachfolgender Phosphorylierung von CREB führt, was in einer erhöhten Expression von Interleukin 6 resultiert (Obi, Nakajima et al. 2017).

Der TRPM2-Kanal wird benötigt, um nicht-noxische Wärme wahrzunehmen (Tan and McNaughton 2016). Das Verhalten von Mäusen bezüglich Wärme (23 °C – 38 °C) ist abhängig von der Expression von TRPM2: TRPM2-defiziente Mäuse suchen signifikant seltener als die Kontrollgruppe kühle Orte auf. Darüber hinaus wurde der Kanal bereits als thermosensitiver metabolischer Sensor beschrieben, der bei Körpertemperatur an einer Vielzahl physiologischer Prozesse involviert ist (Kashio and Tominaga 2017). Die Beteiligung an der Insulinfreisetzung beispielsweise, erfolgt wahrscheinlich über TRPM2-abhängige *glucagon-like peptide 1* (GLP-1) Stimulierung (Uchida, Dezaki et al. 2011). Diese Freisetzung von Insulin aus β -Zellen des Pankreas erfolgt temperaturabhängig, was vermutlich direkt mit der TRPM2-Kanalaktivität

zusammenhängt (Kashio and Tominaga 2015). Bereits eine leichte Erhöhung der Temperatur führte an der POA des Hypothalamus zu einer verstärkten Aktivierung von TRPM2, weshalb der Kanal auch als hypothalamischer Hitzesensor beschrieben worden ist (Song, Wang et al. 2016). Die Gruppe konnte zeigen, dass die Aktivität des Kanals bei 38 °C (im Vergleich zu 34 °C) in kultivierten POA-Neuronen der Maus erhöht ist und dass die TRPM2-induzierte Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels durch 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB), einem nicht selektiven TRP-Kanalmodulator, blockiert wurde. Funktionelle wird TRPM2 auch in Neuronen des *Nucleus paraventricularis* (PVN) exprimiert (Zhong, Amina et al. 2016). In Summe zeigen diese Befunde, dass TRP-Kanäle durch ihre ubiquitäre Expression und die Beeinflussung der intrazellulären Ionenkonzentration an vielfältigen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt sind. TRP-Kanäle, die bei physiologischen Temperaturen aktiviert werden, könnten möglicherweise an der Übersetzung von physiologischen Temperaturänderungen in zelluläre Ereignisse beteiligt sein.

1.2.4 Thermodynamische Prozesse

Neben spezifischen temperatursensitiven Proteinen, wie CIRP oder TRP-Kanälen, können auch direkt thermodynamische Prozesse an der Vermittlung von Temperaturänderungen involviert sein.

Obwohl in Proteinen teils hunderte nicht-kovalente Bindungen auftreten, liegt die gesamte freie Energie des Systems meistens in der Größenordnung von etwa 5 - 20 kcal/mol, was in etwa der Energie einiger, weniger nicht-kovalenter Bindungen entspricht (Dill 1990). Daraus ergibt sich ein lockeres Gleichgewicht zwischen Stabilität und Reaktionsbereitschaft, was in Proteinen aller Taxa zu finden ist (Alexandrov 1969). Proteine müssen einerseits eine ausreichende Stabilität bei physiologischen Temperaturen haben, um bestimmte dreidimensionale Konformationen einnehmen zu können, damit Liganden gebunden werden können. Andererseits darf diese Stabilität nicht zu ausgeprägt sein, damit rasche und präzise Struktur- und Konformationsänderungen, die während der Bindung, katalytischen Reaktion, metabolischen Regulation oder Kontrolle der Genexpression auftreten, möglich bleiben (Somero 1995).

Interaktionen zwischen Proteinen oder Liganden und Proteinen sind abhängig von der freien Energie des Systems. Die freie Energie der Bindung ist die bedeutsamste thermodynamische Beschreibung der Bindung, da aus ihr die Stabilität eines jeden biologischen Komplexes hervorgeht (Raha and Merz 2005, Zeitlinger, Derendorf et al. 2011). Die freie Energie eines Systems (ΔG_0) ergibt sich aus der Bindungsenthalpie (ΔH_0), der Entropie (ΔS_0) und der Temperatur (T).

$$\Delta G_0 = \Delta H_0 - T\Delta S_0 \quad (1)$$

Aus der Gibbs-Helmholtz-Gleichung (1) wird deutlich, dass die freie Energie der Bindung eines Systems temperaturabhängig ist. Daraus ergibt sich, dass die Wechselwirkungen zwischen Proteinen oder kleinen Molekülen abhängig von der Temperatur sind. Dies ist darin begründet, dass einerseits die Wahrscheinlichkeit der Interaktion mit einer Erhöhung der Temperatur steigt und andererseits die Proteinfaltung, und somit die biologische Aktivität, abhängig von der Temperatur sind (Woldeyes, Qi et al. 2020). In einem physiologischen Kontext zeigt sich die Auswirkung dieser Temperaturabhängigkeit in einer gesteigerten Reaktionsrate enzymatischer Reaktionen bei erhöhter Temperatur. Diese Gesetzmäßigkeit ist auch als Reaktionsgeschwindigkeit-Temperatur-Regel bekannt und ist eine Anwendung der van 't-Hoff'schen Gleichung (2), die sich teilweise aus der Gibbs-Helmholtz-Gleichung ableitet. Bei einer Erhöhung der Temperatur kommt es zu einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit, bis diese aufgrund von Störungen in der Proteinstruktur wieder abnimmt (Arcus, Prentice et al. 2016, Du, Zhang et al. 2018, Arcus and Mulholland 2020). Um die Temperaturabhängigkeit eines Systems zu beschreiben, hat es sich bewährt, den 10 K-Temperaturkoeffizient (Q_{10} -Wert) anzugeben.

$$Q_{10} = \left(\frac{k_2}{k_1} \right)^{\frac{10 \text{ K}}{T_2 - T_1}} \quad (2)$$

Dieser ist als der Faktor definiert, um den die Reaktionsgeschwindigkeit bei einer Erhöhung der Temperatur von 10 K ansteigt. k_1 und k_2 bezeichnen die jeweiligen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten bei der Temperatur T_1 bzw. T_2 . Verdoppelt sich beispielsweise die Reaktionsgeschwindigkeit bei einem Temperaturanstieg von 20 °C auf 30 °C, so beträgt der Q_{10} -Wert 2. Somit erscheint es konsequent, dass im Tagesverlauf physiologisch auftretende Temperaturänderungen die freie Energie der Bindung des betrachteten Systems beeinflussen, und darüber, zumindest theoretisch, die Aktivität von

Proteinen, Enzymen und die Wechselwirkung dieser, beeinflussen können. Im Rahmen dieser Arbeit werden wissenschaftliche Erkenntnisse zu einem direkten Einfluss der Temperatur an der jeweiligen Stelle näher beschrieben.

1.3 Aufbau und Funktion des *Nucleus paraventricularis*

1.3.1 Allgemeines

Der Hypothalamus ist ein Teil des Zwischenhirns und dient als oberstes Regulationszentrum für endokrine und vegetative Vorgänge (Clarke 2015). Dem Hypothalamus obliegen lebenswichtige vegetative Aufgaben, wie die Thermoregulation (siehe Kapitel 1.1.2 und 1.3.3), die Flüssigkeitshomöostase, das Sexualverhalten, sowie die Regulation von Nahrungsaufnahme durch Vermittlung von Hunger und Sättigung (Keller-Wood 2015, Zimmerman, Leib et al. 2017, Qin, Li et al. 2018, Rosin and Kurrasch 2019). Des Weiteren ist er zentral an der inneren Zeitorganisation mit Schlaf-Wachverhalten und zirkadianer Rhythmik beteiligt (Dunlap 1999, Kalsbeek, Bruinstroop et al. 2010).

Der Hypothalamus ist aus mehreren Kerngebieten, wie dem PVN, SCN und der POA aufgebaut. Er integriert somatische, endokrine sowie vegetative Funktionen und sekretiert, als Hauptbestandteil eines feinmaschigen Rückkopplungsnetzwerks, die Freisetzungshormone (Liberine) und Freisetzungsinhibitions-hormone (Statine) (Flament-Durand 1980). Ebenso werden die Effektorhormone Vasopressin und Oxytozin produziert und im Hypophysenhinterlappen bis zu einem adäquaten Stimulus zur Sekretion gespeichert (Clarke 2015). Somit ist der Hypothalamus umfassend an physiologischen Prozessen beteiligt und unerlässlich zur Aufrechterhaltung vitaler Funktionen.

1.3.2 Die Appetitregulation

Die Energiehomöostase, also die Aufrechterhaltung der Energiezufuhr und des Energieverbrauchs, ist ein wichtiger Prozess, der Entgleisungen des Körpergewichts verhindern soll (Krashes, Lowell et al. 2016, Triantafyllou, Paschou et al. 2016). Der Hypothalamus verarbeitet Informationen peripherer Organe und Gewebe, wie des GIT, der Adipozyten und des Pankreas, integriert diese und gibt über Stimulierung der

Hypophyse hormonelle Signale an Zielorgane aus, die Nahrungsaufnahme und Energieverbrauch modulieren können. Damit stellt der Hypothalamus auch das Zentrum der Appetitregulation dar (Chaudhri, Small et al. 2006, Suzuki, Simpson et al. 2010, Yeo and Heisler 2012, Timofeeva, Caron et al. 2017)

Daran sind entscheidend Neurone des *Nucleus arcuatus* (ARC), des PVN und des lateralen Hypothalamus beteiligt (Langhans 2002, Sohn 2015). Der PVN besteht unter anderem aus parvozellulären Neuronen, die zur medianen Eminenz projizieren und dort TRH und *corticotropin-releasing hormone* (CRH) an die Hypothalamus-Hypophyse-Schilddrüse [engl. *hypothalamic pituitary thyroid* (HPT)]-Achse freisetzen (Silverman, Hoffman et al. 1981, Dorton 2000, Jiang, Rajamanickam et al. 2018). Diese Sekretion wird durch eine enge Abstimmung und Innervierung des ARC reguliert. Im ARC sind hauptsächlich zwei verschiedene Neurone anzufinden. Zum einen gibt es Neuropeptid Y (NPY)/*agouti-related protein* (AgRP)-positive Neurone, die die orexigen-wirkenden Hormone NPY und AgRP bilden können (Mullur, Liu et al. 2014). Diese Hormone werden abhängig von dem Energiestatus freigesetzt: Bei geringer Nahrungsaufnahme kommt es zu einer erhöhten Freisetzung und umgekehrt. Zum anderen gibt es Pro-Opiomelanocortin (POMC)/*cocaine- and amphetamine-regulated transcript* (CART)-positive Neurone, die POMC und CART freisetzen (Secher, Jelsing et al. 2014). Beide Hormone führen zu einer starken Inhibition des Hungergefühls und wirken daher anorexigen (Cowley, Smart et al. 2001, Sohn 2015). Eine erhöhte Konzentration von POMC und dem daraus prozessierten α -Melanozyten-stimulierendem Hormon (α -MSH) führt zu einem Sättigungsgefühl (Cyr, Toorie et al. 2013, Baldini and Phelan 2019, Alvarez-Salas, Gama et al. 2020).

Die Freisetzung von Hormonen aus der Peripherie, wie Ghrelin (Magen), Leptin (Fettgewebe), PYY₃₋₃₆ (Kolon, Ileum) oder Insulin (Pankreas), führt an Neuronen des ARC zu einer Interaktion mit NPY/AgRP- und POMC/CART-Neuronen. Die Freisetzung von Leptin nach der Nahrungsaufnahme bedingt beispielsweise einerseits die Aktivierung von POMC/CART-Neuronen und andererseits die Inhibition von NPY/AgRP-Neuronen. Dadurch werden im PVN Thyreoliberin-positive Neurone aktiviert, was zu einer gesteigerten TRH-Expression und daraus resultierend zu einem erhöhten Sättigungsgefühl mit verringerter Nahrungsaufnahme führt. Ghrelin hingegen wird von den Belegzellen im Epithel des Magenfundus zur Einleitung eines Hungergefühls

ausgeschüttet (Qin, Li et al. 2018). Ghrelin bindet an Ghrelinrezeptoren auf NPY/AgRP-Neuronen des ARC und bedingt damit einerseits direkt, und andererseits über die NPY-vermittelte Inhibition von POMC/CART-Neuronen indirekt, eine Inhibition von PVN-Neuronen. Dies resultiert in einer reduzierten TRH-Freisetzung (Lechan and Fekete 2006, Valassi, Scacchi et al. 2008). Folglich wird der Energieverbrauch verringert und ein Hungergefühl stimuliert (Dos-Santos, Reis et al. 2019).

1.3.2.1 Thyreotroper Regelkreis

Die Stimulation Thyreoliberin-positiver Neurone im PVN durch die beschriebenen Mechanismen führt zu einer Freisetzung von TRH aus hormonproduzierende Zellen, welche das Peptid an gefensterte Blutgefäße abgeben (Reichlin 1967). In diesem Neurohämälorgan, der medialen Eminenz, ist die Blut-Hirnschranke nicht vollständig ausgebildet, weshalb der direkte Übergang von Hormonen in Blutgefäße und von dort weiter über das hypothalamo-hypophysäre Pfortadersystem bis zur Adenohypophyse, möglich ist (Worthington 1955, Hodges 1984, Yin and Gore 2010, Keller-Wood 2015).

Die Struktur von TRH wurde als erstes hypothalamisches Neuropeptid 1969 aufgeklärt (Boler et al. 1969). Prepro-TRH besteht aus sechs Kopien des TRH-Vorläufers, welcher durch die Prohormon-Konvertase 1 (PC1) freigesetzt wird. Im Vergleich zu anderen Peptidhormonen ist die Struktur von TRH besonders, da es lediglich aus 3 Aminosäuren, Glutamin, Histidin und Prolin, aufgebaut ist (Ikegami, Liao et al. 2014). Posttranslationale Modifikationen führen zu dem aktiven Tripeptid: Am C-Terminus kommt es zu einer Amidierung des Prolins und am N-Terminus zu einem Ringschluss, wodurch das Peptid vor dem Abbau durch Peptidasen geschützt wird (Bauer 1988).

TRH kann nun einerseits direkt als Neurotransmitter Effekte ausüben, wie beispielsweise auf die POA und dort die Körpertemperatur beeinflussen, oder aber indirekt durch Stimulation von TRH-Rezeptor-1 (TRHR1) die Bildung und Sekretion des Thyroidea-stimulierenden Hormons (TSH) in thyrotrophen Zellen der Neurohypophyse anregen (Chiamolera and Wondisford 2009, Mullur, Liu et al. 2014). Die Sekretion von TSH führt an der Schilddrüse zu einer Freisetzung von Trijodthyronin (T3) und Thyroxin (T4), welche in den Follikeln gebildet wurden. Über negative Rückkopplungsmechanismen finden Feinabstimmungen statt, die zu den gewünschten Plasmakonzentrationen der Schilddrüsenhormone führen. So wird die Bildung von TRH im Hypothalamus und die Bildung von TSH in der Hypophyse durch hohe T4-Plasmaspiegeln inhibiert und eine

überschießende Bildung von T3 und T4 verhindert (Mullur, Liu et al. 2014, Ortega-Carvalho, Chiamolera et al. 2016, Hoermann, Midgley et al. 2018). Bei einer Fehlregulation der HPT-Achse kann es zu einer Schilddrüsenüber- oder unterfunktion mit vielfältigen Auswirkungen auf den Organismus kommen (Kravets 2016).

Die Schilddrüsenhormone haben Einfluss auf eine Vielzahl physiologischer Prozesse. Sie wirken überwiegend dadurch, dass sie den Energieverbrauch steigern und katabole Prozesse fördern (Kouidhi and Clerget-Froidevaux 2018). Es kommt zu einer vermehrten Glukoseresorption und Glukoneogenese (Fukuchi, Shimabukuro et al. 2002). Außerdem werden Glykolyse und Lipolyse gesteigert (Chidakel, Mentuccia et al. 2005). Über eine Induktion der Expression von β -AR führen sie indirekt zu gesteigerter Chrono- und Inotropie am Herzen (Yavuz, Salgado Nunez Del Prado et al. 2019). Folglich steigt der systolische Blutdruck, wohingegen der diastolische abnimmt. Außerdem kann, vermittelt über Schilddrüsenhormonrezeptoren an Adipozyten, die zitterfreie Thermogenese gesteigert werden, die näher in Kapitel 1.3.3 erläutert wird.

Auf zellulärer Ebene sind zahlreiche Prozesse beteiligt, die zu einer Beeinflussung der Plasma-TRH-Spiegel führen. Der prepro-TRH-Promotor wird nach Bindung von unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren aktiviert, was schließlich in einer erhöhten TRH-Expression resultiert. Der Promotor enthält beispielsweise eine Bindestelle für Glukokortikoide. Die circadiane Expression der Glukokortikoide (siehe Kapitel 1.1.4) trägt daher zu den circadianen Schilddrüsenhormonspiegeln bei (Lee, Yang et al. 1996, Cote-Vélez, Pérez-Martínez et al. 2005, Russell, Harrison et al. 2008). Der prepro-TRH-Promotor enthält darüber hinaus weitere Bindestellen für CREB und *signal transducers and activators of transcription* (STAT) (Lee, Stewart et al. 1988, Balkan, Tavianini et al. 1998), weshalb die Bindung dieser Transkriptionsfaktoren die prepro-TRH-Promotoraktivität häufig steigert (Cyr, Toorie et al. 2013, Xia, Zhang et al. 2015, Sotelo-Rivera, Cote-Vélez et al. 2017).

1.3.2.2 Transkriptionsfaktor *cAMP response element-binding protein*

Die Bindung von Hormonen an G_s -gekoppelte Rezeptoren (siehe Kapitel 1.4) führt zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration (Tamotsu, Schomerus et al. 1995, Lefkowitz 2000). Diese lokal auftretende cAMP-Erhöhung führt zur Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade, an deren Ende unter anderem die Initiierung der CREB-abhängigen Genexpression steht (Montminy, Gonzalez et al. 1990, Lee 1991,

Bonni, Ginty et al. 1995, Sassone-Corsi 2012). Bei CREB handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der zu der Leucin-Zipper-Proteinfamilie gehört. Dieser wird mit dem *cAMP response element modulatory protein* (CREM) und dem *activating transcription factor 1* (ATF1) zur CREB/ATF-Unterfamilie zusammengefasst (Lonze and Ginty 2002). Die drei Proteine können als Homo- oder Heterodimere an die spezifische DNA-Erkennungssequenz CRE binden und die Genexpression nachfolgender Gene regulieren (Swope, Mueller et al. 1996). CRE besteht aus der palindromischen Sequenz TGACGTCA oder einem Teil davon (TGACG bzw. CGTCA) und befindet sich meist in der Promotorregion einer Vielzahl von Genen (Galliot, Welschhof et al. 1995).

Es sind zahlreiche weitere Stimuli bekannt, die zu einer Phosphorylierung von CREB führen: Wachstumsfaktoren (Gampe, Brill et al. 2011, Zhang, Yang et al. 2019), Insulin (Koo, Flechner et al. 2005, Ravnskjaer, Madiraju et al. 2016), Zytokine (Wen, Sakamoto et al. 2010), Peptidhormone (Zhang, Chery et al. 2020) oder adrenerge Hormone wie Noradrenalin (NA) (Peinado and Myers 1987, Füzesi, Wittmann et al. 2009). Die Phosphorylierung von CREB erfolgt an Ser133 in der Kinase-induzierbaren Domäne (KID) (Bonni, Ginty et al. 1995, Cardinaux, Notis et al. 2000). In Abhängigkeit des jeweiligen Stimulus gibt es eine Vielzahl intrazellulärer Kinasen, die zu einer CREB-Phosphorylierung führen. Bislang konnte dies beispielsweise für Proteinkinase B (PKB), PKC, CaMK I und II, Proteinkinase G und Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) gezeigt werden (Gonzalez and Montminy 1989, Sun and Maurer 1995, Shaywitz and Greenberg 1999). Die wohl bekannteste CREB-phosphorylierende Kinase stellt Proteinkinase A (PKA) dar. Eine cAMP-Akkumulation im Zytoplasma führt zu einer Aktivierung dieser Serin/Threonin-Kinase (Corbin and Krebs 1969). Unter basalen Bedingungen liegt PKA im Zytoplasma als Heterotetramer, bestehend aus zwei regulativen und zwei katalytischen Untereinheiten, vor (Lonze and Ginty 2002). Die Bindung von cAMP führt zu einer Freisetzung der katalytischen Untereinheiten, welche daraufhin in den Zellkern transportiert werden können (Yang 2018). Dort kann PKA schließlich CREB an Ser133 phosphorylieren. Diese Phosphorylierung ist Voraussetzung für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors, allerdings nicht immer ausreichend, um CREB-bindendes Protein (CBP) und p300, beides Co-aktivierende Proteine, zu rekrutieren und die Expression von Zielgenen zu initiieren: Es konnte gezeigt werden, dass es häufig der Zusammenarbeit weiterer Cofaktoren, wie *CREB-regulated transcription coactivators* (CRTC), bedarf (Lerner, Depatie et al. 2009). Die

Phosphorylierung von CREB an Ser133 kann schließlich zu einer Interaktion mit der *KID-interacting*-Domäne von CBP/p300 führen, was durch eine Rekrutierung des RNA-Polymerase-II-Komplexes in einer erhöhten Transkription der Zielgene endet (Shaywitz, Dove et al. 2000).

Die Aktivierung von CREB-abhängiger Genexpression ist an vielfältigen Prozessen beteiligt. In der Leber wird, vermittelt durch Glukagon, die hepatische Glukoneogenese durch eine Aktivierung von CREB-abhängigen Genen wie Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase und Glukose-6-phosphatase gesteigert (Herzig, Long et al. 2001). CREB ist auch an der Wahrnehmung des zellulären Energiestatus beteiligt: Sinkt der zelluläre ATP-Spiegel, wird die AMP-abhängige Kinase (AMPK) aktiviert, die zum Teil durch Phosphorylierung und damit Inaktivierung von CRTC2 zu einer Inhibition der hepatischen Glukoneogenese und zu einer erhöhten β -Oxidation und Ketogenese führt (Koo, Flechner et al. 2005). Auch auf β -Zellen des Pankreas übt CREB einen großen Einfluss aus: CREB und CRTC2 vermitteln die Effekte von Glukose und Inkretinhormonen wie GLP1 auf transkriptioneller Ebene (Screaton, Conkright et al. 2004). Sie führen zu einer erhöhten Expression von *insulin receptor substrate 2*, was eine Schlüsselrolle im Insulin-abhängigen Signalweg einnimmt und zu einer erhöhten Überlebensrate der β -Zellen führt (Jhala, Canettieri et al. 2003, Inada, Hamamoto et al. 2004).

Auch auf den Lipidstoffwechsel nimmt CREB modulierend Einfluss: Bei erhöhter Zufuhr von Triglyceriden kommt es zu einer erhöhten Phosphorylierung von CREB in Adipozyten, was zu einer erhöhten Insulinresistenz im gesamten Körper führt (Qi, Saberi et al. 2009). CREB-vermittelt kommt es hier zu einer ATF3-Erhöhung, was zu einer verringerten Expression des Insulin-sensitiven Glukosetransporter-4 führt (Qi, Saberi et al. 2009). Am Skelettmuskel bedingt die Expression einer dominant-negativen CREB-Variante einen dystrophischen Phänotyp mit ausgeprägtem progressivem Muskelschwund, chronischer Entzündung des Skelettmuskels und Myonekrose (Berdeaux, Goebel et al. 2007). CREB ist an der neuronalen Plastizität und Differenzierung beteiligt, was für die normale Entwicklung notwendig ist (Sakamoto, Karelina et al. 2011). Auch an hypothalamischen Neuronen ist der Einfluss von CREB bereits vielfach gezeigt worden. Leptin-vermittelt kommt es zu einer Induktion von CRTC1 und einer CREB-abhängigen Expression des anorexigenen Hormons CART

(Xing, Ginty et al. 1996). Außerdem können gesteigerte Glukosespiegel zu einer erhöhten Aktivität von CRTC1 und damit der CREB-abhängigen Genexpression führen (Lerner, Depatie et al. 2009). Darüber hinaus konnte bereits gezeigt werden, dass CREB an der Synchronisierung des circadianen Rhythmus an Neuronen des SCN maßgeblich beteiligt ist (Reppert and Weaver 2001).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist von besonderem Interesse, dass auch der prepro-TRH-Promotor CREB-bindende Elemente aufweist (Jung, Yang et al. 1994). Es konnte hierzu bereits gezeigt werden, dass der prepro-TRH-Promotor durch CREB aktiviert wird (Xia, Zhang et al. 2015). Somit kann es nach Stimulierung von G_s -gekoppelten Rezeptoren durch eine erhöhte CREB-Aktivierung zu einer gesteigerten TRH-Expression kommen. CREB ist somit ein Transkriptionsfaktor, der entscheidend an der Weiterleitung adrenerger Signale beteiligt ist und vielfältige zelluläre Prozesse reguliert.

1.3.2.3 Transkriptionsfaktoren *signal transducers and activators of transcription*

Weitere wichtige Transkriptionsfaktoren im PVN stellen STAT1-5 Proteine dar (Roy, Benomar et al. 2007, Hong, Song et al. 2009). Zusammen mit Januskinasen (JAK) sind sie ein effizientes und hochreguliertes System zur Modulation der Genexpression, wobei der Signalweg als JAK-STAT-Signalweg bezeichnet wird (Rawlings, Rosler et al. 2004). STAT-abhängige Genexpression wird vermehrt nach Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen initiiert (Morris, Kershaw et al. 2018). Nach Ligandenbindung, beispielsweise Zytokinen wie Interleukin 6, kommt es zu einer Konformationsänderung, die eine Aktivierung der assoziierten JAK bedingen. Es kommt zu einer Autophosphorylierung von JAK und nachfolgender Phosphorylierung des Rezeptors. Diese fungiert als Rekrutierungsstelle für STAT-Transkriptionsfaktoren aufgrund der *src homology 2*-Domäne (Rawlings, Rosler et al. 2004). So assoziieren STAT1 und STAT3 an die Rezeptoruntereinheit, werden von JAK phosphoryliert und dissoziieren als Homo- bzw. Heterodimer von dem Rezeptor. Vor der Translokation in den Zellkern werden sie noch an Serinresten phosphoryliert und können anschließend an STAT-Promotorregionen auf Genabschnitten binden, wo sie die Transkription verschiedener Zielgene beeinflussen (Wittes and Schüpbach 2019).

Im zentralen Nervensystem wird die Aktivierung von STAT-abhängiger Genexpression hauptsächlich mit der embryonalen Entwicklung, Freisetzung von Hormonen, Entzündungsreaktion und Entstehung von Tumoren assoziiert (Banerjee, Biehl et al.

2017, Villarino, Kanno et al. 2017, Trivedi and Starz-Gaiano 2018, Yeung, Aziz et al. 2018, Xin, Xu et al. 2020). Eine Fehlregulation des JAK-STAT-Signalwegs wurde ebenso mit der Entstehung von Epilepsie und Alzheimer in Verbindung gebracht (Henrik Heiland, Ravi et al. 2019, Nevado-Holgado, Ribe et al. 2019, Singh, Singh et al. 2020). Der Signalweg ist maßgeblich an der Regulation der Energiehomöostase beteiligt. Mäuse mit einer gestörten STAT3- oder STAT5-Expression zeigen neuroendokrine Defekte, die zu Fettleibigkeit, Unfruchtbarkeit und Diabetes führen (Gao, Wolfgang et al. 2004, Lee, Muenzberg et al. 2008). Bindet Leptin an den Leptinrezeptor, führt das an Neuronen des ARC zu einer gesteigerten Synthese von anorexigenen Peptiden, wie α -MSH und einer verringerten Produktion von orexigenen Peptiden, wie NPY (Schwartz, Woods et al. 2000). Zusammenfassend lässt sich daran erkennen, dass STAT-Transkriptionsfaktoren im Hypothalamus überaus wichtige Funktionen erfüllen.

1.3.2.4 Transkriptionsfaktoren *forkhead-box*-Protein O

Forkhead-Box (FOX)-Proteine sind Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation von zahlreichen Prozessen beteiligt sind. Sie nehmen Einfluss auf Proliferation, embryonale Entwicklung und Differenzierung (Lam, Brosens et al. 2013). Sie werden aufgrund genetischer Unterschiede in Gruppen von A bis R eingeteilt (Katoh and Katoh 2004). Ihnen gemeinsam ist die konservierte DNA-Bindedomäne, die aus etwa 100 Aminosäuren besteht. Durch Bindung von Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren an die α -Untereinheit seines Rezeptors kommt es zu einer Konformationsänderung, welche zu einer Aktivierung der Rezeptortyrosinkinasedomäne führt, die im Folgenden kurz erläutert wird (Farhan, Wang et al. 2017, Manning and Toker 2017, Zhang and Zhang 2019): ATP-abhängig kommt es zu einer Autophosphorylierung an mehreren Tyrosinresten des Rezeptors, und es entsteht eine Bindungsstelle für das Insulinrezeptorsubstrat-1 (IRS-1), welches anschließend phosphoryliert wird. Nachfolgend können Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) und *growth factor receptor-bound protein 2* daran binden. PI3K kann entweder direkt über die p85-Untereinheit an die SH2-Domänen oder indirekt über Adapterproteine binden. PI3K phosphoryliert im Anschluss Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃), was zur Rekrutierung von PKB führt. Durch aktivierende Phosphorylierung ist PKB im Nachgang dazu fähig, FOXO zu phosphorylieren, was zu

einer Translokation vom Zellkern in das Zytoplasma führt. Folglich können FOXO-Zielgene nicht mehr transkribiert werden.

FOXO1 spielt als Regulator der Nahrungsaufnahme und Energiehomöostase eine wichtige Rolle im Hypothalamus. FOXO-Bindestellen werden in der Promotorregion von NPY exprimiert. Durch Bindung von FOXO kann daher die Expression kontrolliert werden (Gross, Wan et al. 2009). Außerdem führte eine Aktivierung von Neuronen des ARC zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme und verringertem Energieverbrauch (Kim, Pak et al. 2006). Somit erfüllt auch FOXO im Hypothalamus wichtige Aufgaben, die jedoch noch nicht vollständig geklärt sind.

Bislang wurde die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren im Hypothalamus, wie CREB, STAT und FOXO, noch nicht in Abhängigkeit von physiologischen Körpertemperaturänderungen untersucht.

1.3.3 Die Thermogenese

Neben der Regulation der Energiehomöostase kann eine Aktivierung der HPT-Achse, mit einer erhöhten Konzentration der Schilddrüsenhormone im Plasma, auch zu einer gezielt gesteigerten Wärmebildung führen, um das Absinken der Körpertemperatur zu verhindern (Zhang, Boelen et al. 2018, Yau and Yen 2020). Dieser Prozess wird als Thermogenese bezeichnet. Man unterscheidet obligatorische und fakultative Thermogenese (Chouchani, Kazak et al. 2019). Während die obligatorische Thermogenese die Wärmeproduktion beschreibt, die aufgrund physiologischer Prozesse unabdingbar entsteht, ist die fakultative (auch adaptive) Thermogenese eine Anpassung auf eine fallende Körpertemperatur (Silva 1995).

Sinkt die Umgebungstemperatur, wird es durch physiologische Gegenmaßnahmen erforderlich, eine zu starke Verringerung der Körperkerntemperatur zu verhindern (Wu, Cohen et al. 2013). Zum einen wird durch einen erhöhten Muskeltonus das Zittern gefördert, was den geringen Wirkungsgrad der Skelettmuskulatur ausnutzt, um die dabei anfallende Wärme zu nutzen (Blondin and Haman 2018). Zum anderen gibt es den Mechanismus der zitterfreien Thermogenese, der hauptsächlich im Fettgewebe und besonders im braunen Fettgewebe stattfindet (Cannon and Nedergaard 2010, Fenzl and Kiefer 2014, Montanari, Pošćić et al. 2017, Nedergaard and Cannon 2018). Die Aktivierung der HPT-Achse aufgrund eines Kältestimulus wird größtenteils durch

katecholaminergen Einfluss aus dem Hirnstamm verursacht (Annunziato, Renzo et al. 1977). Hypophysiotrope Neurone im PVN sind stark durch katecholaminerge Neurone innerviert (Füzesi, Wittmann et al. 2009). Diese Neurone sind dadurch gekennzeichnet, dass sie Adrenalin und NA synthetisieren und freisetzen können. Hierfür exprimieren sie die Enzyme Dopamin- β -Hydroxylase (DBH, Synthese von NA und Adrenalin) und Phenylethanolamin-N-Methyl-Transferase (PNMT, Synthese von Adrenalin) (Liposits, Paull et al. 1987). Sowohl DBH als auch PNMT-positive Neurone werden in der medialen, parvozellulären Subdivision des PVN exprimiert, wo auch Thyreoliberin-positive Neurone lokalisiert sind (Füzesi, Wittmann et al. 2009). Noradrenerge Neurone des Hirnstamms werden in 6 Zellgruppen organisiert, wovon lediglich 3 (A1, A2, A6) zum PVN projizieren (Sawchenko, Swanson et al. 1985). Die bislang einzige bekannte physiologische Bedingung, unter der NA zu einer Regulation der TRH-Sekretion führt, ist nach einem Kältestimulus (Uribe, Redondo et al. 1993).

In Abb. 1 ist die kälteinduzierte TRH-Freisetzung mit nachfolgender Aktivierung der zitterfreien Thermogenese dargestellt. Thyreoliberin-positive Neurone des PVN exprimieren AR und werden durch freigesetztes NA oder Adrenalin vorgeschalteter katecholaminerger Neurone aktiviert, was schließlich zu einer gesteigerten TRH-Sekretion führt (Zhang, Boelen et al. 2018). Hierbei kommt es zunächst zur Aktivierung β -adrenerger Rezeptoren, die über eine AC-vermittelte cAMP-Produktion eine PKA-Aktivierung mit nachfolgender CREB-Phosphorylierung bewirken. Da der prepro-TRH-Promotor eine CREB-Bindestelle (siehe Kapitel 1.3.2.2) hat, wird durch eine erhöhte CREB-Phosphorylierung nach einer kälteinduzierten Aktivierung von AR thyreotroper Neurone die prepro-TRH-Promotoraktivität gesteigert, was zu einer erhöhten TRH-Expression und -Freisetzung an Neurone der medianen Eminenz führt (Cabral, Valdivia et al. 2012). Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine zentrale Blockade von AR zu einer Verringerung der CREB-Phosphorylierung und TRH-Expression nach einem Kältestimulus führt (Perello, Stuart et al. 2007). Die Freisetzung von TRH bewirkt eine verstärkte Ausschüttung von TSH aus der Hypophyse, was wiederum in erhöhten T3/T4-Plasmaspiegeln durch Stimulierung der Schilddrüse resultiert (Rage, Lazaro et al. 1994) (siehe Kapitel 1.3.2.1). Die erhöhten T3- und T4-Plasmaspiegel führen zu einer Aktivierung von Schilddrüsenrezeptoren (TR), hauptsächlich TR α , an weißem und braunem Fettgewebe, was maßgeblich zu der Induktion von β -AR und *uncoupling protein 1* (UCP1, Thermogenin) führt. UCP1 ist ein Transmembranprotein, das in der

Mitochondrienmembran von braunem Fettgewebe in hoher Konzentration exprimiert wird und bei der β -Oxidation von Fettsäuren durch Entkopplung des mitochondrialen Protonengradienten von der Atmungskette zu zitterfreier Thermogenese führt (Ikeda and Yamada 2020).

Gleichzeitig kann freigesetztes NA direkt an β -AR von Adipozyten binden und durch Erhöhung der cAMP-Konzentration eine Aktivierung der PKA bewirken. PKA kann nun die Typ-2-Deiodinase (DIO2) aktivieren, die zu einer vermehrten Konversion des weniger aktiven T4 zu T3 führt, was den oben beschriebenen Mechanismus synergistisch fördert (Solomonson and Mills 2016). Es konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die DIO2-defizient sind, eine verringerte Thermogenese und eine verringerte Körpertemperatur auf einen Kältestimulus hin zeigen (Christoffolete, Linardi et al. 2004). Außerdem führt die Behandlung mit NA nicht zu einer gesteigerten Thermogenese an hypothyreotischen Mäusen, die allerdings durch eine chronische Gabe von T3 oder T4 initiiert werden kann (Silva 2001, Silva 2003).

Diese experimentellen Befunde zeigen, dass eine enge Zusammenarbeit zwischen zentraler NA-induzierter TRH-Aktivierung und direkten Effekten von NA an β -AR von weißen und braunen Fettgewebe notwendig sind, um eine adäquate Thermogenese nach einem Kältestimulus zu induzieren (Zhang, Boelen et al. 2018). Ob es auch bei einem physiologischen Absinken der Körpertemperatur im Tagesverlauf zu einer β -AR vermittelten CREB- und prepro-TRH-Aktivierung an PVN-Neuronen des Hypothalamus kommt, ist bislang noch nicht untersucht worden.

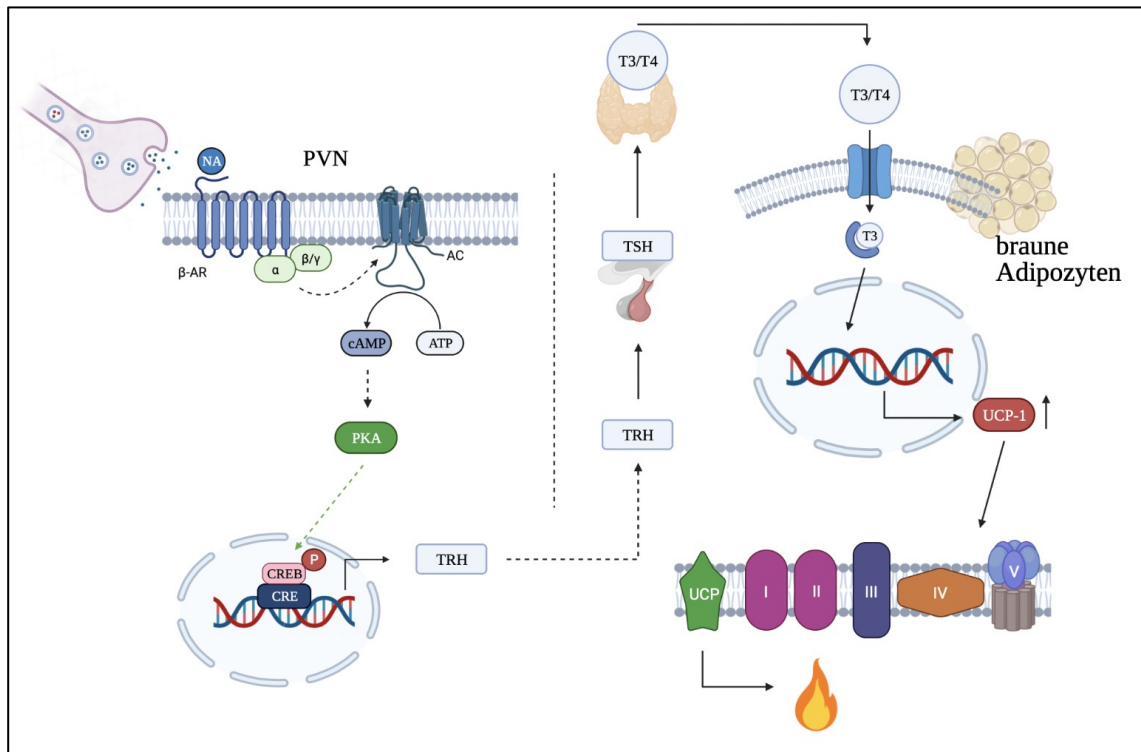


Abb. 1: Schematische Darstellung der kälteinduzierten Thermogenese

Bei einem Kältestimulus kommt es zu einer Freisetzung von NA aus Neuronen des Hirnstamms. NA bindet nachfolgend an β -AR Thyreoliberin-positiver Neurone des PVN, was zu einer cAMP-Akkumulation mit Aktivierung von PKA führt. Die PKA-induzierte Phosphorylierung von CREB führt zu einer erhöhten Expression von TRH, was anschließend die Freisetzung von TSH aus dem Hypophysenvorderlappen bewirkt. An der Schilddrüse bewirkt TSH nun eine verstärkte Freisetzung von T3 und T4, was über TR an größtenteils braunem Fettgewebe in einer erhöhten Expression von UCP1 resultiert. UCP1 führt schließlich zu einer Entkopplung der mitochondrialen Atmungskette, was eine gesteigerte Thermogenese bedingt und somit ein Absinken der Körperkerntemperatur verhindert.

1.3.4 Verwendetes Zellsystem mHypoA-2/10

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Zelllinie mHypoA-2/10 ist eine murine hypothalamische Zelllinie, die von Belsham und Kollegen etabliert wurde (Belsham, Fick et al. 2009). Die Arbeitsgruppe konnte durch retroviralen *simian vacuolating virus 40 tag* (SV40-T)-Antigentransfer, hypothalamische Neurone von zwei Monate alten, männlichen C57BL/6-Mäusen immortalisieren. Diese Kulturen wurden anschließend klonal selektioniert. Das untersuchte Zellsystem weist einige typische Charakteristika Thyreoliberin-positiver Neurone des PVN auf (Dhillon and Belsham 2011, Dhillon, McFadden et al. 2011, Dalvi and Belsham 2012, Dalvi, Erbiceanu et al. 2012, Dhillon, Gingerich et al. 2012): Die Zellen sind durch α -MSH stimulierbar und durch NPY

inhibierbar, was auf der Expression von Melanocortin-4- und NPY-Rezeptoren beruht (Nillni 2007, Breit, Besik et al. 2015). Ferner konnte gezeigt werden, dass sie TRH produzieren und sezernieren können (Sarkar, Légrádi et al. 2002, Breit, Besik et al. 2015, Glas, Mückter et al. 2016). Des Weiteren wird die TRH-Produktion negativ durch das Schilddrüsenhormon T3 reguliert, was im Einklang mit dem Mechanismus der negativen Rückkopplung steht (siehe Kapitel 1.3.2.1) (Guissouma, Ghorbel et al. 1998, Guissouma, Ghaddab-Zroud et al. 2014, Breit, Besik et al. 2015). Basierend auf diesen Befunden wurde das Zellsystem im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Studie der Temperaturabhängigkeit von Thyreoliberin-positiven Neuronen des PVN verwendet.

1.4 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

G-Protein gekoppelte Rezeptoren [engl. *G protein-coupled receptors* (GPCR)] sind die am häufigsten an der Zelloberfläche vorkommenden Rezeptoren: Etwa 800 der 21000 Gene des Menschen kodieren für GPCRs (Rosenbaum, Rasmussen et al. 2009). Sie sind daher für eine Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse essentiell (Lefkowitz 2000). Sie sind an der hormonellen Kontrolle von nahezu allen physiologischen Vorgängen beteiligt und vermitteln beispielsweise die Wahrnehmung von Schmerz (Ehrlich, Kieffer et al. 2019, Gottesman-Katz, Latorre et al. 2021), Licht (Ridge and Palczewski 2007), Geschmack (Töle, Behrens et al. 2019, Ahmad and Dalziel 2020) und Geruch (Buck and Axel 1991, Antunes and Simoes de Souza 2016, Dalesio, Barreto Ortiz et al. 2018). Es ist daher wenig überraschend, dass der Großteil der im Markt befindlichen Pharmaka GPCRs als Zielstruktur haben (Saikia, Bordoloi et al. 2019): Pharmaka gegen Bluthochdruck (Nguyen, Dominguez et al. 2010), Schmerz (Narouze, Benzon et al. 2015), Depression (Komatsu 2015), Asthma (Deshpande and Penn 2006), Übelkeit (Belkacemi and Darmani 2020) und auch einige Krebserkrankungen (Hauser, Chavali et al. 2018, Wang, Gareri et al. 2018) üben ihre therapeutische Wirkung über Aktivierung oder Inhibition von GPCRs aus.

Diese bestehen typischerweise aus sieben Transmembrandomänen, weshalb sie häufig auch als heptahelikale Rezeptoren bezeichnet werden (Kilpatrick, Dautzenberg et al. 1999). Sie werden basierend auf Ähnlichkeiten der Gene in vier Familien eingeteilt: Rhodopsin- (Familie A), Sekretin- (Familie B), Glutamat- (Familie C) und die *frizzled/smoothened*-Familie (Fredriksson, Lagerström et al. 2003). Familie A, mit

Abstand die größte, enthält eine Vielzahl an Rezeptoren, wovon ein Großteil für olfaktorische Rezeptoren kodieren (Lefkowitz 2000). Familie B besteht lediglich aus etwa 25 Rezeptoren, wovon einige äußerst wichtige Funktionen im GIT erfüllen (Hilger, Kumar et al. 2020). Die Familie C zeichnet sich durch besonders große extrazelluläre Domänen aus und kodiert beispielsweise für metabotrope Glutamatrezeptoren. Die *frizzled/smoothened*-Familie sind von Bedeutung in *Drosophila melanogaster*; es sind allerdings auch Orthologe in Menschen bekannt (Graul and Sadée 2001).

Experimente an Rezeptorchimären brachten Erkenntnisse über die Beteiligung von G-Proteinen an der Signalkaskade (Rosenbaum, Rasmussen et al. 2009). Es wurde klar, dass eine funktionelle Signaleinheit aus einem Liganden, welcher extrazellulär an den Rezeptor bindet, dem intrazellulär assoziierten G-Protein und einem Effektor besteht (Kobilka, Kobilka et al. 1988, Wong, Parker et al. 1990). Die extrazelluläre Bindung von Liganden an den Rezeptor führt zu einer intrazellulären G-Proteinaktivierung und Akkumulation eines sekundären Botenstoffs, wie beispielsweise cAMP oder Ca^{2+} , die weitere Effektormoleküle, wie Kinasen oder Transkriptionsfaktoren, aktivieren können. GPCRs können allerdings auch G-Protein-unabhängig, beispielsweise β -Arrestin-vermittelt, die intrazelluläre Signalweiterleitung beeinflussen (DeWire, Kim et al. 2008).

1.4.1 Bradykininrezeptoren

Bradykininrezeptoren existieren in zwei Subtypen: B1- und B2-Bradykininrezeptoren (B1R bzw. B2R). Während der B2R konstitutiv in nahezu allen Zellen exprimiert wird, ist der B1R ein prototypisches Beispiel für eine induzierbare Expression: Unter physiologischen Bedingungen ist der B1R nur sehr schwach exprimiert und wird erst bei Entzündungsreaktionen drastisch hochreguliert (Leeb-Lundberg, Marceau et al. 2005).

Das Kallikrein-Kinin-System ist ein Regelsystem, das wichtige Aufgaben bei der Steuerung des Blutdrucks sowie der Blutgerinnung übernimmt und Entzündungsreaktionen sowie Schmerz vermittelt (Hillmeister and Persson 2012). Die Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems führt zu einer endogenen Signalkaskade, an deren Ende die Freisetzung vasoaktiver Kinine steht (Scicli and Carretero 1986). Plasma- oder Gewebskininogene werden durch die entsprechenden Kallikreine gespalten und Kinine wie Bradykinin (BK) oder Kallidin freigesetzt. Die Wirkung der Kinine wird größtenteils über Aktivierung von B1R und B2R vermittelt. Beide Rezeptoren gehören

zu den GPCR und interagieren mit $G_{q/11}$ und G_i -Proteinen (siehe Kapitel 1.4.2.1) (Wilczak, Gutowski et al. 1994). Während für den B1R des-Arg⁹-Bradykinin und des-Arg¹⁰-Kallidin als endogene Liganden bekannt sind, wird der B2R durch BK und Kallidin aktiviert. In Mäusen ist BK vermutlich der einzige endogene Ligand am B2R (Zubakova, Gille et al. 2008).

Die Kopplung an $G_{q/11}$ -Proteine nach Aktivierung der Rezeptoren führt zu einer Stimulierung der β -Isoform der Phospholipase C (PLC β), welche daraufhin die Hydrolyse von PIP₂ katalysiert, was in der Bildung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) resultiert. Diese beiden sekundären Botenstoffe können weitere Effektoren aktivieren. So führt IP₃ zu einer Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels durch Entleerung zellulärer Ca²⁺-Speicher, während DAG die PKC aktivieren kann (Harden, Waldo et al. 2011, Putney and Tomita 2012). Eine Erhöhung des Ca²⁺-Spiegels kann auch zu einer Aktivierung der CaMK mit einer Phosphorylierung und Aktivierung von CREB führen (Sheng, Thompson et al. 1991). In dem untersuchten Zellsystem mHypoA-2/10 konnte gezeigt werden, dass die BK-induzierte CREB-Phosphorylierung durch PKC vermittelt wurde (Breit et al., nicht publiziert). Ferner konnte nachgewiesen werden, dass die BK-induzierte ERK-Phosphorylierung mit nachfolgender STAT-Aktivierung durch eine *epidermal growth factor receptor*- (EGFR) Transaktivierung erfolgte (Breit, Besik et al. 2015). Aktivierung des B2R kann auch zu einer Kopplung mit G_i -Proteinen führen, was eine Aktivierung von ERK1/2 bedingen kann (Pruitt and Der 2001).

Die Expression des B2R konnte für unterschiedlichste Gehirnareale, wie beispielsweise im Rückenmark, im Hypothalamus und im Stammhirn gezeigt werden (Raidoo and Bhoola 1997). Auch Neurone des PVN exprimieren den B2R (Qadri, Rimmele et al. 2016). Eine Beteiligung von BK-Rezeptoren an der Appetitregulation im Hypothalamus wird vermutet (Mori, Araújo et al. 2008, Qadri, Rimmele et al. 2016). Interessanterweise wird der B1R temperaturabhängig aktiviert: Stimulierung des B1R mit seinem endogenen Liganden bei 37 oder 41 °C führt zu einer temperaturabhängigen Aktivität PLC β -vermittelter Signalwege (Leschner, Ring et al. 2011). Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Erhöhung der Temperatur um 4 °C zu einer signifikant erhöhten Inositolphosphat-Akkumulation und NFAT-Reporteraktivierung führt. Dies konnte nach Aktivierung des B2R nicht nachgewiesen werden.

Ob auch bei physiologischen Temperaturänderungen (35,5 – 38,5 °C) eine Modulation der BK-Rezeptoraktivität erfolgt, wurde bislang noch nicht untersucht.

1.4.2 Die β_2 -Adrenozeptor-vermittelte cAMP-Produktion

Aufgrund ihrer pharmakologischen und molekularbiologischen Eigenschaften werden AR in drei Familien unterteilt: α_1 -, α_2 - und β -AR (Docherty 2010). Während α_1 -AR über $G_{q/11}$ -Proteine den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel beeinflussen können und α_2 -AR G_i -vermittelt zu einer reduzierten Adenylatzyklase [engl. *adenylate cyclase* (AC)]-Aktivität führen, sind β -AR an G_s -Proteine gekoppelt und erhöhen AC-vermittelt den intrazellulären cAMP-Spiegel (Hein 2004). β -AR werden in drei wesentliche Gruppen eingeteilt: β_1 -, β_2 - und β_3 -AR. Diese wurden zuerst in Herz, Lunge bzw. in Fettzellen identifiziert (Frielle, Daniel et al. 1988, Lefkowitz 2000). Tatsächlich werden die Rezeptorsubtypen in fast allen Geweben exprimiert und sind an vielfältigen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt (Wallukat 2002).

Der β_2 -AR ist in der größten Zahl in glatten Muskelzellen der Lunge exprimiert und führt dort nach Stimulation zu einer Relaxation der Bronchien. Daher ist es nicht verwunderlich, dass β_2 -AR-Agonisten zur Therapie des *Asthma bronchiale*, bei chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen [engl. *chronic obstructive pulmonary disease* (COPD)] sowie zur Notfalltherapie bei allergischen Reaktionen eingesetzt werden.

β_2 -AR werden auch im zentralen Nervensystem, u.a. auch im Hypothalamus, exprimiert (Rainbow, Parsons et al. 1984, Little, Duncan et al. 1992, Hertz, Lovatt et al. 2010, Oshima, Onimaru et al. 2014, Gao, Suzuki et al. 2016). Sie sind dort an der Appetitregulation sowie an der Regulation der Körpertemperatur durch Thermogenese beteiligt (Chi and Lin 1983, Boundy and Cincotta 2000). Dort kommt es wie bereits in Kapitel 1.3.3 beschrieben, durch Freisetzung von NA an Neurone des PVN, zur Aktivierung von β_2 -AR Thyreoliberin-positiver Neurone. Dies führt zu einer verstärkten AC-Aktivität mit einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels. Durch PKA-vermittelte Phosphorylierung des CREB-Transkriptionsfaktors, kann die prepro-TRH-Promotoraktivität gesteigert und schließlich erhöhte TRH-Spiegel bewirkt werden. Die erhöhte TRH-Konzentration kann nachfolgend über Aktivierung der HPT-Achse zu einer verstärkten Thermogenese führen (siehe S. 40 Abb. 1).

In den nachfolgenden Kapiteln wird die β_2 -AR-vermittelte Aktivierung des cAMP-abhängigen Signalwegs, mit besonderem Fokus auf den Einfluss physiologischer Körpertemperaturänderungen auf diese Aktivierung, näher beschrieben.

1.4.2.1 Ligandenbindung und G-Proteinaktivierung

Die Signalkaskade wird initiiert durch die Bindung von NA oder Adrenalin an seinen Rezeptor, was nachfolgend für den β_2 -AR näher erläutert wird.

Für eine Rezeptoraktivierung ist die Wechselwirkung der Liganden mit einigen Rezeptorregionen essenziell: Die phenolische Hydroxygruppe der Katecholamine interagiert mit Serin-Resten der fünften Transmembrandomäne, während die aliphatische mit Asparagin-Resten der sechsten Transmembrandomäne Wechselwirkungen eingeht (Strader, Candelore et al. 1989, Wieland, Zuurmond et al. 1996). Die Amin- und Carboxygruppe von Liganden steht mit Asp113 über ionische Wechselwirkungen in Kontakt (Strader, Sigal et al. 1988). Darüber hinaus sind eine Vielzahl weiterer, teils lockerer Wechselwirkungen, beschrieben worden (Isogaya, Sugimoto et al. 1999).

Die Ligandenbindung ist typischerweise stark temperaturabhängig, da zumindest drei Vorgänge durch sie beeinflussbar sind: 1. die Präsentation und Aufrechterhaltung einer aktiven Bindestelle für den Liganden, 2. die Ausbildung nicht-kovalenter Bindungen zwischen Ligand und Bindestelle, und 3. die Konformationsänderungen während der Bindung und Aktivierung des Rezeptors (Somero 1995).

Der β_2 -AR wechselt spontan zwischen zwei Konformationen. Die hochaffine $[R^*]$ und die niederaffine $[R]$ Konformation werden auch ohne Agonisten im basalen Zustand eingenommen und stehen in einem Gleichgewicht zueinander (De Lean, Stadel et al. 1980). Das Gleichgewicht liegt im unbesetzten Zustand des Rezeptors deutlich auf der Seite der niederaffinen Konformation, da hier die freie Energie des Systems am geringsten ist (siehe Kapitel 1.2.4). Aufgrund einer spontanen Rezeptor-Isomerisierung von $[R]$ nach $[R^*]$ ergibt sich eine basale Rezeptoraktivität (Johnson 2006). Agonisten binden bevorzugt an $[R^*]$ und stabilisieren diese Konformation, wodurch sich das Gleichgewicht in Richtung $[R^*]$ verschiebt.

Die Bindung eines Agonisten allein reicht jedoch nicht aus, um die niederaffine Konformation in die hochaffine zu überführen. Um die Energiebarriere vollständig zu überwinden, ist die intrazelluläre Bindung von einem G-Protein notwendig (Rasmussen,

Choi et al. 2011, Warne, Edwards et al. 2019). G-Proteine sind Guaninnukleotid-bindende Proteine, welche eine Art molekularen Schalter in der Signaltransduktion darstellen (Oldham and Hamm 2008). Sie bestehen aus α -, β - und γ -Untereinheiten. Insgesamt sind bisher 16 α -, 5 β - und 12 γ -Untereinheiten sequenziert worden (Milligan and Kostenis 2006, Smrcka and Fisher 2019). Die α -Untereinheit entscheidet typischerweise über die Bezeichnung des G-Proteins. So besteht der heterotrimere G_s -Komplex aus einer α_s Untereinheit, der G_i Komplex aus einer α_i -Untereinheit und der $G_{q/11}$ -Komplex aus einer $\alpha_{q/11}$ -Untereinheit (Oldham and Hamm 2008). Die β/γ -Untereinheiten sind fest assoziiert und können als Dimer, genauso wie die aktivierte α -Untereinheit, weitere Signalwege aktivieren oder inhibieren (Gierschik and Camps 1994, Smrcka 2008). Im GDP-gebundenen Zustand ist die α -Untereinheit des G-Proteins inaktiv. Über GTP-Austauschfaktoren [engl. *guanine nucleotide exchange factors* (GEF)] kann GDP durch GTP ausgetauscht und die α -Untereinheit des G-Proteins aktiviert werden (Johnston and Siderovski 2007). So führt die Bindung eines adäquaten Liganden, wie beschrieben, zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, wodurch dieser als GEF fungieren kann und die Dissoziation von GDP und Bindung von GTP ermöglicht (Oldham and Hamm 2008). Durch die Bindung von GTP wird die α -Untereinheit aktiviert und die β/γ -Untereinheit freigesetzt. Diese Untereinheiten können dann an verschiedene Effektormoleküle binden und aktivieren (Smrcka and Fisher 2019).

Der Wechsel von [R] nach [R*] bedarf einer Aktivierungsenergie (Jang, Adams et al. 2020). Es ist daher naheliegend, dass die Temperatur einen Einfluss auf das Gleichgewicht der Rezeptoraktivierung nehmen kann, da die Bindungsenthalpie einer Rezeptor-Ligand-Interaktion temperaturabhängig ist (siehe Kapitel 1.2.4). So könnte eine erhöhte Temperatur die Aktivierungsenergie für den Wechsel von [R] nach [R*] herabsetzen und somit eine erleichterte Bindung mit nachfolgender G-Proteinaktivierung des Liganden ermöglichen, was schließlich zu einer erhöhten CREB-Aktivierung führen könnte.

Auch die Interaktion zwischen Rezeptor und dem G-Protein, bzw. zwischen G-Protein und dem Effektorprotein, sind als Proteininteraktionen grundsätzlich abhängig von der Umgebungstemperatur (Zhang, Zhou et al. 2015) (siehe Kapitel 1.2.4). Die Bindung von Carbamylcholin an den Muskarinrezeptor ist bei 30 °C verglichen mit 37 °C signifikant erhöht (Aronstam and Narayanan 1988). Ebenso ist die Bindung von dem

Benzophenonligand ^{125}I -[Sar¹,Bpa⁸]AngII an den humanen Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptor abhängig von der Temperatur (Arsenault, Renaud et al. 2007). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Temperatur einen starken Einfluss auf die Ausbildung von Kontaktpunkten zwischen Rezeptor und Ligand nimmt und dass deren Bindung bei 37 °C äußerst dynamisch erfolgt. Bereits geringe Temperaturänderungen konnte die Ausbildung dieser Kontaktpunkte beeinflussen. Auch die G-Proteinaktivierung ist abhängig von der Temperatur. An Membranpräparationen wurde die temperaturabhängige G-Proteinaktivierung an Rhodopsinrezeptoren studiert (Kohl and Hofmann 1987). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Aktivierung, wurde als der Austausch von GDP gegen GTP identifiziert, der zusätzlich noch abhängig von Temperaturänderungen war. Dieser Austausch könnte auch bei physiologischen Temperaturen geschwindigkeitsbestimmend sein und damit eine temperaturabhängige G-Proteinaktivierung im Tagesverlauf bewirken. Brodde und Kollegen konnten nachweisen, dass die Affinität von β -AR-Agonisten an Membranpräparationen der Kaninchenlunge abhängig von der Temperatur ist (Brodde, Kuhlhoff et al. 1983). Sie zeigten, dass die Affinität von Agonisten an den β_1 - und β_2 -AR bei 18 °C verglichen mit einer 37 °C-Kontrollinkubation um den Faktor 4 bis 10 erhöht ist. Interessanterweise wurde dies nur für die Bindung von Agonisten, wie NA oder Isoproterenol, nicht aber für Antagonisten wie Propranolol festgestellt. Gleichzeitig konnte die Gruppe durch Inkubation mit hohen GTP-Konzentrationen nachweisen, dass die Bildung von $[R^*]$ bei 18 °C signifikant reduziert ist, was eine verringerte AC-Aktivität bewirken würde. Wieland und Kollegen konnten zeigen, dass die Bindung von Adrenalin an β -AR isolierter Truthahnerythrozyten bei 1 °C gegenüber 37 °C signifikant erhöht war. Dies wurde für Propranolol nicht beobachtet (Weiland, Minneman et al. 1979). Auch wenn der, in der Arbeit verwendete Temperaturunterschied deutlich von physiologischen Temperaturänderungen abwich, konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Liganden grundsätzlich temperaturabhängig erfolgt. Eine darauf aufbauende Studie der gleichen Arbeitsgruppe konnte diesen Befund an Präparationen von Lungenmembranen aus der Ratte bestätigen (Weiland, Minneman et al. 1980). Hier war die Bindung von Isoproterenol an β -AR bei 25 °C größer als bei 37 oder 50 °C. Auch hier wurde dies nur für die Bindung von Agonisten beobachtet, während die Bindung von Propranolol nicht abhängig von der Temperatur war. Die Gruppe konnte zeigen, dass die Bindung von Antagonisten zu einer Steigerung der Entropie, während die Bindung von Agonisten zu

einer Verringerung der Bindungsenthalpie führt. Dies wurde mit einer Agonisten-induzierten Konformationsänderung von β -AR in Verbindung gebracht, die bei verschiedenen Temperaturen unterschiedlich stabilisiert wird.

Wenngleich die oben aufgeführten Studien keine funktionelle Analyse an ganzen Zellen beinhalten, können sie demonstrieren, dass die Inkubationstemperatur eine wichtige Kenngröße bei der Ligandenbindung und G-Proteinaktivierung darstellt. Außerdem konnte in den Arbeiten gezeigt werden, dass die Bindung bei einer Verringerung der Temperatur erhöht wurde.

1.4.2.2 Adenylatzyklaseaktivität

Die Interaktion von Liganden mit seinem Rezeptor führt wie oben beschrieben zur Aktivierung des gekoppelten G-Proteins. Die aktivierte α -Untereinheit des G_s -Proteins ist nun in der Lage, an ACs zu binden und diese zu aktivieren.

ACs sind, abgesehen von der löslichen AC, die eine wichtige Rolle in der Spermatogenese spielt, membranständige Enzyme, die die Umwandlung von ATP zu cAMP katalysieren (Tang and Gilman 1991). Es sind bislang neun membranständige AC-Subtypen identifiziert worden, die sich außerhalb der konservierten Domänen stark unterscheiden (Cooper 2003). Sie werden aufgrund ihrer Regulation in vier verschiedene Gruppen eingeteilt (Sadana and Dessauer 2009): Die Gruppe I besteht aus den Ca^{2+} -abhängigen AC-Subtypen AC1, 3 und 8. Ca^{2+} -gebundenes Calmodulin ist in dieser Gruppe ein äußerst wichtiger Regulator (Choi, Xia et al. 1992): CaMK II beispielsweise inhibiert die AC3 direkt durch Phosphorylierung an Ser1076 (Wayman, Impey et al. 1995, Wei, Wayman et al. 1996). Die Gruppe II beinhaltet die durch $G_{\beta\gamma}$ stimulierbare Subtypen AC2, 4 und 7 (Tang and Gilman 1991, Diel, Klass et al. 2006, Steiner, Saya et al. 2006). Gruppe III besteht aus die durch G_{α_i} und Ca^{2+} inhibierbaren Subtypen AC5 und 6, was möglicherweise zu oszillierenden Ca^{2+} -abhängigen cAMP-Spiegeln beiträgt (Guillou, Nakata et al. 1999), während die Gruppe IV aus der Forskolin (FSK)-insensitiven AC9 besteht (Seamon and Daly 1986, Sutkowski, Tang et al. 1994, Sadana and Dessauer 2009). Bei FSK handelt es sich um ein Diterpen aus der Wurzel von *Plectranthus barbatus* (Harfenstrauch). Allen AC-Subtypen gemeinsam ist hingegen, dass sie durch GTP-gebundenes G_{α_s} stimuliert werden (Yang, Lee et al. 1997). Einige AC-Isoformen werden durch die α_i -Untereinheit von G-Proteinen inhibiert (Taussig, Tang et al. 1994,

Chen-Goodspeed, Lukan et al. 2005). Die meisten AC-Subtypen werden entweder durch PKA oder PKC reguliert (Jacobowitz and Iyengar 1994, Iwami, Kawabe et al. 1995, Haslauer, Baltensperger et al. 1998). Die Bindestelle für G_{as} unterscheidet sich zur Bindestelle von G_{ai} und FSK (Tesmer, Sunahara et al. 1997, Dessauer, Tesmer et al. 1998, Dessauer, Chen-Goodspeed et al. 2002).

Bei einer G-Proteinaktivierung kommt es nachfolgend zur Bindung von G_{as} an die katalytische Domäne der AC, was zu Konformationsänderungen an der Substratbindestelle führt. ATP, das Substrat, wird daraufhin fest umschlossen und kann zu cAMP umgesetzt werden (Tesmer 1999). Hierbei wird durch Angriff der Ribosylhydroxygruppe in Position 3' an das Phosphat eine intramolekulare 3'-5'-Esterbindung geknüpft (siehe Abb. 2). Das gebildete cAMP kann nun, neben der bereits beschriebenen Aktivierung von PKA, auch weitere Effektormoleküle, wie die *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels exchange proteins directly activated by cAMP* (Epac), aktivieren (Gloerich and Bos 2010, Larsson 2010).

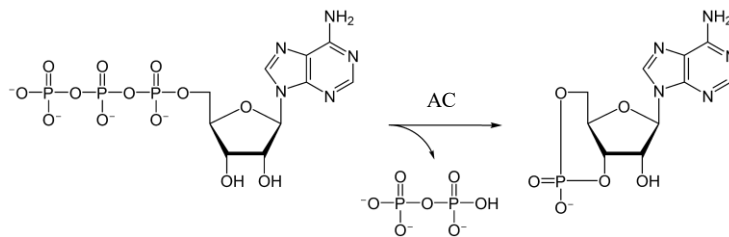


Abb. 2: Darstellung der AC-vermittelten Umwandlung von ATP in cAMP unter Abspaltung von Pyrophosphat

Die enzymatische Umwandlung von ATP zu cAMP kann konform der Gibbs-Helmholtz-Gleichung (siehe Kapitel 1.2.4) abhängig von der Temperatur sein. An Membranpräparationen der Rattenleber konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivität der AC abhängig von der Inkubationstemperatur ist (Kreiner, Keirns et al. 1973). Sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach Stimulation mit Adrenalin, nimmt bei erhöhter Temperatur die Aktivität der AC zu. Die Autoren konnten zeigen, dass die Stimulation zu einer noch verstärkten Temperaturabhängigkeit der AC-Aktivität ($> 32\text{ }^{\circ}\text{C}$) führte, was sie auf eine Änderung der thermodynamischen Eigenschaften der enzymatischen Reaktion zurückführten. Diese wurde möglicherweise durch temperaturabhängige Konformationsänderungen oder Proteininteraktionen verursacht. Diese Daten wurden

jedoch nicht an ganzen Zellen erhoben, sondern an isolierten Membranen durchgeführt. In einer weiteren Studie wurde die AC-Aktivität in weißem Fettgewebe untersucht (Counis and Jutisz 1977). Während die basale AC-Aktivität dort nur moderat durch Temperaturänderungen beeinflusst wurde, konnte die Gruppe nachweisen, dass es NA-abhängig zu einer verstärkten temperaturabhängigen Aktivierung kam, die knapp unter 40 °C ihr Maximum erreichte. Die Gruppe vermutete die Existenz mehrerer thermodynamischer Zustände des Enzyms, worin sie die Ursache für die Diskrepanz zwischen basaler und Hormon-induzierter Temperaturabhängigkeit sehen. Eine neuere Studie bezeichnete die Guanylatzyklase [engl. *guanylate cyclase* (GC)]-G als Thermosensor, der temperaturabhängig den sekundären Botenstoff cGMP produziert (Chao, Chen et al. 2015, Chao, Fleischer et al. 2018). Die Arbeitsgruppe untersuchte die Auswirkungen von verringerter Temperatur auf die GC-G-abhängige cGMP-Bildung an murinen Grunebergganglien. Es wurde vermutet, dass diese Neuronen an der Wahrnehmung von Kälte beteiligt sind, da der TRPM8-Kanal, der zuvor damit in Verbindung gebracht wurde, nicht exprimiert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass die GC-G-induzierte cGMP-Produktion bei 15, 20 und 30 °C im Vergleich zu 37 °C signifikant erhöht war, was sie mit einer erhöhten Dimerisierungsrate des Enzyms in Verbindung brachten. Dieser beschriebene Mechanismus wäre für die Produktion von cAMP, aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit zwischen GC und AC, auch denkbar (Winger, Derbyshire et al. 2008). Bislang sind keine Studien bekannt, die die AC-Aktivität in Abhängigkeit von geringen Temperaturänderungen, die der physiologischen Körpertemperatur im Tagesverlauf entsprechen, untersuchten.

1.4.2.3 Rezeptordesensibilisierung

Bei dauerhafter Stimulierung von GPCRs kommt es zu einem mehrstufigen Rückkopplungsprozess, der als Liganden-induzierte Rezeptordesensibilisierung bezeichnet wird (Ferguson 2001). Dieser soll gewährleisten, dass überschießende Signale rechtzeitig abgeschaltet werden und eine gleichbleibende Ansprechbarkeit des Rezeptors möglich bleibt. Innerhalb weniger Minuten nach Beginn der Stimulierung des Rezeptors kommt es durch Kinasen wie PKA, PKC und *G protein receptor kinases* (GRKs) zu einer Rezeptorphosphorylierung, was einerseits die Bindung des G-Proteins verhindert und andererseits zur Rekrutierung von β -Arrestinen führt (Ferguson, Downey et al. 1996). β -Arrestine induzieren schließlich die Endozytose des Rezeptors. Es existieren mehrere

Möglichkeiten der Rezeptorendozytose, wobei die Arrestin-abhängige Endozytose durch Ausbildung von mit Clathrin ausgekleideten Stachelsaumgrübchen (engl. *clathrin-coated pits*) die wahrscheinlich bedeutendste darstellt (Goodman, Krupnick et al. 1996, Moo, van Senten et al. 2021). Hierbei kommt es zunächst β -Arrestin-vermittelt durch die strukturelle Verbindung mit Stachelsaumgrübchen zu einer Immobilisierung des Rezeptors in der Zellmembran. Der abzuschnürende Bereich der Membran wird schließlich durch Dynamin in Vesikel abgeteilt (Pierce and Lefkowitz 2001). Das weitere Schicksal des Rezeptors kann in Resensitisierung und Degradation unterteilt werden. Prinzipiell ist hierbei die Kombination aus dem Rezeptor und dem β -Arrestin-Typ entscheidend (Oakley, Laporte et al. 2000). Durch Transport des endozytierten Rezeptors zurück an die Zellmembran, kann der Signalweg wieder aktiviert werden.

Anhaltende Stimulation führt allerdings häufig zum Abbau des Rezeptors im lysosomalen Kompartiment der Zelle (Xiao and Shenoy 2011). Es existieren auch einige Rezeptoren, die kaum oder gar nicht endozytiert werden, wie beispielsweise der β_3 -AR, der κ -Opioidrezeptor oder der Prostaglandin-E2-Rezeptor (Nantel, Bonin et al. 1993, Chu, Murray et al. 1997). Die Stimulierung des β_2 -AR führt zu einem Gleichgewicht aus Rezeptorendozytose und Rezeptorresensitisierung an die Zellmembran (Morrison, Moore et al. 1996): In der Anwesenheit von Isoproterenol kommt es innerhalb von durchschnittlich 3,9 min zur Endozytose und nach 11,2 min zur re-Expression des Rezeptors an der Zellmembran. Dieser dynamische Gleichgewichtszustand ist abhängig von der intrinsischen Aktivität des Agonisten.

In der vorliegenden Arbeit sind die Liganden-vermittelte Rezeptorendozytose und -degradation von Interesse, da sie über die Aktivierbarkeit des Signalwegs entscheiden und damit maßgeblich an der Signaltransduktion beteiligt sind. Eine temperaturabhängige Interaktion zwischen Proteinen, die zu einer Rezeptorendozytose führen, oder eine temperaturabhängige Expression dieser Proteine könnte in einer veränderten Aktivierbarkeit des β_2 -AR induzierten Signalwegs resultieren.

1.4.2.4 Phosphodiesterase-Aktivität

Intrazelluläres cAMP oder cGMP dient als Substrat für Phosphodiesterasen (PDE), die den sekundären Botenstoff in 5'-AMP bzw. 5'-GMP umwandeln und damit die Konzentration der Nukleotide verringern (Beavo and Brunton 2002). Die PDE-Superfamilie besteht aus 11 Familien mit insgesamt 21 codierende PDE-Genen, die in

Summe etwa 100 Isoformen bilden (Bender and Beavo 2006). Von den 11 Familien hydrolysieren PDE4, 7 und 8 spezifisch cAMP, während PDE5, 6 und 9 vorwiegend cGMP abbauen. PDE1-3, 10 und 11 zeigen keine Präferenz und hydrolysieren beide Nukleotide gleichermaßen (Blair and Baillie 2019). Die Isoformen zeigen teils deutliche Unterschiede in Lokalisierung, Regulierung und enzymatischer Aktivität, was zu einem für jede Zelle einzigartigen cAMP-Abbau führt (Conti, Mika et al. 2014).

Wurde lange davon ausgegangen, dass cAMP innerhalb der Zelle frei diffundiert, ist heute bekannt, dass cAMP in Mikro- und Nanodomänen in der Nähe des Syntheseorts verbleibt (Willoughby 2012, Agarwal, Yang et al. 2014, Calebiro and Maiellaro 2014, Bhogal, Hasan et al. 2018, Ghigo and Mika 2019). PDEs unterstützen die Entstehung solcher Kompartimente, indem sie eine Diffusionsbarriere darstellen. Dies führt zu räumlich und zeitlich begrenzten Unterschieden in der cAMP-Konzentration, mit hohen cAMP-Spiegeln am Produktionsort und niedrigen mit zunehmender Entfernung (Oliveira, Terrin et al. 2010, Bhogal, Hasan et al. 2018, Schmidt, Cattani-Cavaliere et al. 2020). Diese Kompartimentalisierung ist mitentscheidend für die physiologische Funktion und ermöglicht eine präzise Steuerung der cAMP-Dynamik mit spezifischer Effektoraktivierung (Baillie 2009). PDEs und cAMP-Effektorproteine bilden durch Wechselwirkungen mit Gerüstproteinen, wie Arrestinen und *a-kinase-anchoring protein* (AKAP) oder membrangebundenen Proteinen, wie beispielsweise ARs oder ACs, Komplexe, sogenannte Signalosome und stellen dadurch eine Signaleinheit dar (Houslay, Baillie et al. 2007, Ahmad, Degerman et al. 2012, Keravis and Lugnier 2012, Havekes, Park et al. 2016, Tulsian, Ghode et al. 2020).

Die Expression einzelner PDE-Subtypen unterscheidet sich je nach Gewebe und Spezies teils sehr deutlich. Im Hypothalamus werden überwiegend PDE3B, 4B und 4D exprimiert (Sahu 2011, Tibbo and Baillie 2020). Die Expressionsstärke allein erlaubt allerdings keine verlässliche Korrelation zur physiologischen Bedeutung, da letztendlich die enzymatische Aktivität ausschlaggebend ist und auch bei niedriger Expression eine hohe cAMP-Umsetzung möglich ist (Neves-Zaph 2017). Die Aktivität der PDE ist auch abhängig von der Substratkonzentration, was zu einer konzentrationsabhängigen Aktivität der Subtypen führt (Song, Massenburg et al. 2013).

Nachdem die intrazellulären cAMP-Spiegel auch durch den PDE-induzierten Abbau reguliert werden, würde eine temperaturabhängige PDE-Aktivität maßgeblich zu einer

veränderten cAMP-Konzentration beitragen. Frühe Studien, die die funktionellen Eigenschaften von PDEs an Präparationen des Gehirns der Ratte untersuchten, konnten belegen, dass die Aktivität temperaturabhängig ist (Cheung 1967). Die Autoren stellten fest, dass die Aktivierungsenergie bei steigender Temperatur reduziert wird, was sie mit einer erhöhten zellulären Aktivität in Verbindung brachten. Sie konnten auch zeigen, dass das Enzym stark von der vorliegenden Mg^{2+} -Konzentration abhängig ist, was eine mögliche Verbindung zu thermosensitiven, Mg^{2+} -leitenden TRP-Kanälen, wie TRPM6 oder 7, darstellen könnte. In einer weiteren Studie konnte ein Zusammenhang zwischen PDE4 und HSP20 hergestellt werden (Sin, Edwards et al. 2011). Es konnte dort gezeigt werden, dass die beiden Proteine bei länger andauernder β -adrenerger Stimulation miteinander in Wechselwirkung treten. Es war bereits bekannt, dass unphosphoryliertes HSP20 kardioprotektiv wirkt, aber der Mechanismus war nicht vollständig verstanden. Die Gruppe konnte nachweisen, dass HSP20 und PDE unter basalen Bedingungen in einem lockeren Komplex vorliegen. Bei Stimulierung kommt es zu einer verstärkten PKA-Aktivierung mit einhergehender Phosphorylierung von HSP20. Dies führt zu einer ausgeprägten Interaktion zwischen PDE4 und HSP20, sowie zu einem erhöhten Abbau von cAMP im Sinne eines Rückkopplungsmechanismus, und begünstigt damit die Dephosphorylierung von HSP20 durch Phosphatasen. Dieser Befund ist insofern interessant, da die Bildung von HSP abhängig von der Temperatur ist (siehe Kapitel 1.2.1). Die von der Gruppe getätigten Beobachtungen könnten somit einen Zusammenhang zwischen PDE-Aktivität und Körpertemperatur darstellen. Eine andere Forschergruppe konnte zeigen, dass basale cAMP-Spiegel in murinen SCN-Präparationen circadian oszillieren, mit erhöhter cAMP-Konzentration am Ende der Ruhephase (bei verringerter Körpertemperatur). Die PDE-Aktivität ist am höchsten in der aktiven Phase (erhöhte Körpertemperatur) und zeigt die niedrigste Aktivität am Ende der Ruhephase (Prosser and Gillette 1991). Außerhalb des SCN konnte die Arbeitsgruppe wegen Sensitivitätsproblemen allerdings keine ähnliche Korrelation nachweisen. Die Interaktion zwischen PDE und seinem Substrat, cAMP, ist thermodynamisch betrachtet abhängig von der Temperatur, bei der die Reaktion stattfindet (siehe Kapitel 1.2.4). Die Wechselwirkungen zwischen den Proteinen nehmen mit steigender Temperatur zu. Auch die Aktivitätsrate des Enzyms steigt mit erhöhter Temperatur. Dies könnte somit zu einem gesteigerten cAMP-Abbau bei einer erhöhten Temperatur führen. Bislang sind allerdings

keine wissenschaftlichen Publikationen verfügbar, die den Einfluss physiologischer Temperaturänderungen auf die PDE-Aktivität untersucht haben.

1.4.2.5 Transport von cAMP in den Extrazellularraum

Neben dem Abbau durch PDEs wird die intrazelluläre cAMP-Konzentration auch durch den Transport in den Extrazellularraum (EZR) mittels eines spezifischen Transportsystems, *multidrug resistance protein* (MRP), reguliert (Cheepala, Hulot et al. 2013). Dieses gehört zu der Unterfamilie C der *ATP-binding-cassette* (ABC)-Transporter. ABCC4, 5 und 8 können cAMP und cGMP unter Energieverbrauch gegen das Konzentrationsgefälle aus der Zelle transportieren (Jedlitschky, Burchell et al. 2000, Chen, Lee et al. 2001, Wielinga, Van Der Heijden et al. 2003, Sassi, Abi-Gerges et al. 2012). Der ABCC-induzierte cAMP-Efflux wurde bereits in Skelettmuskelzellen, Pulmonalarterien, Herzmuskelzellen, Thrombozyten und weiteren Zelltypen nachgewiesen (Sassi, Lipskaia et al. 2008, Hara, Sassi et al. 2011).

Zunächst wurde angenommen, dass ABCCs in Abstimmung mit PDEs lediglich den intrazellulären cAMP-Spiegel modulieren. Es verblieb allerdings die Frage, warum cAMP unter beträchtlichem Energieaufwand aus der Zelle transportiert wird. Schließlich konnte gezeigt werden, dass auch extrazelluläres cAMP eine physiologische Bedeutung erfüllt (Jackson and Raghvendra 2004). Extrazelluläres cAMP wird durch Ekto-PDEs in 5'-AMP und durch membranständige Ekto-5'-Nukleotidasen weiter in Adenosin abgebaut (Woo and Manery 1973). Extrazelluläres Adenosin kann nun an Adenosinrezeptoren (AdR) binden und diese aktivieren. AdR werden in verschiedensten Geweben exprimiert, so auch im PVN des Hypothalamus (Li, Chen et al. 2010). Abhängig von dem AdR-Subtyp kommt es Adenosin-vermittelt über G_s-gekoppelte Rezeptoren zu einer erhöhten, bzw. über G_i-gekoppelte Rezeptoren zu einer verminderten cAMP-Produktion. Darüber hinaus können auch noch weitere Signalwege durch AdR initiiert werden (Schulte and Fredholm 2003).

Auch nach Aktivierung des β_2 -AR ist ein cAMP-Efflux *in vitro* bereits beschrieben worden. Es konnte in kultivierten Gliomzellen der Ratte gezeigt werden, dass die Stimulierung mit Isoproterenol zu einem schnellen Anstieg von extrazellulärem cAMP führt (Doore, Bashor et al. 1975). Dies konnte ebenso an Truthahn-Erythrozyten nachgewiesen werden (Rindler, Bashor et al. 1978). In einer Mauszelllinie konnte durch die Stimulierung mit *adrenal corticotropin releasing hormone* (ACTH) cAMP innerhalb

von Minuten im EZR gefunden werden (Schimmer and Zimmerman 1976). Auch viele weitere Agonisten von G_s -gekoppelten Rezeptoren führen zu einer Erhöhung des extrazellulären cAMPs (de Koning, Jenks et al. 1992, Tyagi, Handa et al. 1998, Cui, Lee et al. 2000). Im Gegensatz dazu konnte durch die Aktivierung von G_i -gekoppelten Rezeptoren eine Verringerung des cAMP-Effluxes beobachtet werden: D2-Rezeptoragonisten verringern den D1-Dopaminrezeptor-induzierten cAMP-Efflux (Stoof and Keibian 1981). Eine physiologische Beteiligung des cAMP-Efflux konnte *in vivo* nach Stimulierung des β_2 -AR demonstriert werden. Bei länger andauernder Stimulierung mit Fenoterol kommt es zu einer Aktivierung des extrazellulären cAMP-Adenosin-Signalwegs (Duarte, Menezes-Rodrigues et al. 2012). Hier konnte das Zusammenspiel aus Fenoterol-aktivierten G_s -gekoppelten (β_2 -AR) und Adenosin-aktivierten G_i -gekoppelten (AdR 1) Rezeptor gezeigt werden, wobei diese zusammen den intrazellulären cAMP-Spiegel regulieren.

Eine direkte thermodynamische Aktivierung der Transporter würde zu einem gesteigerten Efflux bei erhöhten Temperaturen führen und durch eine Verringerung des intrazellulären cAMP-Spiegels somit letztlich zu einer reduzierten CREB-abhängigen Genexpression führen. Bislang konnte allerdings keine temperaturabhängige Aktivierung von ABCC-Transportern gezeigt werden. Lediglich eine Arbeitsgruppe stellte fest, dass die Aktivität von ABCC bei 4 °C signifikant verringert gegenüber der bei 37 °C war (Porro, Haber et al. 2010).

1.5 Zielsetzung

Die Körpertemperatur ist eine wichtige physiologische Größe und entscheidet über das Wohlergehen eines Individuums (Gomez 2014). Unter physiologischen Bedingungen kommt es zu einer Veränderung der Körpertemperatur in einem 24-h-Rhythmus. Der SCN im ventralen Hypothalamus wurde als verantwortliche Struktur für diese Oszillation im Tagesverlauf, bei Mäusen zwischen 35,5 und 38,5 °C, identifiziert. Diese Temperaturänderungen haben sich im Laufe der Evolution entwickelt und stellen eine Anpassung des Organismus auf periodisch wiederkehrende Ereignisse dar.

Bislang ist weitestgehend unbekannt, ob und wie diese physiologischen Temperaturänderungen von Körperzellen wahrgenommen und in zelluläre Prozesse

übersetzt werden. In der vorliegenden Arbeit standen daher folgende Zielsetzungen im Vordergrund:

1. Initial sollte die angefertigte Arbeit die Methoden etablieren, um den Einfluss von physiologisch relevanten Temperaturänderungen auf die Aktivierung zellulärer Signalwege mit einer hohen Genauigkeit messen zu können. Hierfür wurden zwei Präzisions-Temperaturinkubatoren und die murine hypothalamische Zelllinie mHypoA-2/10 verwendet.
2. Nach erfolgreicher Etablierung sollte anschließend der Einfluss von simulierten physiologischen Körpertemperaturänderungen auf die Aktivität von wichtigen Transkriptionsfaktoren im Hypothalamus untersucht werden. Hierfür wurde in mHypoA-2/10-Zellen die Aktivität des CREB-, STAT- und FOXO-abhängigen Promotors in Abhängigkeit von Temperaturänderungen untersucht. Als Positivkontrolle diente der BMAL1-Promotor, dessen temperaturabhängige Aktivierung in der verwendeten hypothalamischen Zelllinie bereits publiziert wurde (Breit, Miek et al. 2018). Für diese Arbeit sollte auch eine stabile Zelllinie etabliert werden, die eine Messung der prepro-TRH-Aktivität in Abhängigkeit von Temperaturänderungen erlaubt (mHypoA-2/10-TRH).
3. Die Wahrnehmung von Temperaturänderungen kann über eine Vielzahl zellulärer Komponenten erfolgen. So können wärmesensitive Proteine, wie HSPs, oder kältesensitive Proteine, wie CIRP, induziert werden; alternativ können auch Transmembranproteine, wie TRP-Kanäle, durch Temperaturänderungen aktiviert werden. Durch deren intrazelluläre Signalwirkung können die Temperaturänderungen dann in zelluläre Prozesse übersetzt werden. Daher sollte weiter untersucht werden, ob die oben genannten thermosensitiven Proteine in mHypoA-2/10 Zellen bereits durch leichte Temperaturänderungen in ihrer Aktivität moduliert werden.
4. Des Weiteren sollte der Einfluss von Temperaturänderungen auf die Rezeptor-vermittelte Aktivierung intrazellulärer Signalwege untersucht werden. cAMP ist ein prototypischer sekundärer Botenstoff, der in einer Vielzahl physiologischer und pathologischer Prozesse involviert ist. Die Aktivierung adrenerger Rezeptoren stellt einen starken Stimulus zur cAMP-Synthese und CREB-Aktivierung im Hypothalamus dar. Daher stellte sich die Frage, ob die Temperaturänderungen eine Modulation der Rezeptoraktivität bewirken. Um dies zu beantworten, wurden die Prozesse, die zu einer

AR-vermittelten cAMP-Produktion führen, eingehend in Abhängigkeit von simulierten Körpertemperaturänderungen untersucht. Hier sollte die klassische Rezeptorpharmakologie um den Aspekt der physiologischen Körpertemperatur erweitert werden.

5. Parallel sollte geklärt werden, ob die Simulation circadianer Temperaturänderungen, also die Imitation des Temperaturverlaufs in einem 24-h-Rhythmus, notwendig ist, um entsprechende Zellaktivitätsänderungen nachweisen zu können, oder ob hierfür einmalige Temperaturänderungen bereits ausreichend sind. Daher wurden zwei Temperaturprogramme etabliert, die in der vorliegenden Arbeit miteinander verglichen werden sollten.

2. Material

2.1 Geräte

| Gerät | Hersteller |
|---|-------------------------------|
| Blot-Apparatur Trans-Blot SD | BioRad, Hercules |
| Blot-Entwickler ChemiSmart 5000 | Peqlab, Erlangen |
| Chronometer | Junghans, Schramberg |
| Feinwaage HR-202 | Bachofer, Reutlingen |
| Gelelektrophorese Mini Trans-Blot® Cell | BioRad, Hercules |
| Inkubationsschüttler MaxQ 6000 | ThermoFisher, Dreieich |
| Lichtmikroskop CKX31 | Olympus, Hamburg |
| Magnetrührer MR 3000 | Heidolph, Schwabach |
| Neon®-Elektroporationssystem | Invitrogen, Darmstadt |
| Neubauer-Zählkammer | Brand, Wertheim |
| pH-Meter FiveEasy | Mettler Toledo, Columbus |
| Photometer BioPhotometer Plus | Eppendorf, Hamburg |
| Plate Reader FluoStar Omega | BMG Labtech, Offenburg |
| Sterilbank HERAsafe KS18 | ThermoFisher, Dreieich |
| Szintillationszähler WinSpectral 1414 | PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim |
| Taumelschüttler Polymax 1040 | Heidolph, Schwabach |
| Temperaturinkubatoren FrioCell FC22 | MMM Group, Planegg |
| Thermoschüttler TS-100 | Peqlab, Erlangen |
| Ultra Turrax T18 basic | Ika, Staufen |
| Ultraschallgerät Sonoplus mini20 | Bandelin, Berlin |
| Ultrazentrifuge Sorvall | ThermoFisher, Dreieich |
| Vortexer REAX1DR | Heidolph, Schwabach |
| Wasserbad HI 1210 | Memmert, Schwabach |
| Zellkulturinkubator HeraCell 240 | ThermoFisher, Dreieich |
| Zentrifuge Heraeus Biofuge Stratos | ThermoFisher, Dreieich |
| Zentrifuge Labofuge 400 | ThermoFisher, Dreieich |
| Zentrifuge Pico 17 | ThermoFisher, Dreieich |

2.2 Verbrauchsmaterialien

2.2.1 Zellkultur

| Material | Hersteller |
|---|-----------------------|
| Filtermatten Whatman GF/B fired | Brandel, Gaithersburg |
| Neon™ Transfection System 100 µL Kit | ThermoFisher, Waltham |
| Pasteurpipetten | VWR, Darmstadt |
| Petrischalen, 100 mm | Sarstedt, Nürnberg |
| Pipettenspitzen | Sarstedt, Nürnberg |
| Serologische Pipetten | Sarstedt, Nürnberg |
| Sterilfilter Filtropur BT50 0.2 | Sarstedt, Nürnberg |
| Szintillationsfläschchen, 20 ml | Roth, Karlsruhe |
| Zellkultur 12-well Mikrotiterplatten | Sarstedt, Nürnberg |
| Zellkultur 24-well Mikrotiterplatten | Sarstedt, Nürnberg |
| Zellkultur 6-well Mikrotiterplatten | Sarstedt, Nürnberg |
| Zellkultur 96-well Mikrotiterplatten | Sarstedt, Nürnberg |
| Zellkulturflaschen, 175 cm ² | Sarstedt, Nürnberg |

2.2.2 Nährmedien

| Medium | Hersteller |
|---------------------------------------|----------------------------|
| HBSMC-Medium | Promega, Fitchburg |
| RPMI 1640 | Gibco, Waltham |
| Serumfreies Medium DMEM (P04-03596) | PAN-Biotech, Aidenbach |
| Spezialmedium (SM) DMEM D5030 mod. | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Wachstumsmedium DMEM (P04-03596) mod. | PAN-Biotech, Aidenbach |

Das Wachstumsmedium wurde mit 1 % Penicillin/Streptomycin und 10 % *fetal bovine serum* (FBS) ergänzt. Für das SM wurde das DMEM D5030 Medium mit 25 mM HEPES, 25 mM Glukose, 4 mM Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin, 15 mg/l Phenolrot und 1 mM Natriumpyruvat unter aseptischen Bedingungen ergänzt.

2.2.3 Reagenzien

| Substanz | Hersteller |
|---|----------------------|
| [¹²⁵ I]-CYP (spezifische Aktivität: 2175 Ci/mmol) | PerkinElmer, Waltham |
| [³⁵ S]-GTPγ (spezifische Aktivität: 1250 Ci/mmol) | PerkinElmer, Waltham |

| | |
|--|---|
| [³ H]-Adenin (spezifische Aktivität: 42 Ci/mmol) | PerkinElmer, Waltham |
| [³ H]-cAMP (spezifische Aktivität: 4,1 Ci/mmol) | Hartmann Analytic, Braunschweig |
| Coelenterazin | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Dithiothreitol | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| FBS, <i>fetal bovine serum</i> (P30-1302) | PAN-Biotech, Aidenbach |
| Glukose-Lösung 45 % | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Glutamin 200 mM | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Gpp(NH)p | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| HEPES 1 M | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Imidazol p.a. | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Luciferasesubstrat (E4550) | Promega, Fitchburg |
| Natriumpyruvat 1 M | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Penicillin Streptomycin (15070-063) | Gibco, Waltham |
| Proteaseinhibitoren cOmplete mini EDTA-free | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Proteinleiter BLUEplus prestained (10-180 kDa) | Biomol, Hamburg |
| RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis | ThermoFisher, Waltham |
| RNA-later™-Stabilisationslösung | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| SYBR™ green Kappa Fast start qPCR Mastermix | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Szintillatorcocktail Rotiszint®eco plus | Roth, Karlsruhe |
| TE-Puffer IDTE | Integrated DNA Technologies, Coralville |
| Trizol-Reagenz | ThermoFisher, Waltham |
| Trypsin EDTA | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Ultrapure H ₂ O | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Zeozin | ThermoFisher, Waltham |

2.2.4 Agonisten und Antagonisten

| Agonist | Zielstruktur | Konzentration | Hersteller |
|------------|--------------|---------------|----------------------------|
| BK | B2R | 1 µM | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| FSK | AC | 10 µM | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| NA | AR | 10 µM | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Sal | AR | 100 nM | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Antagonist | Zielstruktur | Konzentration | Hersteller |
| 2-APB | TRP-Kanäle | 100 µM | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |

| | | | |
|--------------|-------------|------------------|----------------------------|
| BAPTA-AM | Chelator | 10 μ M | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| BCTC | TRPM8 | 5 μ M | Tocris Bioscience, Bristol |
| CGP-12177 | β -AR | 100 nM | Tocris, Bristol |
| FluAc | TRPM-Kanäle | 100 μ M | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| IBMX | PDE | 1 mM | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Indomethacin | ABCC | 100 μ M | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| KNK437 | hsf1 | 100 μ M | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| MefAc | TRPM-Kanäle | 25 – 100 μ M | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Propranolol | AR | 100 μ M | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| RuR | TRP-Kanäle | 10 μ M | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| SKF96365 | STIM | 10 μ M | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |

2.2.5 Antikörper

| Primärantikörper | Donorspezies | Hersteller | Verdünnung |
|-------------------------|--------------|------------------------|------------|
| CIRP (10209-2-AP) | Kaninchen | Proteintech, Stuttgart | 1:1000 |
| ERK-1 (sc-154) | Kaninchen | Santa Cruz, Dallas | 1:1000 |
| HA-Antikörper (sc-7392) | Maus | Santa Cruz, Dallas | 1:1000 |

| Sekundärantikörper (HRP) | Hersteller | Verdünnung |
|-------------------------------|-----------------|------------|
| Anti-Kaninchen-IgG (#1706515) | BioRad, München | 1:5000 |
| Anti-Maus-IgG (#1706516) | BioRad, München | 1:10000 |

2.2.6 siRNA

| siRNA | Hersteller | Katalognummer |
|---------------|--------------------|---------------|
| CIRP | Santa Cruz, Dallas | sc-142348 |
| control-siRNA | Santa Cruz, Dallas | sc-37007 |

2.3 Molekularbiologie

2.3.1 Bakterien

In dieser Arbeit wurde der, in der Molekularbiologie etablierte, E. coli-Bakterienstamm DH5 α verwendet.

2.3.2 Plasmide

| Plasmid | Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von | Originalpublikation |
|---------------|--|-----------------------------------|
| β_2 -AR | PD Dr. Ursula Storch, LMU | Nicht publiziert |
| Aequorin | Dr. Andreas Breit, LMU | (Baubet, Le Mouellic et al. 2000) |
| BMAL1 | Addgene Plasmid #46824 | (Brown, Fleury-Olela et al. 2005) |
| CIRP | Addgene Plasmid #11607 | Nicht publiziert |
| CRE | Dr. Andreas Breit, LMU | (Himmler, Stratowa et al. 1993) |
| FOXO | Dr. Andreas Breit, LMU | Nicht publiziert |
| STAT | Dr. Andreas Breit, LMU | Nicht publiziert |
| TRH | Prof. Clerget-Froidevaux, Paris | (Balkan, Tavianini et al. 1998) |

2.3.3 Reportergenkonstrukte

| Reporterzelllinie | Originalpublikation |
|-------------------|------------------------------|
| HEK-293-CREB | Nicht publiziert |
| mHypoA-2/10-BMAL1 | (Breit, Miek et al. 2018) |
| mHypoA-2/10-CREB | (Lauffer, Glas et al. 2016) |
| mHypoA-2/10-FOXO | Nicht publiziert |
| mHypoA-2/10-STAT | Nicht publiziert |
| mHypoA-2/10-TRH | (Faro, Boekhoff et al. 2021) |

Die Reporterzelllinien mHypoA-2/10-TRH und HEK-293-CREB wurden im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Alle weiteren genannten wurden freundlicherweise von Dr. Andreas Breit (LMU) zur Verfügung gestellt.

2.4 Verwendete Zelllinien

| Zelllinie | Bezug |
|-------------|---|
| H1299 | Comprehensive Pneumology Center (CPC) des Helmholtz Zentrums, München |
| HaCaT | Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr, München |
| HBSMC | Promega, Fitchburg |
| HEK-293 | American Type Culture Collection |
| mHypoA-2/10 | Cederlane, Burlington |
| mHypoA-2/12 | Cederlane, Burlington |

3. Methoden

3.1 Methoden der Zellkultur

3.1.1 Kultivierung von Zellen

mHypoA-2/10-Zellen wurden auf T175 Flaschen (Fläche 175 cm²) in feuchter CO₂-Atmosphäre (5 %) bei 37 °C kultiviert. Sie wuchsen adhärent, bis sie zu 80 bis 90 % konfluent waren. Anschließend wurden die Zellen vereinzelt, um ein Überwachsen zu verhindern. Hierfür wurde in keimfreier Umgebung das Zellmedium abgesaugt und die adhärenen Zellen mit 5 ml Ca²⁺- und Mg²⁺-freier phosphatgepufferter Salzlösung (*phospho-buffered saline*, PBS) gewaschen. Nach dem erneuten Absaugen wurde die Flasche unter Zugabe von 4 ml 0,05 % einer EDTA-haltigen Trypsin-Lösung für 5 min bei 37 °C inkubiert, um die Zellverbindungen zur Plastikoberfläche zu lösen. Nach optischer Kontrolle der vollständigen Aufhebung der Adhärenz wurden 6 ml des mit *fetal bovine serum* (FBS) ergänzten *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) zu der Zellsuspension gegeben, um die Proteolysereaktion zu stoppen. Durch Auf- und Abpipettieren wurde eine Vereinzelung der Zellen erreicht und die gesamte Suspension (10 ml) in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Ein geeigneter Teil der Suspension wurde in eine neue, mit 25 ml Kulturmedium vorgefüllten T175 Flasche, überführt. Bei einer ursprünglichen Konfluenz von etwa 90 % wurden üblicherweise 1 bis 1,5 ml überführt, um nach einer Wachstumsphase von 2 Tagen erneut eine Konfluenz von 80 bis 90 % zu erreichen. Die restlichen Zellen konnten für Experimente verwendet werden. Die primären, humanen Zellen der glatten Bronchialmuskulatur [engl. *human bronchial smooth muscle cells* (HBSMC)] wurden in dem vom Hersteller empfohlenen Medium (HBSMC Wachstumsmedium) kultiviert. Die Zellen wurden bei 80 bis 90-prozentiger Konfluenz mit 5 ml der vom Hersteller empfohlenen *HEPES-buffered balanced salt solution* gewaschen (HEPES BSS). Anschließend wurden 5 ml einer Lösung aus 0,04 % Trypsin und 0,03 % EDTA in HEPES BSS hinzugefügt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem unter dem Lichtmikroskop die vollständige Ablösung der Zellen kontrolliert worden ist, wurde die Proteolysereaktion mit gleichem Volumen HBSMC Wachstumsmedium gestoppt und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. 10 % der erhaltenen Zellsuspension wurden in eine mit

Wachstumsmedium vorgefüllte T175-Zellkulturflasche überführt und bei 37 °C inkubiert. Nach etwa 3 bis 4 Tagen erreichten diese Zellen erneut Konfluenz. Die restlichen Zellen konnten für Experimente auf geeigneten Well-Mikrotiterplatten ausgesät werden und standen 16 – 24 h nach dem Aussäen zur Verfügung. Alle sonstigen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden entsprechend der mHypoA-2/10-Zellen behandelt, mit der Ausnahme, dass H1299, Huh-7 und HepG2-Zellen zunächst in serumhaltigen RPMI kultiviert und erst 16 – 24 h vor den Experimenten ein Mediumwechsel auf DMEM durchgeführt wurde.

3.1.2 Kryokonservierung

Um Zellen dauerhaft konservieren zu können, ist eine Lagerung in flüssigem Stickstoff notwendig. Hierfür wurden adhärente Zellen abgelöst (siehe Kapitel 3.1.1) und bei 500 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig unter der Sterilbank abgesaugt und das Pellet mit 10 ml einer eiskalten Lösung aus DMSO in Serum (10 % v/v) resuspendiert. Je 1 ml der Zellsuspension wurde anschließend in Kryoröhrchen gegeben, welche steril verschlossen und in einer Styroporbox bei - 80 °C für 24 h eingefroren wurden. Nach 24 h wurden sie in die flüssige Phase des Stickstofftanks zur dauerhaften Aufbewahrung gebracht. Durch die Verwendung der Styroporbox ließ sich die ideale Einfrierrate von etwa - 1 K pro Minute erreichen. Alle oben genannten Schritte wurden, wenn möglich, auf Eis durchgeführt.

3.1.3 Auftauen kryokonservierter Zellen

Im Gegensatz zu der Kryokonservierung sollte das Auftauen konservierter Zellen möglichst rasch erfolgen (Yokoyama, Thompson et al. 2012). Daher wurden die Kryoröhrchen sofort nach der Entnahme aus dem Stickstofftank im Wasserbad bei 37 °C erwärmt und in eine mit Kulturmedium vorbereitete T175 Flasche überführt. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel mit frischem Kulturmedium, um das Frostschutzmittel zu verdünnen. Frisch aufgetaute Zellen wurden mindestens zweimal passagiert, bevor sie für Experimente ausgesät wurden, um eine ausreichend lange Äquilibration sicherzustellen.

3.1.4 Beschichtung von Mikrotiterplatten zur Förderung der Adhärenz

Die Anheftung der HEK-293-Zellen an die Plastikoberfläche war nicht ausgeprägt genug, weshalb die negativ geladene Oberfläche mit 0,1-prozentiger Poly-L-Lysinlösung ($1,5 \times 10^5 - 3 \times 10^5$ Da) vorbehandelt wurde. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Überstand abgenommen und die Lösung bei 37 °C getrocknet. Hierbei bildete sich ein positiv geladener Polymerfilm aus, der das Anheften von HEK-293-Zellen deutlich verbesserte.

3.1.5 Präparation von Zellmembranen

Für einige Experimente war es erforderlich, Membranen zu präparieren. Hierfür wurden Zellen auf 150 cm²-Zellkulturschalen ausgesät. Nach 16 – 24 h wurde ein Mediumwechsel auf serumfreies Medium durchgeführt. Am nächsten Tag wurde bei etwa 80 bis 90-prozentiger Konfluenz der Überstand abgesaugt und die Zellen auf Eis, mit 5 ml PBS, gewaschen. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen von der Oberfläche der Zellkulturschale gelöst und in 2 ml eiskalten Membranpuffer resuspendiert. Mittels eines Dispergiergeräts (Stufe 4, 3×10 s) wurde durch Schlag und Prall die Zelle aufgeschlossen und die Zellkerne freigesetzt. Durch mäßige Zentrifugation mit 500 x g für 5 min bei 4 °C wurden diese im Anschluss abzentrifugiert und verworfen. Der Überstand wurde bei 40000 x g für 20 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der resultierende Niederschlag wurde in Membranpuffer resuspendiert und die Proteinkonzentration mittels der Methode nach Bradford bestimmt. Diese beruht darauf, dass sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs Coomassie Brilliantblau in saurer Lösung nach Bindung von Proteinen verschiebt. Hierfür wurden in einer 2 ml Küvette 1,5 ml Bradford-Reagenz und 10 µl der zu untersuchenden Proteinlösung vermischt. Nach 10 min wurde die optische Dichte (OD) bei 595 nm gemessen. Mit Hilfe einer zuvor erstellten Eichgerade konnte hiermit die Proteinkonzentration der Probe bestimmt werden. Die Suspension wurde mit Membranpuffer auf die Konzentration 1 mg/ml eingestellt. Die so erhaltenen Membranen enthielten sämtliche Membranfraktionen der Zelle und wurden bis zur weiteren Verwendung bei - 80 °C eingefroren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch totale Membranfraktionen von mHypoA-2/10-Zellen präpariert, die zuvor im circadianen Programm (CP) (siehe Kapitel 4.1.2) inkubiert worden waren. In diesem Fall wurden die Zellen, wie in Abb. 3 dargestellt, in den

Temperaturschränken inkubiert und 8 h nach dem zweiten Temperaturwechsel entnommen. Die Zellen wurden zügig auf Eis gebracht und dann, wie oben beschrieben, die totale Membranfraktionen präpariert.

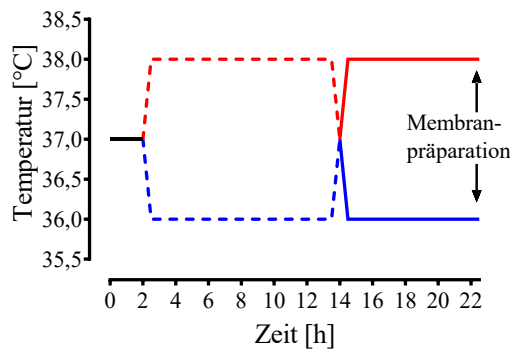


Abb. 3: Schematische Darstellung des CPs mit dem Zeitpunkt der Membranpräparation

mHypoA-2/10-Zellen wurden ausgesät und 16 – 24 h später ein Mediumwechsel auf SM durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C in den Temperaturschränken inkubiert (schwarze Linie). Nach 2 h wurde die Temperatur auf 36 oder 38 °C geändert (blaue, bzw. rote gestrichelte Linie). Nach 11 h wurde ein erneuter Temperaturwechsel durchgeführt: Innerhalb einer Stunde wechselte der Inkubator von 36 auf 38 °C (rote durchgezogene Linie) oder von 38 °C auf 36 °C (blaue durchgezogene Linie). 8 h nach dem zweiten Temperaturwechsel wurden die Zellen aus dem Inkubator entnommen und nach oben beschriebener Methode die totale Membranfraktion isoliert.

| <u>Membranpuffer</u> | <u>Bradford-Reagenz</u> | <u>Bradford-Stammlösung</u> |
|----------------------|---------------------------|-----------------------------|
| 5 mM Tris | 5 % Bradford Stammlösung | 0,1 % Coomassie- |
| 2 mM EDTA | 8,5 % Phosphorsäure (v/v) | Brillant Blau G250 (w/v) |
| HCl q. s. pH 7,2 | | in Ethanol |

3.2 Funktionelle Analysen

3.2.1 Bestimmung der Luciferaseaktivität

Mit Hilfe von Reportergenkonstrukten kann die Aktivität von Signalwegen gemessen werden. Hierfür wurde das Luciferasegen in DNA-Abschnitte eingeführt, welche bei Aktivierung des jeweiligen Signalwegs vermehrt transkribiert werden. Durch Bindung von Transkriptionsfaktoren und Cofaktoren an dieses Element wird folglich Luciferase

gebildet, welche anschließend das angebotene Substrat Luciferin umsetzen kann. Das ursprünglich aus *Photynus pyralis* (Leuchtkäfer) stammende Enzym ist durch seine katalytische Aktivität in der Lage, Luciferin sauerstoff- und ATP-abhängig zu angeregtem Oxyluciferin zu decarboxylieren, welches unter Abgabe von Lichtquanten in seine Grundform zurückkehrt. Das emittierte Licht wird von einem Luminometer (FluoStar Omega) gemessen und die Intensität in Form von willkürlichen Lichteinheiten (w. E.) ausgegeben. Diese Lichtintensität korreliert mit der Promotoraktivität und gibt daher Aufschluss über das Ausmaß der Aktivierung. Sämtliche Messungen wurden nach oben beschriebener Methode in Form von Triplikaten oder Quadruplikaten durchgeführt. Je nach experimentellem Aufbau, wurde mit den Zellen unterschiedlich verfahren.

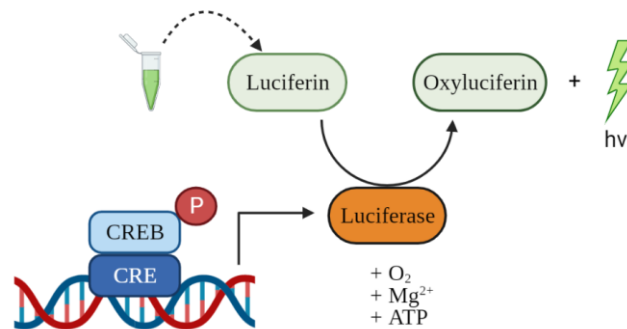


Abb. 4: Schematische Darstellung der enzymatischen Luciferinumsetzung

Bei Aktivierung des Promotors, unter dessen Kontrolle das Luciferasegen steht (hier CREB-abhängiger Promotor), kommt es zu einer vermehrten Expression von Luciferase. Nach Freisetzung der akkumulierten Luciferase durch Zellaufschluss (Lysispuffer), wird durch automatische Injektion des Substrats (enthält u. a. Luciferin, Mg²⁺ und ATP) die enzymatische Reaktion gestartet und es kommt zur Freisetzung von Lichtquanten (hv), welche mit Hilfe des Plattenlesegeräts bestimmt werden konnten.

3.2.1.1 Messung der Luciferaseaktivität bei 37 °C

Zwei Tage vor dem Experiment wurden 1×10^5 Zellen je Well einer 12-Well Mikrotiterplatte ausgesät und 12 – 16 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde ein Mediumwechsel auf serumfreies DMEM durchgeführt und die Zellen weitere 12 – 16 h in der CO₂-Atmosphäre inkubiert. Wurde ein Inhibitor verwendet, so wurde 30 min vor der Stimulation ein Mediumwechsel auf den in serumfreien DMEM gelösten Inhibitor (900 µl) in der Zielkonzentration durchgeführt. Danach wurde mit einer 10-fach konzentrierten Lösung der Liganden (100 µl) für die gewünschte Zeit stimuliert.

3.2.1.2 Messung der Luciferaseaktivität in Abhängigkeit von der Temperatur

Für Experimente, die bei anderen Temperaturen als 37 °C durchgeführt wurden und deshalb nicht in einem üblichen Zellkulturinkubator gemacht werden konnten, wurden die Zellen zunächst auch auf 12-Well Mikrotiterplatten ausgesät (1×10^5 Zellen). Danach wurden die Zellen für 16 – 24 h wieder in den CO₂-Inkubator gegeben. Im Anschluss wurde ein Mediumwechsel auf SM durchgeführt und die Zellen in den Temperaturschränken inkubiert.

Während des akuten Programms (AP) verblieben die Zellen für 14 h bei 37 °C. Wurde ein Inhibitor verwendet, wurde 30 min vor dem Temperaturwechsel ein erneuter Mediumwechsel auf SM mit dem in der Zielkonzentration gelösten Inhibitor durchgeführt. Danach wurde die Temperatur auf 35,5 oder 38,5 °C bzw. 36 oder 38 °C angepasst. Bei dieser Temperatur verblieben die Zellen nun für bis zu 12 h. Fand eine Stimulation der Zellen statt, wurden sie nach 4 – 7 h bei der jeweiligen Temperatur mit einer 10-fach konzentrierten Lösung der Liganden 1 – 4 h inkubiert.

Im Falle des circadianen Programms (CP) wurden die Zellen nur 2 h bei 37 °C inkubiert, bevor die Temperatur innerhalb einer halben Stunde auf 36 °C reduziert, bzw. auf 38 °C erhöht wurde. Diese Temperatur wurde 11 h beibehalten, bevor die Inkubatoren auf die jeweils andere Temperatur innerhalb einer Stunde wechselten. War die Endtemperatur von 38 bzw. 36 °C erreicht, verblieben die Zellen dort für bis zu 12 h. Wurden die Zellen stimuliert, wurden sie 4 - 7 h nach dem zweiten Temperaturwechsel mit einer 10-fach konzentrierten Lösung der Liganden 1 – 4 h inkubiert (schematische Darstellung siehe Abb. 31A).

Für die Temperatur-Wirkungs-Kurve wurden Zellen wie oben beschrieben ausgesät. Anschließend wurden sie nach dem Mediumwechsel auf SM 18 h bei 37 °C in den Temperaturschränken inkubiert. Ein erneuter Mediumwechsel auf SM mit und ohne Inhibitor (2-APB) in der Zielkonzentration wurde durchgeführt. Nach 30 min wurde die Temperatur innerhalb einer halben Stunde auf 36 °C reduziert, bzw. auf 38 °C erhöht. Die Zellen verblieben 4 h bei dieser Temperatur (schematische Darstellung siehe Abb. 19A).

Nach der Inkubation wurde mit den Zellen wieder gleich verfahren. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen mit 150 µl Lysispuffer etwa 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden hiervon 135 µl auf eine 96-well Mikrotiterplatte

überführt, da die Messung im FluoStar auf solch einer Platte erfolgen musste. In Abb. 5 ist die Luciferasemessung im FluoStar schematisch dargestellt. Nach Injektion von 20 – 50 µl Substratlösung zum Zeitpunkt $t = 1$ s startete die enzymatische Umwandlung des Substrats und die resultierende Lichtemission wurde sekundlich gemessen. Die Lichtintensität wurde in willkürlichen Lichteinheiten (w. E.) gemessen. Nach 2 s war die maximale Lichtintensität erreicht, die durch Zugabe von 20 µl einer 1 M HCl-Lösung aus der zweiten Pumpe nach 10 s gelöscht wurde, um eine Abstrahlung des Signals in das benachbarte Well zu verhindern. Danach erfolgte die Substratinjektion in das nächste Well der Mikrotiterplatte. Die Ausgabe der Messwerte erfolgte in einer Microsoft Excel® Tabelle. Zur Berechnung des Signals wurde der Durchschnitt der Lichtintensitäten zwischen 2 s und 9 s berechnet, von welchem die gemessene Lichtintensität des Hintergrunds (Zeitpunkt vor der Injektion, $t = 0$ s) abgezogen wurde. Die somit erhaltenen Werte stellen die Rohwerte der Messung dar. Jede Messung erfolgte stets mindestens als Triplikat, meist jedoch als Quadruplikat. Außerdem wurde jedes Experiment mindestens dreimal wiederholt.

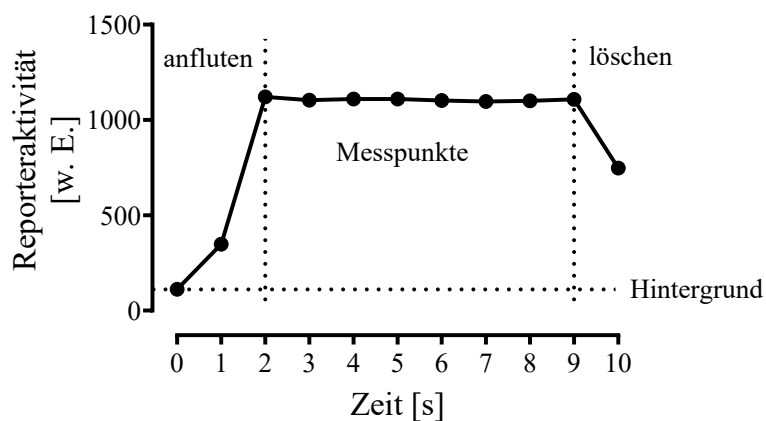


Abb. 5: Schematische Darstellung der Luciferasemessung im FluoStar

Die gemessene Lichtintensität ist in Abhängigkeit von der Messdauer dargestellt. Die Lichtintensität wurde in willkürlicher Einheit angegeben (w. E.). Nach Injektion des Substrats kam es zu einer maximalen Lichtintensität nach 2 s, welche bis zur Injektion von 0,1 M HCl (Zielkonzentration) konstant blieb. Es wurde der Durchschnitt der Messpunkte zwischen 2 und 9 s gebildet. Nach Abzug der Hintergrundstrahlung erhielt man somit die korrigierten Messwerte.

Die Normierung der Messwerte war ein hilfreiches Mittel, um experimentell bedingte und nicht vermeidbare Unterschiede in den einzelnen Versuchsansätzen miteinander

vergleichbar zu machen. So wurde bei Stimulierung zunächst das x-fache des Basalwertes gebildet, um die Liganden-induzierte Antwort auszudrücken. Sollte der Liganden-induzierte Temperatureffekt dargestellt werden, wurde das x-fache des Basalwertes bei 36 °C in das Verhältnis zu dem bei 38 °C gesetzt und in Prozent ausgedrückt (siehe Kapitel 3.6).

Lysispuffer:

25 mM Tris

2 mM 1,2-diaminocyclohexan-N,N,N,N-tetraessigsäuremonohydrat

10 % Glycerin

1 % Triton X

H₃PO₄ q. s. pH 7,8

Zu dieser Lösung wurde direkt vor Gebrauch noch Dithiothreitol für eine finale Konzentration von 2 mM hinzugegeben.

3.2.2 Quantitative Echtzeit reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Echtzeit reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) ist eine häufig angewandte Methode der Genexpressionsanalyse, welche eine Abwandlung der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion [engl. *polymerase chain reaction* (PCR)] ist. Neben der Vervielfältigung von DNA-Abschnitten ist es hier zusätzlich möglich, diese zu quantifizieren und somit Rückschlüsse auf die Expressionsrate der zu Grunde liegenden RNA zu ziehen. Die Quantifizierung erfolgt durch Messung der Fluoreszenz, die in Echtzeit erfasst wird und direkt proportional zur vorliegenden Menge der PCR-Produkte ist. Um das Expressionsmuster der Zelllinie zu identifizieren, muss zunächst die RNA aus den Zellen extrahiert und aufgereinigt werden. Im Anschluss wird diese mittels reverser Transkription in komplementäre DNA [engl. *complementary DNA* (cDNA)] umgeschrieben, bevor im letzten Schritt bestimmte DNA-Abschnitte gezielt durch geeignete Primer vervielfältigt und quantifiziert werden können.

3.2.2.1 RNA-Isolierung

Zur RNA Extraktion wurde eine modifizierte Methode nach Chomczynski und Sacchi verwendet (Chomczynski and Sacchi 1987). Hierfür wurden die Zellen direkt auf der 6-

Well Mikrotiterplatte mit 1 ml einer Mischung aus Phenol und Guanidinthiocyanat (Trizol® Reagenz) unter Auf- und Abpipettieren 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und in 2 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Guanidinthiocyanat ist ein äußerst effektives Agens zur Proteindenaturierung und Enzyminaktivierung. Außerdem führt es zur Lyse der Zellen. Phenol hingegen wird als Lösungsmittel für RNA verwendet. Zu diesem Zeitpunkt war es möglich, die Proben bis zur weiteren Verwendung bei - 80 °C zu lagern. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform und 2-minütiger Inkubation wurden die Proben mit 12 000 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Gemisch trennte sich hierbei in verschiedene Phasen auf: Die farblose, wässrige Phase enthielt die RNA und wurde zur weiteren Verarbeitung in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die untere, organische Phase und die Interphase, welche die DNA enthielt, wurden verworfen. Zur Präzipitation der gelösten RNA, wurden 500 µl 100 % Isopropanol hinzugegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde bei 4 °C mit 21 400 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Niederschlag mit 1 ml 70 % RNase-freiem Ethanol gründlich vermischt und anschließend für 5 min mit 21 400 x g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet sorgfältig an der Luft getrocknet. Zur Resolubilisierung wurden 20 µl RNase freies Wasser hinzugegeben und etwa 10 min auf 55 – 60 °C erhitzt.

3.2.2.2 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung der RNA-Lösung wurde 1 µl der Lösung direkt am UV/VIS-Spektrometers vermessen. Die photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration beruht auf der Absorption bei 260 nm. Zur direkten Vermessung wurde die „Tray Cell“-Erweiterung an einem BioPhotometer® plus verwendet. Die OD bei 280 nm gibt darüber hinaus noch Aufschluss über die Reinheit der untersuchten RNA-Probe. Der Quotient aus der Absorption bei 260 und 280 nm sollte größer als 1,8 sein, damit die RNA-Reinheit ausreichend ist. Die isolierte RNA konnte bis zur weiteren Verwendung bei - 80 °C gelagert werden. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration von Plasmiden wurde ebenso verfahren.

3.2.2.3 Reverse Transkription

Da die bei der PCR verwendeten Polymerasen RNA nicht vervielfältigen können, ist es notwendig diese zunächst in cDNA umzuschreiben. Diese Reaktion wird von einem

speziellen Enzym, der reversen Transkriptase, katalysiert. Für die vorliegende Arbeit wurde das ‚RevertAid H Minus First Strand cDNA-Synthesekit®‘ verwendet. Alle Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt. Es wurde nach folgendem Pipettierschema gearbeitet:

Lösung 1

1 µg RNA (RNA-Isolat)

1 µl *random hexamer primer* (100 µM)

ad 12 µl Wasser (RNase-frei)

Gründlich mischen und für 5 min bei 65 °C inkubieren

Auf Eis stellen

Lösung 2

4 µl 5x Reaktionspuffer

1 µl RNase Inhibitor (20 U/µl)

2 µl 10 mM dNTP-Mix

1 µl RevertAid RT (reverse Transkriptase, 200 U/µl)

Gründlich mischen und zu Lösung 1 pipettieren.

Die so erhaltene Lösung (20 µl je Probe) wurde vorsichtig gemischt, kurz abzentrifugiert und zunächst 5 min bei 25 °C inkubiert, bevor die Temperatur im Thermozykler auf 42 °C erhöht wurde und weitere 60 min inkubiert wurde.

Die Proben (cDNA-Lösung) wurden, wenn sie innerhalb einer Stunde verwendet wurden, auf Eis und ansonsten bei - 80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.2.4 Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Die Messung erfolgt unter Verwendung eines geeigneten qPCR-Thermozyklers. In der vorliegenden Arbeit wurde ein LightCycler® 480 II (Roche, Mannheim) verwendet, welcher Thermozykler und Fluorimeter in einem Gerät vereint. Nach jedem Elongationszyklus erfolgt eine Fluoreszenzmessung. Der verwendete Farbstoff, SYBR™ green I, interkaliert in DNA-Moleküle, und der daraus resultierende DNA-Fluoreszenzfarbstoffkomplex wird bei einer Wellenlänge von 494 nm angeregt. Das

emittierte Licht kann dann detektiert werden und korreliert in der exponentiellen Phase direkt mit der vorliegenden DNA-Menge. Der *cycle threshold* (C_t)-Wert beschreibt den Zyklus, bei dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz angestiegen ist. Die eigentliche Quantifizierung wird nach der vergleichenden C_t -Methode berechnet (ΔC_t). Hierbei wird die Expression des Zielgens in Relation zu einem Haushaltsgen ausgedrückt, welches unter den untersuchten Bedingungen in seiner Expression konstant bleibt. So wurde im Rahmen dieser Arbeit vorab getestet, welches Gen sich dafür eignet. Verwendet wurden schließlich Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Somit wurde die DNA-Menge des Zielgens als x-faches des Haushaltsgens ausgedrückt (siehe Kapitel 3.6)

Die Konstruktion geeigneter Primer erfolgte mit dem Programm ‚*Universal Probe Library Assay Design Center*‘ (Roche, Mannheim). Damit war es möglich, Intron-überspannende Primer zu generieren, wodurch die Amplifikation genomischer DNA verhindert wurde. Die erstellten Primer wurden auf Grundlage muriner Gensequenzen erstellt (siehe Tabelle 1).

Ein Nachteil des verwendeten Farbstoffs SYBRTM Green I ist die unspezifische Bindung an Primerdimere und PCR-Produkte. Daher war es notwendig, eine Schmelzkurvenanalyse durchzuführen, bei der ersichtlich wird, ob ein spezifisches PCR-Produkt entstanden ist. Durch kontinuierliche Temperaturerhöhung der Proben auf 95 °C und paralleler Fluoreszenzmessung werden alle Doppelstränge wieder gelöst und der Farbstoff frei, was zu einer Fluoreszenzänderung führt. Der Farbstoff wird aus unspezifischen Bindungen bei deutlich niedrigeren Temperaturen freigesetzt. So ist für jede Probe erkennbar, ob das gebildete PCR-Produkt frei von Nebenprodukten ist, weshalb die Schmelzkurvenanalyse standardmäßig durchgeführt und als Qualitätskriterium verwendet wurde.

Die aus der cDNA-Synthese erhaltenen Proben wurden geeignet verdünnt. Hier bewährte es sich, in einem ersten Schritt eine Verdünnungskurve anzufertigen, um in etwa im Bereich von 15 – 25 Zyklen zur signifikanten Fluoreszenzerhöhung zu sein ($15 < C_t < 25$). Meist wurden die Proben 1:100 in nukleasefreiem Wasser verdünnt. Für die Reaktion im LightCycler® wurde folgendes Pipettierschema befolgt.

Pipettierschema

8 µl verdünnte cDNA-Lösung

10 µl 2-fach konzentrierter SYBRTM Green I Mastermix (SYBRTM Green, DNA-Polymerase, Nukleotide, Puffer)

2 µl 10µM Primer

Alle Proben wurden auf eine weiße 96-Well qPCR-Mikrotiterplatte pipettiert und sofort mit Adhäsivfolie versiegelt, um eine Kontamination mit Fremd-DNA zu vermeiden. Um eine Kontamination der verwendeten Reagenzien zu überprüfen, wurde eine Wasserkontrolle pipettiert, bei der alle Reagenzien, abgesehen von der cDNA, pipettiert wurden. Ohne cDNA konnte keine Replikation erfolgen, wenn die Reagenzien nicht kontaminiert waren. Durch Zentrifugation mit 200 x g für 2 min wurde der gesamte Reaktionsansatz in die Vertiefung des Wells zentrifugiert. Danach wurde das folgende Thermozykler-Protokoll gestartet:

Thermozykler-Protokoll

95 °C 3 min

| | |
|------------|-------------|
| 95 °C 10 s | } 40 Zyklen |
| 55 °C 10 s | |
| 72 °C 10 s | |

60 bis 95 °C kontinuierlich steigend (Schmelzkurvenanalyse)

Aus den erhaltenen Messwerten wurden die ΔC_T -Werte errechnet und anschließend graphisch dargestellt.

Tabelle 1: Sequenzen der verwendeten Primer

| Zielgen | RefSeq | Vorwärtsprimer | Rückwärtsprimer |
|---------|-----------|--------------------------|---------------------|
| Cirp | NM_007705 | gttggtgtcgaagctgagt | ttaggaagcttggtgtgtg |
| Hsf1 | NM_008296 | agaagtcctgaatgtccag | gaagtcctcagcgtagc |
| Gapdh | NM_008084 | gtggagtcatactggaacatgtag | aatggtgaagtcggtgtg |

3.2.3 Totale RNA-Sequenzierung

Für die vorliegende Arbeit wurde eine vollständige Analyse des Genoms (RNAseq) der mHypoA-2/10-Zellen in Auftrag gegeben (IMGGM Laboratories, Martinsried). Hierdurch sollte ein Überblick über die in dem untersuchten Zellmodell vorliegende mRNA geschaffen werden, um einen Anhaltspunkt über mögliche exprimierte Proteine zu erhalten. Hierfür wurden 1×10^6 mHypoA-2/10 Zellen auf einer 100 cm² Zellkulturschale in Wachstumsmedium ausgesät und nach 16 h ein Mediumwechsel auf serumfreies Medium durchgeführt. Nach weiteren 16 h wurde der Überstand abgenommen und die Zellen mit 5 ml eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen abgeschabt und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von eiskaltem PBS auf ein Endvolumen von 10 ml wurde die Zellsuspension mit 500 x g für 5 min bei 4 °C abzentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in 200 µl PBS aufgenommen und mit RNeasy Lysis Buffer (eiskalt) auf ein Endvolumen von 1 ml aufgefüllt. Die so gewonnenen Proben wurden bei - 80 °C eingefroren, auf Trockeneis gelagert der Firma übergeben und dort verarbeitet und analysiert. Die totale RNA der Zellen wurde mittels dem *‘RNeasy Mini Kit’* (Qiagen, Düsseldorf) extrahiert. Außerdem wurde die Reinheit der isolierten RNA bestimmt. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu der bei 280 nm (A_{260}/A_{280}) war bei allen eingesendeten Proben $\geq 1,9$, was gegen die Anwesenheit von kontaminierenden Proteinen sprach. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu der bei 230 nm (A_{260}/A_{230}) war $\geq 2,0$, was gegen eine Kontaminierung mit anderen organischen Verbindungen, wie Guanidiniumisothiocyanat, Alkohol oder Phenol, sowie zellulären Bestandteilen, wie Kohlenhydraten, sprach. Die Integrität der Proben wurde anschließend im *‘2100 Bioanalyzer’* (Agilent Technologies, Santa Clara) mittels *‘RNA 6000 Nano LabChip Kits’* (Agilent Technologies, Santa Clara) untersucht. Hierbei wurde die isolierte RNA durch Kapillarelektrophorese analysiert. Die Integrität der eingesendeten Proben entsprach den Anforderungen der Firma und wurde daher als intakt bezeichnet. Daraufhin wurde mittels *‘TruSeq® Stranded mRNA HT technology’* die RNA zunächst fragmentiert und anschließend in einer PCR-Reaktion vervielfältigt. Nach einer weiteren Qualitätskontrolle wurde die cDNA mittels reversibler Festphasenimmobilisierung aufgereinigt und anschließend durch die Verwendung von *‘Qubit® ds DNA HS Assay Kit’* (Invitrogen, Carlsbad) quantifiziert. Die Sequenzierung erfolgte schließlich mit dem *‘NextSeq® 500’* Sequenziersystem (Illumina, San Diego). Die daraus gewonnenen Daten wurden durch IMGGM® Laboratories analysiert und zusammen mit den Rohdaten an uns

ausgehändigt. Die erhaltenen Rohdaten wurden direkt nach GraphPad Prism 9.1 übertragen und dort ausgewertet.

3.2.4 Bestimmung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration

Intrazelluläres Ca^{2+} ist ein wichtiger sekundärer Botenstoff, der an einer Vielzahl physiologischer und pathologischer Prozesse beteiligt ist. Steigende Ca^{2+} -Spiegel innerhalb der Zelle können beispielsweise Enzyme aktivieren, die ihrerseits dann Einfluss auf die Transkriptionsaktivität nehmen können (Lesch, Rössler et al. 2017). Eine häufig verwendete Methode, um den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel zu messen, ist die Verwendung von Aequorin. Bei Aequorin handelt es sich um ein Photoprotein aus biolumineszenten Quallen der Gattung *Aequorea*. In Aequorin liegt Coelenterazin als prosthetische Gruppe gebunden vor. An das Apoprotein können drei Ca^{2+} -Ionen binden, woraufhin sich die Konformation des Proteins ändert. Damit wird eine intramolekulare Reaktion des Coelenterazins ausgelöst und dasselbige zu einem instabilen Dioxetan umgesetzt. Durch Decarboxylierung und Relaxation in den Grundzustand wird ein Lichtquant freigesetzt (Shimomura, Johnson et al. 1974, Baubet, Le Mouellic et al. 2000). Durch molekularen Sauerstoff kann das Coelenterazin letztendlich regeneriert werden und die Reaktion erneut ablaufen.

Zunächst wurden mHypoA-2/10-Zellen mit der cDNA für Aequorin transfiziert (siehe Kapitel 3.5.1.1). Am nächsten Tag wurde dann die Coelenterazinlösung vorbereitet: Hierfür wurden 2,5 ml einer 0,5-prozentigen Lösung in phenolrotfreien SM angesetzt und 30 min mit den Zellen bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen und die Zellen in 1 ml SM (ohne Phenolrot) resuspendiert. Die Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wurde in 96-Well Mikrotiterplatten mit weißem Boden durchgeführt. Je Well wurden 80 µl der Zellsuspension gegeben und mit 20 µl einer 5-fach konzentrierten BK-Lösung inkubiert. Hierfür wurde eine Pumpe des Luminometers mit der Lösung befüllt und entlüftet. Durch automatische Injektion von 20 µl je Well konnte der BK-induzierte Ca^{2+} -Anstieg im Vergleich zu der basalen Ca^{2+} -Konzentration bestimmt werden. Es wurde sekundlich die totale Lumineszenz für die Dauer von 2 s vor und 8 s nach der Injektion bestimmt. Die gemessene Lumineszenz wurde in w. E. ausgegeben und gemäß Kapitel 3.6 normiert.

3.3 Radiobiochemische Methoden

3.3.1 Bestimmung der Ligandenbindung

Die Studie der Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor zählt zu einer der ersten *in vitro* Methoden um die Funktion eines Rezeptor zu untersuchen (Kenakin and Kenakin 1993). Sie ermöglicht eine direkte Messung der Interaktion zwischen GPCR-Proteinen und Liganden, wie Hormonen oder pharmazeutischen Verbindungen und liefert somit wichtige Informationen über Rezeptorexpression und Affinität des Liganden zum Rezeptor. Man unterscheidet drei verschiedene Arten der Bindungsmessung: Sättigungsbindung, kompetitive Bindung und kinetische Bindungsstudien. Für die Messung der Bindung von Liganden an den Rezeptor wurde [^{125}I]-(\pm)-Cyanopindolol (^{125}I -CYP) verwendet. Aufgrund der Halbwertszeit des Radionuklids von 59,4 Tagen wurde jeweils am Tag der Verwendung der Verbindung die aktuelle Konzentration berechnet. Hierfür wurde der *radioactive decay calculator* (PerkinElmer, Waltham) verwendet.

3.3.1.1 Sättigungsbindung

Bei der Sättigungsbindung wird eine festgelegte Menge der präparierten Membranen mit unterschiedlichen Konzentrationen des radioaktiv markierten Ligands inkubiert, um Interaktion des Liganden mit dem Rezeptor zu ermöglichen. Für jede eingesetzte Konzentration wird nach einer bestimmten Zeit ein Gleichgewicht aus Assoziation (K_{on}) an und Dissoziation (K_{off}) von dem Rezeptor erreicht (Maguire, Kuc et al. 2012). Die Menge gebundenen Ligands steigt mit der eingesetzten Konzentration, bis quantitative Bindung stattfindet und alle Rezeptoren den radioaktiven Liganden gebunden haben. Anschließend wird der ungebundene Ligand mittels Filtration separiert und die gebundene Radioaktivität bestimmt. Durch die eingesetzte Proteinmenge lässt sich dann die absolute Expression des Rezeptors bestimmen. Es ist allerdings nötig, spezifische von nicht-spezifischer Bindung zu unterscheiden, da der eingesetzte Ligand nicht nur den Rezeptor, sondern auch Zellmembranen mit einer bestimmten Affinität bindet. Es gilt diese gemessene gesamte Bindung um den Betrag der nichtspezifischen zu korrigieren, um damit die spezifische Bindung an den Rezeptor zu erhalten. Die nichtspezifische Bindung wird bestimmt, indem ein großer Überschuss, üblicherweise das 100-fache der Dissoziationskonstante (K_d), eines nicht radioaktiv markierten Ligands eingesetzt wird,

der den radioaktiven quantitativ vom Rezeptor verdrängt. Für die, im Rahmen dieser Arbeit, durchgeführten Versuche wurde Propranolol, ein nicht selektiver β -AR-Antagonist, in einer finalen Konzentration von 10 μ M verwendet. Trägt man die spezifische Bindung gegen die Konzentration des eingesetzten radioaktiven Liganden auf, erhält man eine Hyperbel mit asymptotischer Annäherung an die maximale Bindung (B_{\max}). Aus dieser Kurve lässt sich dann der K_d der Bindung von ^{125}I -CYP an den Rezeptor berechnen. Üblicherweise verwendet man eine Konzentration des radioaktiven Liganden im Bereich des K_d für kompetitive Bindungsexperimente.

Um die Sättigungskurve zu bestimmen, wurden zunächst Membranen präpariert (siehe Kapitel 3.1.5) und in SM in einer Konzentration von 10 μ g pro Ansatz resuspendiert. Die Messung der Sättigungsbindung wurde in tiefen 96-Well Mikrotiterplatten durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 500 μ l. Zunächst wurden 50 μ l des radioaktiv markierten Ligands ^{125}I -CYP (Endkonzentration 3,125 – 400 pM) in SM vorgelegt. Anschließend wurden entweder 50 μ l SM (totale Bindung) oder 50 μ l Propranolol (Zielkonzentration 10 μ M) in SM (unspezifische Bindung) hinzugegeben. Die Platten wurden bei der jeweiligen Temperatur, vor Verdunstung geschützt mindestens 1 h in den Temperaturschränken inkubiert, die zuvor mindestens 2 h auf die entsprechende Temperatur vorgeheizt worden waren. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 400 μ l der auf 37 °C erwärmten Membransuspension gestartet. Die Endkonzentration betrug demnach 10 μ g je Well der Mikrotiterplatte. Nach einstündiger Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Ernten der Membranen beendet (siehe Beendigung der Reaktion).

3.3.1.2 Kompetitive Bindungsexperimente

Für kompetitive Bindungsexperimente wird eine definierte Menge der Membranpräparation mit einer Konzentration ^{125}I -CYP, die in etwa dem K_d (siehe Kapitel 3.3.1.1) entspricht, eingesetzt und mit verschiedenen Konzentrationen eines nicht radioaktiven Liganden von dem Rezeptor verdrängt. Die Affinität des Liganden zum Rezeptor bestimmt die Menge an verdrängtem ^{125}I -CYP bei einer gegebenen Konzentration. Die Bindung des radioaktiv markierten Liganden an den Rezeptor, in der Abwesenheit von nicht-markierten Liganden, ergibt hier die maximale Bindung (B_{\max}). Wird die Konzentration des nicht-markierten Liganden erhöht, wird der gebundene radioaktive Ligand sukzessive vom Rezeptor verdrängt. Wenn die spezifische Bindung gegen die logarithmische Konzentration des eingesetzten radioaktiven Ligands

aufgetragen wird, erhält man häufig eine umgekehrte Sigmoidkurve mit asymptotischer Annäherung an die X-Achse. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) gibt die Konzentration des Liganden an, bei der die Hälfte aller Rezeptoren besetzt sind. Mit Hilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung (3) kann die Inhibitionskonstante (K_i) berechnet werden. S bezeichnet die ^{125}I -CYP-Konzentration.

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{S}{K_d}} \quad (3)$$

Für die Bestimmung der kompetitiven Verdrängung von ^{125}I -CYP, durch beispielsweise NA oder Sal, wurden zunächst Membranen von mHypoA-2/10-Zellen präpariert (siehe Kapitel 3.1.5). Anschließend wurden je 50 μ l ^{125}I -CYP (75 pM) und unterschiedliche Konzentrationen des Liganden, gelöst in Membranpuffer, in tiefe 96-Well Mikrotiterplatten pipettiert und bei 36 bzw. 38 °C 1 h vorinkubiert. Die präparierten Membranen wurden in Membranpuffer resuspendiert und auf eine Konzentration von 50 μ g/ml eingestellt. Sollte durch die Verwendung von Gpp(NH)p eine Entkopplung des Rezeptors von seinem G-Protein erreicht werden, wurde die Membransuspension für 20 min mit 100 μ M Gpp(NH)p vorinkubiert. Die Membransuspension wurde schnell auf 37 °C erwärmt und 400 μ l davon zu den Mikrotiterplatten gegeben, um die Reaktion zu starten. Die Membranmenge betrug je Well somit 20 μ g bei einem gesamten Reaktionsvolumen von 500 μ l. Die Platten wurden 1 h bei 36 bzw. 38 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen am Zellernter geerntet (siehe Beendigung der Reaktion).

3.3.1.3 Bestimmung der Ligandenbindung an ganzen Zellen.

Die Bindung von Sal an AR wurde nicht nur an Membranpräparationen, sondern auch an ganzen Zellen durchgeführt. Durch die Verwendung intakter Zellen ergibt sich der Vorteil der dynamischen Interaktion zwischen dem Rezeptor und intrazellulären Komponenten, wie G-Proteinen oder Enzymen, die diese modulieren können.

Für die Messung der Bindung von Sal an mHypoA-2/10-Zellen wurden 1×10^6 Zellen auf 150 cm^2 -Zellkulturschalen ausgesät und nach 24 h das Serum mittels Mediumwechsels entzogen. Nach weiteren 16 – 24 h wurden die Zellen vorsichtig auf Eis abgeschabt und in vorgewärmten SM (37 °C) resuspendiert. 400 μ l der Suspension wurden zu den vorbereiteten tiefen 96-Well Mikrotiterplatten (siehe oben) gegeben und die Reaktion damit gestartet. Die Platten wurden anschließend bei 36 oder 38 °C in den

Temperaturschränken inkubiert. Nach 1 h wurde die Reaktion durch Filtration am Zellernter gestoppt (siehe Beendigung der Reaktion).

3.3.1.4 Messung der Endozytoserate

Nach Stimulation durch einen Agonisten kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors mit Aktivierung des G-Proteins. Danach wird der Rezeptor durch GRKs phosphoryliert (Pitcher, Freedman et al. 1998), was die Bindung von β -Arrestinen ermöglicht. β -Arrestine sind verknüpft mit Adapterproteinen wie Clathrin (Zhang, Barak et al. 1997) und können zu einer Internalisierung des Rezeptors durch Ausbildung von Clathrin-beschichteten Stachelsaumgrübchen führen (siehe Kapitel 1.4.2.3).

Die Messung der Endozytoserate erfolgte bei 36 und bei 38 °C. Hierfür wurden je 1×10^6 mHypoA-2/10-Zellen auf vier 100 cm²-Zellkulturschalen ausgesät. Am nächsten Tag wurde durch einen Mediumwechsel auf SM das Serum entzogen und die Zellen bei 37 °C im Temperaturschrank inkubiert. Nach 16 – 24 h wurden zwei der Zellkulturschalen für 1 h mit NA (10 μ M) bei 36 oder 38 °C stimuliert. Die beiden anderen Zellkulturschalen wurden bei der jeweiligen Temperatur ohne NA inkubiert. Während der Inkubation wurde eine 96-Well Mikrotiterplatte vorbereitet. In diese wurden entweder 50 μ l CGP12177 in SM (Zielkonzentration 100 nM), 50 μ l Propranolol in SM (Zielkonzentration 100 μ M) oder 50 μ l SM pipettiert. Zusätzlich wurden 50 μ l ¹²⁵I-CYP in SM (Zielkonzentration 25 pM) hinzugegeben. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend bei 4 °C vorinkubiert. Nach der einstündigen NA-Stimulation wurden die Zellen auf Eis zweimal mit 5 ml eiskalten PBS gewaschen, abgeschabt und anschließend in eiskaltem SM resuspendiert. Danach wurden 400 μ l dieser Zellsuspension zu den bereits vorbereiteten 96-Well Mikrotiterplatten pipettiert und 5 h bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktion durch Filtration am Zellernter beendet (siehe Beendigung der Reaktion).

In Abb. 6 ist das Prinzip der Bestimmung der Endozytoserate schematisch dargestellt. Die Verwendung des hydrophilen Liganden CGP-12177 führt dazu, dass ¹²⁵I-CYP nur von Rezeptoren an der Oberfläche verdrängt wird. Somit wird hierbei lediglich die Portion der Rezeptoren bestimmt, die an der Oberfläche exprimiert werden. Propranolol hingegen kann die Zellmembran uneingeschränkt passieren und daher auch an intrazelluläre (endozytierte) Rezeptoren binden und ¹²⁵I-CYP dort verdrängen. Propranolol vermag somit ¹²⁵I-CYP vollständig von den Rezeptoren zu verdrängen, woraus sich somit die gesamte Rezeptorexpression, unabhängig von der Lokalisierung,

ergibt. Die totale Bindung wird durch die Bindung von ^{125}I -CYP bestimmt. Die Berechnung der Endozytoserate und der Herunterregulierung des Rezeptors, die auf dem gleichen experimentellen Aufbau basiert, sind in Kapitel 3.6 erläutert.

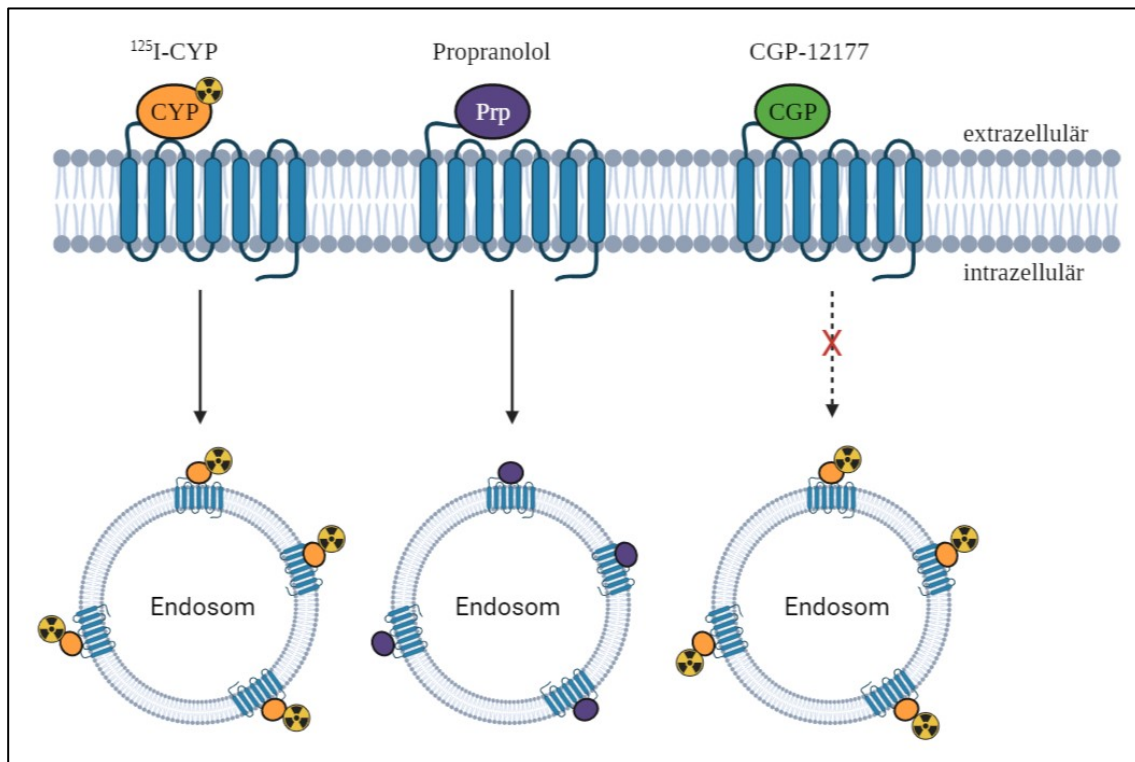


Abb. 6: Schematische Darstellung der Bestimmung der Endozytoserate

Die Inkubation intakter Zellen mit ^{125}I -CYP führt zu einer Bindung an β -AR an der Zellmembran und an intrazelluläre Rezeptoren. Mit Propranolol kann ^{125}I -CYP von diesen Bindestellen verdrängt werden. CGP12177 hingegen ist kaum zellmembrangängig, weshalb es ^{125}I -CYP lediglich von Rezeptoren, die an der Zellmembran exprimiert sind, verdrängen kann. Somit kann die Menge des intrazellulären Rezeptors berechnet werden (siehe Kapitel 3.6).

3.3.1.5 Beendigung der Reaktion

Unabhängig von der Vorbehandlung wurde die Reaktion auf die gleiche Art und Weise beendet. Hierfür wurde die Suspension in den Mikrotiterplatten schnell mit einem Zellernter auf Filtermatten abgesaugt und diese 3-mal mit eiskalten PBS (1 ml) gewaschen. Die Filtermatten wurden zuvor für 1 h bei 4 °C mit 0,5-prozentiger Polyethylenimin-Lösung inkubiert, um negative Ladungen auf der Filtermatte abzuschwächen. Auf den Filterplättchen blieben somit die Membranen, bzw. Zellen zurück. Das daran gebundene ^{125}I -CYP konnte durch Flüssigszintillationsmessung

bestimmt werden. Das Filterplättchen wurde dafür in ein Szintillationsröhrchen überführt und mit 5 ml Szintillationscocktail vermischt. Nach 24 h wurde die Aktivität bestimmt (siehe Kapitel 3.3.5).

3.3.2 Bestimmung der cAMP-Konzentration

Die intrazelluläre cAMP-Konzentration reguliert über Aktivierung von Effektorproteinen, wie PKA und Epac, eine Vielzahl zellulärer Prozesse. Stimulierung der ACs durch Aktivierung von G_s -gekoppelten Rezeptoren oder direkt durch FSK führt zur Umwandlung von ATP in cAMP (siehe Kapitel 1.4.2). Die Vorinkubation von Zellen für mindestens 6 h mit ^3H -Adenin, führt zur Inkorporation und Verstoffwechselung zu ^3H -ATP. Daraus wird bei AC-Aktivität ^3H -cAMP gebildet. Die stark ausgeprägte Aktivität von endogen exprimierten PDEs macht es erforderlich 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX), einen nicht-selektiven PDE-Inhibitor, einzusetzen. Der Abbau von gebildetem ^3H -cAMP wird somit verhindert, weshalb die ^3H -cAMP-Akkumulation bestimmt werden kann (Salomon, Londos et al. 1974). Hierfür wird ^3H -cAMP durch sequenzielle Chromatographie von weiteren radioaktiven Stoffwechselprodukten separiert und kann schließlich durch Flüssigszintillationsmessung nachgewiesen werden. mHypoA-2/10-Zellen wurden dafür auf 12-Well Mikrotiterplatten zu je 1×10^5 Zellen ausgesät. Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel auf $1 \mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Adenin in SM durchgeführt. Dadurch wurde einerseits das Serum entzogen und andererseits die Inkorporation von ^3H -Adenin initiiert. Danach wurde mit den Zellen je nach Temperaturprogramm (siehe Kapitel 4.1) unterschiedlich verfahren:

3.3.2.1 Bestimmung nach Inkubation im akuten Programm

Die Zellen wurden 21 h bei 37°C in den Temperaturschränken inkubiert (siehe Abb. 11A). Anschließend wurden die Zellen mit einer 10-fach konzentrierten Lösung der Liganden in der Anwesenheit von IBMX (1 mM) stimuliert. Hierfür wurden die Zellen aus den Inkubatoren entnommen und die auf 37°C vortemperierte Lösung auf die Zellen gegeben. Währenddessen wurde die Temperatur in den Inkubatoren automatisch auf entweder 36°C verringert oder auf 38°C erhöht. Diese Endtemperatur wurde erreicht, während die Lösung pipettiert wurde. Die Zellen wurden anschließend bis zu 1 h bei der jeweiligen Temperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktion gestoppt (siehe Kapitel 3.3.2.3).

Zur Bestimmung des extrazellulären cAMP musste vor der Stimulation ein Mediumwechsel durchgeführt werden, um die ^3H -Adeninlösung abzunehmen. Die hohe Aktivität im Überstand hätte andernfalls die Messung gestört. Hierfür wurde 30 min vor der Stimulation der Überstand abgesaugt und 450 μl SM (37 °C) auf die Zellen gegeben. Wurde Indomethacin verwendet, um den Efflux zu inhibieren, wurde dieser Lösung Indomethacin in der gewünschten Konzentration zugesetzt. Im Anschluss wurde wieder mit einer 10-fach konzentrierten Lösung stimuliert (siehe oben). Danach wurde der Überstand abgenommen und die Reaktion beendet (siehe Kapitel 3.3.2.3).

3.3.2.2 Bestimmung nach Inkubation im circadianen Programm

Die Zellen wurden hierfür im circadianen Programm (CP) inkubiert (siehe Abb. 11B). 1 h vor dem Ende des Programms wurden die Zellen aus den Inkubatoren entnommen und zügig mit einer 10-fach konzentrierten Lösung des jeweiligen Liganden in der Anwesenheit von IBMX (1 mM) stimuliert. Diese Stimulationslösung wurde zuvor auf 37 °C vortemperierte. Die Zellen wurden anschließend 1 h in dem jeweiligen Inkubator bei 36 oder 38 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktion gestoppt:

3.3.2.3 Beendigung der Reaktion

Nach Abnahme oder Absaugen des Überstandes wurde 1 ml eiskalte 5 % Trichloressigsäure (TCA) auf die Zellen gegeben und 15 min bei 4 °C inkubiert. Der Überstand wurde mit 1 ml 10 % TCA behandelt und ebenso 15 min bei 4 °C inkubiert.

3.3.2.4 Sequenzielle Säulenchromatographie

Etwa 2 h vor dem Experiment wurden die für die Chromatographie benötigten Säulen (Dowex®-Resin und Aluminiumoxid) vorbereitet. Hierfür wurden die Dowex®-Säulen mit 10 ml HCl (1 M) und anschließend mit 10 ml vollentsalztem (VE)-Wasser gewaschen. Die Aluminiumoxidsäulen wurden mit 10 ml Imidazolösung (0,1 M) gewaschen, welche zuvor mit HCl auf einen pH von 7,4 eingestellt worden war. Anschließend wurden die Dowex®-Säulen auf Szintillationsröhrchen (20 ml) gestellt. Die TCA-Extrakte (1 ml) wurden direkt auf die Dowex®-Säulen gegeben. Wenn die Proben vollständig eluiert waren, wurden die Säulen mit 4 ml VE-Wasser gewaschen und ebenso in die Szintillationsröhrchen eluiert. In dieser Fraktion befanden sich nun radioaktiv markierte Nukleotide wie ATP. Um das gebundene cAMP zu eluieren wurden die Dowex®-Säulen

auf die Aluminiumoxidsäulen gestellt und mit 10 ml Wasser befüllt. War auch dieses vollständig durchgelaufen, wurden die Dowex®-Säulen entfernt und die Aluminiumoxidsäulen mit 1 ml der Imidazolösung gewaschen. Danach wurden diese auf neue Szintillationsröhrchen gestellt und mit weiteren 5 ml der gleichen Lösung eluiert. In dem Eluat war nun das intrazelluläre cAMP zu finden.

Zur Messung des cAMP-Efflux wurde die Mischung aus TCA und dem Zellüberstand direkt auf die Dowex®-Säulen gegeben und analog verfahren. Die Szintillationsmessung erfolgte nach der Zugabe von 12 ml Szintillationscocktail und gründlicher Vermischung der Lösungen (siehe Kapitel 3.3.5). Die Proben wurden je für 5 min im Szintillationszähler vermessen. Die gemessene cAMP-Aktivität in *decay per minute* (DPM) wurde in das Verhältnis zu der gesamten Adenin-Inkorporation in DPM gesetzt. Nach der Formel

$$cAMP\text{-}ratio = \frac{DPM (cAMP)}{DPM (cAMP) + DPM (ATP)} \times 1000$$

ergab sich hiermit die intra- bzw. extrazelluläre cAMP-Konzentration im Verhältnis zur gesamten Adenin-Inkorporation, welche mit der eingesetzten Zellzahl korreliert (Tolkovsky and Suidan 1987). Die gemessene cAMP-Konzentration wurde daher immer als cAMP-ratio ausgedrückt.

3.3.3 Messung der G-Proteinaktivierung

Durch Stimulierung eines Rezeptors mit einem Agonisten agiert der Rezeptor als GEF und katalysiert den Austausch von GDP durch GTP am gebundenen G-Protein, welches damit aktiviert wird. Dies führt zur Dissoziation vom Rezeptor mit nachfolgender Aktivierung von beispielsweise ACs. Die Messung der G-Proteinaktivierung korreliert daher direkt mit der Rezeptoraktivierung durch einen Agonisten (Oldham and Hamm 2008).

Zunächst wurden Membranen von mHypoA-2/10-Zellen präpariert (siehe Kapitel 3.1.5). Für die Bestimmung der basalen G-Proteinaktivierung wurden tiefe Well-Mikrotiterplatten mit 50 µl [³⁵S]-GTPγS (Zielkonzentration 0,1 nM) und 50 µl Gpp(NH)p (Zielkonzentration 100 µM) oder 50 µl Pufferlösung vorbereitet und mindestens 30 min bei 30 °C vorinkubiert. Währenddessen wurden 5 bis 20 µg der Membranpräparation in 400 µl Pufferlösung resuspendiert, auf 30 °C temperiert und zu den vorbereiteten

Mikrotiterplatten pipettiert. Die Zellen wurden schließlich 30 min bei 30 °C inkubiert, bevor durch Ernten der Zellen und anschließender Filtration am Zellernter (siehe Kapitel 3.3.1.5) gebundenes von nicht-gebundenem [^{35}S]-GTP γ S getrennt wurde. Die Filterplättchen wurden mit 5 ml Szintillationscocktail versehen und mindestens 24 h inkubiert, bevor die Flüssigszintillationsmessung erfolgte (siehe Kapitel 3.3.5).

Pufferlösung

| | |
|------------------------|---------------------|
| 100 mM NaCl | 1 mM EDTA |
| 5 mM MgCl ₂ | 5 μM GDP |
| 20 mM HEPES | Proteaseinhibitoren |

Die G-Proteinaktivierung ist stark von den verwendeten Pufferzusätzen abhängig (Bidlack and Parkhill 2004). Um die idealen Bedingungen für die NA-induzierte G-Proteinaktivität zu finden, wurden die Pufferzusätze daher variiert. In Tabelle 2 sind die getesteten Puffersysteme und deren Zusammensetzung dargestellt. Mit den dort aufgeführten Puffern wurde die NA-induzierte G-Proteinaktivierung bestimmt. Hierfür wurde wie zuvor beschrieben verfahren. Statt Gpp(NH)p wurde allerdings 50 μl einer NA-Lösung in der Zielkonzentration von 10 μM zu dem Ansatz gegeben. Nach der Äquilibration bei 30 °C erfolgte erneut die Zugabe der Zellmembransuspension in dem jeweiligen Puffersystem. Nach 30 min bei 30 °C wurde die Aktivität mittels Flüssigszintillation gemessen (siehe Kapitel 3.3.5).

Tabelle 2: Zusammensetzung der Pufferlösungen für die Bestimmung der G-Proteinaktivierung

Die Bezeichnung des Puffers ist in der ersten Spalte angegeben.

| | NaCl | MgCl ₂ | GDP |
|-----------|--------|-------------------|------------------|
| 1A | 100 mM | 5 mM | 1 μM |
| 1B | 100 mM | 5 mM | 5 μM |
| 1C | 100 mM | 5 mM | 10 μM |
| 2A | 10 mM | 5 mM | 1 μM |
| 2B | 10 mM | 5 mM | 5 μM |
| 2C | 10 mM | 5 mM | 10 μM |
| 3A | 10 mM | 50 mM | 5 μM |
| 3B | 10 mM | 50 mM | 10 μM |

| | | | |
|-----------|--------|--------|------------|
| 4A | 100 mM | 10 mM | 1 μ M |
| 4B | 100 mM | 10 mM | 5 μ M |
| 4C | 100 mM | 10 mM | 10 μ M |
| 5A | 10 mM | 10 mM | 1 μ M |
| 5B | 10 mM | 10 mM | 5 μ M |
| 5C | 10 mM | 10 mM | 10 μ M |
| 6A | 100 mM | 100 mM | 5 μ M |
| 6B | 100 mM | 100 mM | 10 μ M |

Die oben aufgeführten Puffer enthielten zusätzlich noch BSA (0,5 %), Saponin (20 μ g/ml) und HEPES (20 mM).

3.3.4 Messung der Phosphodiesteraseaktivität

Intrazellulär erhöhte cAMP-Spiegel werden schnell von endogen exprimierten PDEs durch Abbau zu 5'-AMP beseitigt (siehe Kapitel 1.4.2.4). Die Messung der PDE-Aktivität wird nachfolgend beschrieben.

3.3.4.1 Biosynthese von ^3H -cAMP durch mHypoA-2/10-Zellen

2 x 10⁶ mHypoA-2/10 Zellen wurden auf je vier 150 cm² Zellkulturschalen ausgesät. Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel auf serumfreies Medium durchgeführt. Zwei der Zellkulturschalen dienten zur Generation von ^3H -cAMP, wofür dem serumfreien Medium 1 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Adenin zugesetzt wurde. Nach 16 – 24 h wurden diese Zellen mit FSK (100 μM) für 10 min stimuliert, um eine maximale cAMP-Produktion zu bewirken. Um das intrazelluläre ^3H -cAMP zu gewinnen und aufzureinigen, wurde eine sequenzielle Säulenchromatographie vorgenommen (siehe Kapitel 3.3.2.4). Die Chromatographie wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt, lediglich die Elution mit 0,1 M Imidazol (pH 7,4) erfolgte in Schritten zu je 1 ml. Die somit erhaltenen Fraktionen wurden jeweils durch Flüssigszintillationsmessung vermessen und nur diejenigen vereinigt, die signifikante Mengen ^3H -cAMP enthielten. Die vereinigte ^3H -cAMP-Lösung wurde mit der Pufferlösung auf 1 x 10⁶ DPM/ml eingestellt. Die zwei übrigen Zellkulturschalen wurden je mit 1 ml Triton® X (1 %) versetzt, was zur Lyse der Zellmembran führte. Die Zellfragmente wurden in 2 ml eiskalte Pufferlösung aufgenommen und bei 4 °C mit 3000 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand enthielt die freigesetzten PDEs (PDE-Lösung). Die Messung der PDE-Aktivität wurde in 2 ml Eppendorfgefäßen realisiert.

Hierfür wurde 900 µl des ^3H -cAMP-haltigen Puffers vorgelegt. Um den PDE-induzierten ^3H -cAMP-Abbau bestimmen zu können, wurde zu einem Teil der Proben auch IBMX (Zielkonzentration 1 mM) hinzugefügt. Die so vorbereiteten Proben wurden mindestens 1 h bei 37 °C vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 100 µl der PDE-Lösung und Inkubation bei der jeweiligen Temperatur gestartet. Je Probe wurden somit etwa 1×10^5 DPM eingesetzt. Nach 30 min wurde die Reaktion durch Erhitzen der Proben auf 100 °C für 2 min in einem Temperaturschüttler beendet. Nach dem Abkühlen wurden die Proben mit dem gleichen Volumen 10 % TCA versetzt und direkt auf die Dowex®-Säule gegeben. Diese wurden anschließend mit 4 ml VE-Wasser gewaschen. Im Anschluss wurden die Säulen auf die Aluminiumoxidsäulen gestellt und erneut mit insgesamt 20 ml VE-Wasser gewaschen. Dadurch wurde das ^3H -cAMP quantitativ auf die Aluminiumoxidsäulen eluiert. Danach wurde mit 20 ml 0,1 M Imidazollösung (pH 7,4) direkt in die Szintillationsröhrchen eluiert, was zur quantitativen Elution von ^3H -cAMP führte. Je 1 ml des Eluats wurde mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit gründlich vermischt und mindestens 24 h inkubiert. Die Aktivität wurde schließlich durch Flüssigszintillationsmessung bestimmt. Der Vergleich der Aktivität zwischen Proben, die mit bzw. ohne IBMX inkubiert wurden, ergab den PDE-induzierten ^3H -cAMP-Abbau.

Pufferlösung

| | |
|-----------------------|---------------------|
| 1 mM EDTA | 50 mM HEPES |
| 0,1 mM EGTA | HCl q. s. pH 7,4 |
| 10 mM MgCl_2 | Proteaseinhibitoren |

3.3.4.2 Verwendung von kommerziell erworbenen ^3H -cAMP

Das durch die mHypoA-2/10-Zellen produzierte ^3H -cAMP hatte gegenüber dem kommerziell erworbenen Reagenz drei entscheidende Nachteile: (1) war die Reinheit des generierten ^3H -cAMPs durch die Trennung von den radioaktiven Metaboliten deutlich geringer. (2) musste ^3H -cAMP mit Imidazol eluiert werden, weshalb dieses auch im Reaktionsansatz zu finden war und möglicherweise die Enzymaktivität beeinflusste. (3) war die ^3H -cAMP-Konzentration im Eluat äußerst gering. Aus diesen Gründen wurde für weitere Messungen der PDE-Aktivität ^3H -cAMP von Hartmann-Analytics verwendet. Außerdem wurde zum Aufschluss der Zellen nicht mehr Triton® X verwendet, sondern die PDEs durch mechanische Disruption mit einem Dispergierer freigesetzt, um die endogene Aktivität der zellulären Enzyme möglichst wenig zu beeinflussen.

Hierfür wurden je 1×10^6 mHypoA-2/10-Zellen auf zwei 150 cm² Zellkulturschalen ausgesät und am nächsten Tag ein Mediumwechsel auf serumfreies Medium durchgeführt. Nach 16 – 24 h wurden die Zellen auf Eis zweimal mit je 5 ml PBS gewaschen, anschließend abgeschabt und in 2 ml Puffer resuspendiert. Die mechanische Disruption erfolgte mit einem Ultra Turrax durch 3 Pulse zu je 10 s mit Stufe 4. Zwischen den Pulsen wurde die Suspension 30 s auf Eis gekühlt, um eine Erwärmung der Proben zu verhindern. Im Anschluss wurde der Proteaseinhibitor nach den Angaben des Herstellers hinzugefügt. Zuvor wurden 2 ml Eppendorfgefäße vorbereitet. Hierfür wurden 900 µl Puffer mit je 1×10^5 DPM ³H-cAMP versetzt und zu einem Teil davon IBMX (Zielkonzentration 1 mM) gegeben. Um Effekte zu berücksichtigen, die unabhängig von Zelllysaten auftreten können, wurde zu einem Teil der Proben nur ³H-cAMP-haltiger Puffer ohne Zellsuspension gegeben. Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C, oder wenn der temperaturabhängige ³H-cAMP-Abbau bestimmt werden sollte, bei 36 oder 38 °C inkubiert, um das Gefäß und die Lösung vorzuwärmen. Die Zellsuspension wurde anschließend rasch auf 37 °C erwärmt und 100 µl davon zu dem Ansatz pipettiert, wodurch die Reaktion gestartet wurde. Es wurde schließlich bei der jeweiligen Temperatur bis zu 1 h inkubiert. Danach wurde die Reaktion, wie zuvor beschrieben, gestoppt (siehe Kapitel 3.3.2.3), das verbliebene ³H-cAMP durch Säulenchromatographie aufgereinigt (siehe Kapitel 3.3.2.4) und mittels Flüssigszintillationsmessung bestimmt. Der Vergleich zwischen dem ³H-cAMP-Gehalt mit und ohne PDE-Lösung ergab den PDE-induzierten ³H-cAMP-Abbau.

3.3.5 Flüssigszintillationsmessung

Die mit dem Szintillationscocktail versetzten Proben wurden nach einer geeigneten Inkubationszeit in dem Flüssigszintillationszähler ‚WinSpectral 1414‘ (Perkin Elmer, Waltham) vermessen. Durch die β -Strahlung der mit Tritium markierten Verbindungen wurde der primäre Szintillator Isopropyl-naphthalin angeregt. Bei Relaxation erfolgte die Emission eines Lichtquants, der vermessen wurde. Da Tritium ein schwacher β -Strahler ist, betrug die Quantenausbeute nur etwa 30 % (Horrocks 1976). Die gemessene Lichtemission, *counts per minute* (CPM), wurde daher automatisch durch Verwendung eines internen Standards korrigiert und in den Zerfall je Minute [engl. *decay per minute* (DPM)] ausgegeben. Je Probe wurde 5 min gemessen, damit der DPM mit hoher Genauigkeit berechnet werden konnte.

3.4 Proteinnachweis

Um die Proteinexpression durch den Western Blot zu bestimmen, wurden die Proteine zunächst aus der Zelle freigesetzt und denaturiert. Hierfür wurde Laemmli-Puffer verwendet (Laemmli 1970), der unter anderem Natriumdodecylsulfat [engl. *sodium dodecyl sulfate* (SDS)] und β -Mercaptoethanol enthält. SDS bewirkt als anionisches Tensid eine Ladungsüberdeckung der Proteine, was zu einer Denaturierung und Linearisierung der Proteine führt. Die resultierende negative Ladung der Proteine ist somit nur noch abhängig von der Kettenlänge, welche proportional zur Molekülmasse ist (Smith 1984). Der Zusatz von β -Mercaptoethanol bewirkt eine Spaltung von Disulfidbrücken und Denaturierung von Tertiär- und Quartärstrukturen.

3.4.1 Herstellung von Proteinlysaten

Es wurden Zellen auf 6-Well Mikrotiterplatten ausgesät und am nächsten Tag weiterbehandelt, so beispielsweise mit CIRP-cDNA transfiziert (siehe Kapitel 3.5.1.1). Nach weiteren 16 – 24 h wurden die Proben auf Eis gebracht, der Überstand abgesaugt und die Zellen durch die Zugabe von 200 μ l Laemmli-Puffer lysiert. Das Lysat wurde in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und 10 s mit Ultraschall (Intensität 45 %) behandelt, um die genomische DNA zu zerstören. Effektive Proteindenaturierung wurde durch Erhitzen der Proben auf 90 °C für 3 min erreicht. Anschließend wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C gelagert.

Laemmli-Puffer:

| | | |
|------------------------|---------------------------------|---------------|
| 0,025 % Bromphenolblau | 15 mM Tris/HCl pH 6,8 | 1 % SDS (w/v) |
| 5 % Glycerin (v/v) | 1,25 % β -Mercaptoethanol | |

3.4.2 Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung des denaturierten Proteingemisches erfolgte an einem diskontinuierlichen Polyacrylamidgel. Dieses besteht aus zwei Teilen: Zum einen aus dem Sammelgel, auf welches das Proteinlysate aufgetragen wird und zum anderen aus dem Trenngel, in welchem die eigentliche Auftrennung nach dem Molekulargewicht erfolgt. Das Sammelgel führt zu einem ‚stacking‘-Effekt. Die Proteine bilden hierbei einen Stapel in der Reihenfolge ihrer Mobilitäten: Die Proteine mit der geringsten Mobilität werden

vor den Folge-Ionen hergeschoben, was zu einer Vortrennung und Aufkonzentrierung der einzelnen Proteine führt (Brunelle and Green 2014). In dem Trenngel laufen kleinere Proteine schneller, während Proteine mit einem höheren Molekulargewicht länger benötigen. In dieser Arbeit wurde 10-prozentiges Polyacrylamid-Trenngel verwendet.

Das Proteinlysats wurde zu je 20 µl in die Taschen des Gels pipettiert. Um den Verlauf der Auftrennung visuell verfolgen zu können, wurde ein Größenstandard mitgeführt (*BLUEplus prestained protein ladder*). Für die Gelelektrophorese wurde vorerst eine Spannung von 80 V angelegt, welche im Anschluss, sobald das Trenngel erreicht worden ist, auf 120 V erhöht wurde.

Trenngellösung (pH 8,8)

375 mM Tris/HCl
0,1 % SDS (w/v)
10 % Rotiphorese Gel 30
100 µl APS (10 %)
20 µl TEMED

Sammelgellösung (pH 6,8)

125 mM Tris/HCl
0,1 % SDS (w/v)
4 % Rotiphorese Gel 30
100 µl APS (10 %)
20 µl TEMED

Ponceau S-Lösung

0,1 % Ponceau S (v/v)
5 % Essigsäure (v/v)

SDS-Laufpuffer

2,5 mM Tris/HCl
0,01 % SDS
19 mM Glycin

3.4.3 Western Blot

Im Anschluss an die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte die Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran. Für den Transfer wurde das *semi-dry* Verfahren angewendet (Towbin, Staehelin et al. 1979). Hierfür wurde das Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulosemembran gelegt und etwaige Luftblasen behutsam entfernt. Beides wurde auf ein mit Blotpuffer vorgetränktes Filterpapier gelegt und von einem weiteren getränkten Filterpapier abgedeckt. Für den Elektrottransfer wurde eine Stromstärke von 75 mA je Gel für etwa 2,5 h angelegt. Um den erfolgreichen Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran zu überprüfen, wurden die Proteine im Anschluss mit Ponceau S-Lösung reversibel angefärbt. Nach dem Entfärben mit *tris-buffered saline with tween* (TBST)-Lösung wurde die Membran in zwei Teile geschnitten, um diese später mit zwei verschiedenen Antikörpern (Zielprotein und Ladekontrolle) inkubieren zu können.

Anschließend wurde durch die Inkubation der Membranen in 5 % bovinem Serumalbumin (BSA) unspezifische Bindungsstellen blockiert. Die Verwendung spezifischer Antikörper für CIRP (Zielprotein) und ERK-1 (Ladekontrolle) führte zu einer Bindung der Antikörper an das jeweilige Epitop. Dieser Primärantikörper wurde nachfolgend durch mit Meerrettichperoxidase [engl. *horseradish peroxidase* (HRP)]-konjugierten Sekundärantikörper erkannt. Die Sichtbarmachung der Proteinbanden erfolgte durch Inkubation mit Luminol (S2-Lösung), was katalytisch durch die HRP unter Verbrauch von H_2O_2 (S1-Lösung) zu einer Chemolumineszenz führte, die mit einer hochsensitiven Kamera (ChemiSmart 5000) gemessen werden konnte. Um die Expression von CIRP beurteilen zu können, war die Verwendung einer Ladekontrolle unerlässlich. Hiermit konnte visuell überprüft werden, ob die gleiche Menge des Proteinlysats auf das Gel aufgebracht wurde. Als Ladekontrolle wurde ERK-1 verwendet, was unter den getesteten Bedingungen durch die Überexpression von CIRP in seiner Expression nicht verändert wurde.

Blot-Puffer

1,2 mM Tris
9,6 mM Glycin
1,7 mM SDS
1 % Methanol

TBST-Lösung (pH 7,4)

10 mM Tris/HCl
150 mM NaCl
0,05 % Tween (v/v)

S1-Lösung (pH 8,5)

0,1 M Tris/HCl
0,02 % H_2O_2

S2-Lösung (pH 8,5)

0,1 M Tris/HCl
1 % Luminol
400 μM 4-Hydroxymzimtsäure

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Transfektion

Um Fremd-DNA oder -RNA in eine Zelle einzubringen, gibt es verschiedene Methoden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Überexpression von CIRP oder Aequorin die cDNA mit TurboFect™ transfiziert. Um das endogen exprimierte CIRP abzuschalten, wurde *small interfering RNA* (siRNA) verwendet, die mittels Elektroporation in die Zelle gebracht wurde.

3.5.1.1 Transfektion mit TurboFect™

Bei TurboFect™ handelt es sich um eine Lösung kationischer Polymere, welche mit der negativ geladenen cDNA Komplexe bilden und über Endozytose in die Zelle aufgenommen werden. Die cDNA wird aus den Endosomen in das Zytoplasma freigesetzt. Nach Transport des cDNA-Stücks in den Zellkern, findet dort Transkription und nach dem Export zurück in das Zytoplasma Translation der Fremd-DNA statt.

Hierfür wurden 1×10^5 mHypoA-2/10- oder 2×10^5 HEK-293-Zellen auf 6-Well Mikrotiterplatten ausgesät und am nächsten Tag mit 1 – 4 µg CIRP-cDNA oder 4 µg pcDNA4-cDNA zur Kontrolle transfiziert. Dafür wurde die benötigte Menge in 100 µl serumfreien DMEM gelöst, mit der doppelten Menge TurboFect™ (in µl, also 2 µl bei 1 µg cDNA) versetzt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde diese Lösung vorsichtig tröpfchenweise zu den Zellen gegeben. Nach 16 – 24 h wurde ein Mediumwechsel auf serumfreies Medium durchgeführt.

Für die Transfektion von Aequorin wurde eine Zellkulturschale (100 cm²) mit 1×10^6 Zellen ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde eine Lösung aus 10 µg Aequorinplasmid und 20 µl TurboFect in 400 µl serumfreien DMEM 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend tröpfchenweise zu den Zellen gegeben. Nach 16 – 24 h wurde den Zellen das Serum durch einen Mediumwechsel entzogen.

3.5.1.2 Transfektion von siRNA mittels Elektroporation

Das Einbringen von siRNA in die Zelle ermöglicht es, durch RNA-Interferenz die Translation des Zielgens zu unterdrücken. Durch den Verlust des Proteins kann dessen Funktion und Einfluss in der Zelle untersucht werden. Intrazelluläre siRNA führt zu einer Interaktion mit *RNA-induced silencing complex* (RISC). Die siRNA wird dabei in die Einzelstränge getrennt und der codogene Strang bindet fest an RISC, während der andere degradiert wird. Die Bindung der siRNA an komplementäre Sequenzen auf der Ziel-mRNA aktiviert die enzymatische Aktivität von RISC und führt zu einem Zerschneiden des Transkripts (Meister, Landthaler et al. 2004). Als Kontrolle kommt eine zufällig generierte siRNA zum Einsatz, die keine im Genom vorhandene mRNA zum Ziel hat, sondern zur Studie unspezifischer Effekte der Transfektion verwendet wird. Die siRNA wird mittels eines kurzen elektrischen Impulses mit hoher Feldstärke in die Zelle gebracht. Dieser Impuls führt zu einer kurzzeitigen Störung der Membranintegrität,

wodurch die siRNA in das Zytoplasma gelangt (Tsong 1991). Die Elektroporation mit dem Neon™ Elektroporationsgerät erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers. Die Elektroporationsbedingungen für eine effiziente Transfektion von mHypoA-2/10-Zellen sind zuvor bereits optimiert worden (Glas, Mückter et al. 2016).

Für die Elektroporation von CIRP-siRNA wurde zunächst die gewünschte Menge mHypoA-2/10-CREB-Zellen mit 500 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl Resuspensionspuffer R (ThermoFisher, Waltham) je 5×10^5 Zellen resuspendiert. 50 nM in Puffer verdünnte CIRP-siRNA wurde hinzugegeben und mit einer Spannung von 1450 V für 30 ms in einem Puls elektroporiert. Im Anschluss wurden die Zellen in antibiotikafreiem Wachstumsmedium resuspendiert und 2×10^5 oder 1×10^5 Zellen auf 6-Well bzw. 12-Well Mikrotiterplatten ausgesät. Nach 16 – 24 h erfolgte ein Mediumwechsel auf serumfreies Medium. Anschließend wurden die Zellen verwendet, um Proteinlysate zu gewinnen (6-Well) oder um die CREB-abhängige Reporteraktivität zu bestimmen (12-Well).

3.5.1.3 Herstellung stabil exprimierender Zellen

Die stabile Integration eines Reportergenkonstrukts in die gewünschte Zelle führt einerseits zu einer Vereinfachung der Experimente und andererseits zu einer deutlichen Zeitersparnis. Für diese Arbeit wurden mHypoA-2/10-Zellen mit dem TRH-Reportergenkonstrukt transfiziert (siehe Kapitel 2.3.2). Hierfür wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen auf eine 100 cm²-Zellkulturschale ausgesät und mit dem prepro-TRH-Luc-Reportergenkonstrukt und einem leeren pcDNA4-Vektor im Verhältnis 2 zu 1 co-transfiziert. Der pcDNA4-Vektor enthält das Resistenzgen gegen das Antibiotikum Zeocin und zusätzlich noch den Replikationsursprung (engl. *origin of replication*). Die Transfektion erfolgte gemäß der vorherigen Beschreibung mittels TurboFect™. Nach der Transfektion wurden die Zellen mit 600 µg/ml Zeocin für 3 Wochen und für 2 weitere Wochen mit 200 µg/ml Zeocin selektioniert. Die Zellen, die die Zeocinbehandlung überlebten, wurden weiter kultiviert und für die Versuche verwendet. Außerdem wurden im Rahmen dieser Arbeit HEK-293-Zellen mit dem 6xCRE-Luc-Reportergenkonstrukt transfiziert. Hierfür wurde eine 100 cm²-Zellkulturschale mit 5×10^5 Zellen ausgesät und am nächsten Tag mit dem 6xCRE-Plasmid (3 µg) sowie einem leeren pcDNA4-Vektor (1 µg) co-transfiziert. Die Selektion erfolgte wie oben beschrieben.

3.5.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Nur wenige Bakterien sind von Natur aus in der Lage, frei vorhandene DNA aufzunehmen. Dies wird als natürliche Kompetenz bezeichnet. So zeigt beispielsweise *Streptococcus pneumoniae* natürliche Kompetenz (Griffith 1928). Andere Bakterien, wie der hier verwendete *E. coli*-Bakterienstamm DH5 α , können der Methode nach Hanahan folgend, kompetent gemacht werden (Hanahan 1983). Hierbei wird die Permeabilität der Bakterien für Fremd-DNA erhöht.

Für die Herstellung chemisch kompetenter Bakterien wurden *E. coli*-Bakterien in 1 ml Nährmedium [engl. *lysogenic growth* (LB)]-Medium gegeben. Am darauffolgenden Tag wurden 10 μ l der Bakteriensuspension in 100 ml LB-Medium verdünnt und im Inkubationsschüttler bei 37 °C über Nacht inkubiert, bis die OD bei 600 nm etwa 0,5 – 0,7 betrug. Durch die sich anschließende Zentrifugation bei 4 °C mit 200 x g für 10 min wurden die Bakterien sedimentiert und konnten in 20 ml eiskalten *transformation buffer for frozen storage of competent cells* (FSP) aufgenommen und resuspendiert werden. Nach erneuter Zentrifugation (siehe oben) wurden die Zellen in 4 ml FSP mit 150 μ l DMSO resuspendiert. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurden erneut 150 μ l DMSO zugesetzt. Bevor die kompetenten Bakterien aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden, wurden sie noch 10 min auf Eis gekühlt. Die Bakterien wurden bis zu ihrer Verwendung bei - 80 °C aufbewahrt.

| <u>LB-Medium</u> | <u>LB/GM-Medium</u> | <u>FSP (pH 6,4)</u> |
|-------------------------|-------------------------|--|
| 85,5 mM NaCl | LB-Medium | 10 mM Kaliumacetat |
| 0,5 mM NaOH | 110 mM Glukose | 45 mM MnCl ₂ |
| 1 % Trypton/Pepton | 20 mM MgSO ₄ | 10 mM CaCl ₂ |
| 0,5 % Hefeextrakt (w/v) | | 100 mM KCl |
| | | 10 % Glycerin (v/v) |
| | | 3 mM Co(NH ₃) ₆ Cl ₃ |

3.5.3 Transformation kompetenter Bakterien durch Hitzeschock

Durch Transformation wird Plasmid-DNA in die zuvor kompetent gemachten Bakterienzellen eingebracht. Der kurzzeitige Hitzeschock führt zur Störung der Zellmembran-Integrität, sodass die Plasmid-DNA die Barriere überwinden und in die

Zelle diffundieren kann (Hanahan 1983). Auf DNA-Abschnitten in der Plasmid-DNA ist ein Resistenzgen für Ampicillin enthalten, weshalb damit selektioniert werden kann.

100 µl der kompetenten Bakterien wurden hierfür auf Eis langsam aufgetaut, mit etwa 2,5 ng der Plasmid-DNA versetzt und für weitere 30 min inkubiert. Im Anschluss wurde der Hitzeschock durch Erwärmen auf 42 °C für 90 s realisiert und danach wieder für 5 min auf Eis inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde auf Agarplatten, welche mit 50 µg/ml Ampicillin hergestellt worden sind, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Für die Vorkultur wurde am nächsten Tag ein Bakterienklon isoliert und zu 2 ml LB-Medium mit Zusatz des Antibiotikums gegeben und erneut über Nacht bei 37 °C, unter Schütteln, inkubiert. Durch Überführen von 200 µl der Suspension zu 200 ml antibiotikahaltigen LB-Medium, wurde die Hauptkultur angesetzt. Auch diese wurde über Nacht bei 37 °C im Bakterieneschüttler inkubiert.

3.5.4 Plasmidisolation

Zur Isolation des im Bakterium vermehrten Plasmids wurde das *„NucleoBond Xtra Midi kit for transfection-grade plasmid DNA“* (Macherey-Nagel) verwendet. Die Extraktion und Aufreinigung des Plasmids wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt. Hierfür wurden 200 ml der Bakteriensuspension mit einer OD bei 600 nm von etwa 2 zunächst mit 5000 x g 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden erst in 8 ml Resuspensionspuffer aufgenommen und anschließend mit dem gleichen Volumen Lysispuffer versetzt. Die Zelllyse wurde durch mehrmaliges Invertieren des Gefäßes beschleunigt. Nach 5 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde durch Zugabe gleichen Volumens Neutralisationspuffer die Bakteriensuspension neutralisiert. Die *„NucleoBond Xtra“-*Säule wurde mit 12 ml Äquilibrierungspuffer gewaschen und anschließend das Bakteriumlysat auf den Filter gegeben. Der Filter wurde mit 5 ml Äquilibrierungspuffer gewaschen, entfernt und die Säule mit 8 ml Waschpuffer gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde im Anschluss mit 5 ml Elutionspuffer eluiert, sowie mittels des *„NucleoBond Finalizers“* aufkonzentriert und gereinigt. Hierfür wurde die DNA mit 3,5 ml 100-prozentigen Isopropanol präzipitiert. Nach 2 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der *„NucleoBond Finalizer“* damit beladen, mit 2 ml 70-prozentigen Ethanol gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Die Elution erfolgte mit 600 µl Tris/EDTA-Puffer (IDTE, Coralville). Die Konzentration und

Reinheit der isolierten Plasmid-DNA wurde photometrisch bestimmt (siehe Kapitel 3.2.2.2). Bis zur Verwendung wurde die Plasmid-DNA bei - 20 °C eingefroren.

3.6 Graphische Auswertung der Messergebnisse

Dieser Abschnitt soll dazu dienen, die in der vorliegenden Arbeit notwendigen Schritte, von der Ausgabe der unverarbeiteten Messwerte bis hin zur graphischen Präsentation der teilweise normierten Ergebnisse, eindeutig nachvollziehen zu können.

3.6.1 Allgemeines

Im Rahmen der Arbeit wurde folgendes Farbschema in den Abbildungen angewendet: **Rot** für Temperaturen von **38 °C** oder **38,5 °C**; **Blau** für **36 °C** oder **35,5 °C**; Schwarz für **37 °C**.

Die erhaltenen Messwerte wurden direkt in GraphPad Prism® 9.1 graphisch ausgewertet und statistisch analysiert. Hierfür wurden zunächst die Rohwerte der Einzelmessung dargestellt und geeignete statistische Tests angewendet, um zu überprüfen, ob signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Bedingungen vorlagen. War dies für die Einzelexperimente der Fall, wurden alle Rohwerte der Einzelexperimente in einer Abbildung dargestellt und erneut geeigneten statistischen Tests unterzogen. Häufig konnte durch Normierung der Einzelexperimente eine exaktere Darstellung der Ergebnisse erreicht werden. Die Normierung erlaubte beispielsweise Experimente, die an verschiedenen Tagen durchgeführt wurden, miteinander vergleichbar zu machen. So konnten experimentell bedingte und nicht vermeidbare Unterschiede an den einzelnen Versuchstagen korrigiert werden.

3.6.2 Normierung auf 37 °C

Luciferaseaktivität

Wurde die Luciferaseaktivität über einen bestimmten Zeitraum gemessen, ließen sich die Rohdaten wie in Abb. 7A gezeigt, darstellen. Hierfür wurden die im jeweiligen Einzelexperiment erhaltenen Messwerte bei 36, 37 und 38 °C als Summe in einer Abbildung dargestellt. Da immer ein Inkubator bei 37 °C im Verlauf des Experiments verblieb, konnten experimentell bedingte und nicht vermeidbare Unterschiede in den

einzelnen Versuchsansätzen durch die Normierung der Messwerte der 36 °C- oder der 38 °C-Inkubation auf die 37 °C-Kontrollinkubation korrigiert werden.

$$\% \text{ von } 37\text{ °C} = \frac{\text{Rohdaten } 36 \text{ oder } 38\text{ °C}}{\text{Mittelwert } 37\text{ °C}} \times 100\%$$

Hierfür wurden die im Einzelexperiment erhaltenen Messwerte nach 2, 4 oder 8 h bei 37 °C zu 100 % gesetzt. Die dazu korrespondierenden bei 36 oder 38 °C erhaltenen Messwerte wurden dazu in das Verhältnis gesetzt und als Prozent ausgedrückt (Abb. 7B). Alle in den Einzelexperimenten normierten Daten wurden schließlich wieder in einer Abbildung dargestellt und zeigen somit Daten aus mindestens drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten mit mindestens Triplikaten der jeweiligen Einzelexperimente. (siehe Abb. 7B).

Es wurde analog verfahren, wenn die Luciferaseaktivität nach 4 h Inkubation bei Temperaturen zwischen 35,5 und 38,5 °C im Vergleich zu einer 37 °C-Kontrollinkubation bewertet wurde (siehe Abb. 19).

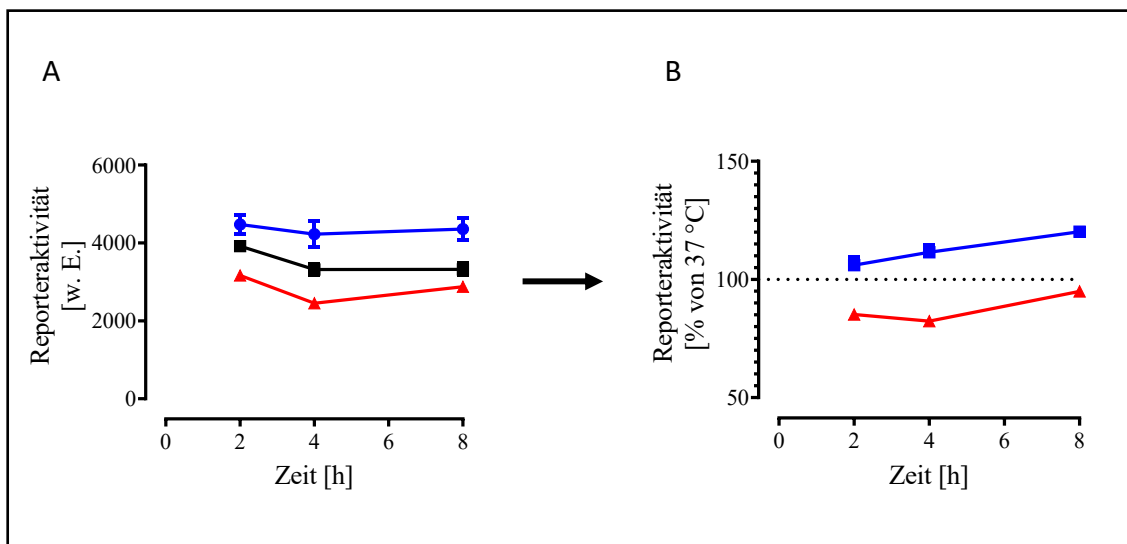


Abb. 7: Schematische Darstellung der Datenverarbeitung nach einer Luciferasemessung nach 2, 4 und 8 h bei 36, 37 und 38 °C

(A) Es ist die Summe der Rohdaten aus den Einzelexperimente dargestellt. (B) Es ist die Normierung der Messwerte auf die jeweiligen 37 °C-Messwerte gezeigt. Hierfür wurden die bei 37 °C erhaltenen Messwerte zu 100 % gesetzt (siehe Fließtext). Zur besseren Übersichtlichkeit wird auf die Kennzeichnung der Signifikanzniveaus bei den Rohdaten verzichtet.

cAMP-Akkumulation:

Auch bei der Bestimmung des zellulären cAMP-Spiegels kam die oben erläuterte Normierung auf 37 °C zum Tragen. Hier wurden die Messwerte des Einzelexperiments bei 37 °C ebenso zu 100 % gesetzt und die bei 36 oder 38 °C erhaltenen Werte entsprechend normiert.

3.6.3 Berechnung der induzierten Aktivität und der Normierung auf 38 °CLuciferaseaktivität:

Sollte nach einer Stimulierung der Zellen mit beispielsweise NA die induzierte Reporteraktivität bestimmt werden, wurden die Rohwerte der Einzelmessung auf den Basalwert normiert. Hierfür wurde die x-fache Reporteraktivierung über den Basalwert errechnet, was der induzierten Aktivität entspricht (Von Abb. 8A nach Abb. 8B).

$$\text{Induzierte Aktivität} = \frac{\text{Rohwerte Stimulierung}}{\text{Mittelwert der Rohwerte des Basalwerts}} - 1$$

Die bei 36 oder 38 °C erhaltenen Messwerte nach Stimulierung mit NA wurden dividiert durch den Mittelwert der Basalwerte (ohne NA). Davon wurde schließlich 1 abgezogen. Anhand dieser Normierung wurden Temperatureffekte, die sich auf den Basalwert auswirken, berücksichtigt, so dass die durch NA vermittelten Effekte dargestellt konnten werden.

Sollte der Liganden-induzierte Temperatureffekt dargestellt werden, wurde ausgehend von der x-fachen Reporteraktivität über dem Basalwert auf 38 °C normiert (Von Abb. 8B nach Abb. 8D).

$$\% \text{ von } 38^\circ\text{C (induziert)} = \frac{\text{Induzierte Akt. bei } 36^\circ\text{C}}{\text{Mittelwert der induzierten Akt. bei } 38^\circ\text{C}} \times 100 \%$$

Hierfür wurde die induzierte Reporteraktivität (Akt.) bei 36 °C durch den Durchschnitt der x-fachen Reporteraktivierung bei 38 °C dividiert, mit 100 multipliziert und somit als Prozentwert ausgedrückt. Anhand dieser Normierung konnte somit der Temperatureffekt des Liganden, unabhängig von möglichen Temperatureffekten auf den Basalwert, dargestellt werden.

Wenn allerdings der Einfluss der Temperatur auf die basale Reporteraktivität dargestellt werden sollte, wurden die Rohwerte der Einzelmessung auf 38 °C normiert (Von Abb. 8A nach Abb. 8C).

$$\% \text{ von } 38\text{ °C} = \frac{\text{Rohwerte } 36\text{ °C}}{\text{Mittelwert } 38\text{ °C}} \times 100\%$$

Hierfür wurden die erhaltenen Rohwerte bei 36 °C jeweils durch den Mittelwert der Rohdaten bei 38 °C dividiert, mit 100 multipliziert und als Prozent ausgedrückt.

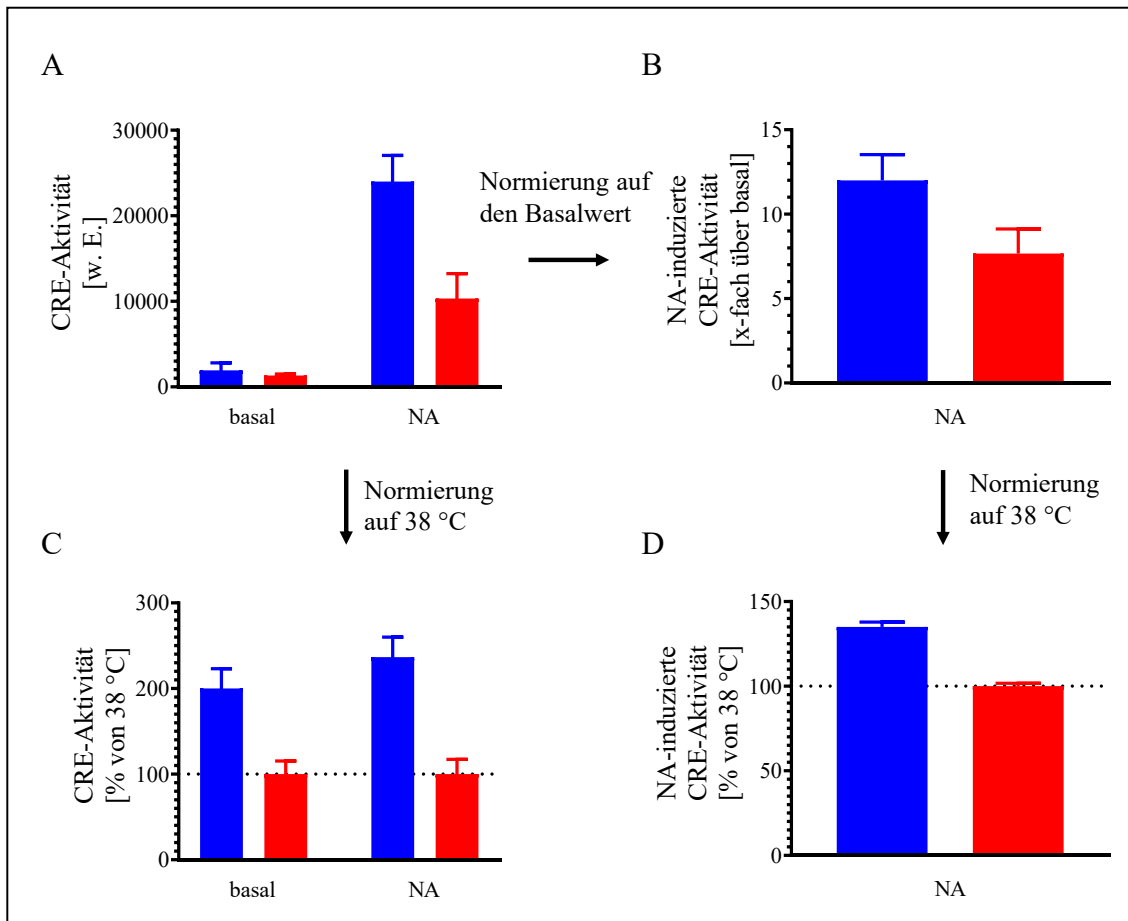


Abb. 8: Schematische Darstellung der Datenverarbeitung nach einer Luciferasemessung bei 36 und 38 °C

Hierfür wurden Zellen bei 36 und 38 °C mit NA stimuliert und die basale und NA-induzierte Reporteraktivität bestimmt. (A) Die gemessenen Rohdaten sind in w. E. dargestellt. (B) Darstellung der x-fachen Reporteraktivität über dem Basalwert. (C) Darstellung der auf 38 °C normierten Messwerte. In D ist die x-fache Reporteraktivität normiert auf 38 °C abgebildet. Erläuterungen siehe Fließtext.

cAMP-Akkumulation:

Diese Normierungen wurden ebenso bei der Bestimmung der Liganden-induzierten cAMP-Akkumulation durchgeführt.

Ca²⁺-Konzentration:

Bei der Bestimmung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration mittels Aequorin, wurde die Lumineszenz vor der Injektion des Substrats als Basalwert definiert und die danach erhaltenen Messwerte dazu in das Verhältnis gesetzt. Die induzierte Ca²⁺-Konzentration wurde somit als x-faches über dem Basalwert angegeben.

Alle in den Einzelexperimenten normierten Daten wurden schließlich wieder in einer Abbildung dargestellt und zeigen somit Daten aus mindestens drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten mit mindestens Triplikaten.

3.6.4 Verwendung von Inhibitoren

Sollte die Wirkung von Inhibitoren auf die temperaturabhängige Reporteraktivität gezeigt werden, wurde durch die Normierung der bei 38,5 °C erhaltenen Messwerte (Abb. 9A) auf 100 % zunächst der Temperatureffekt der Kontrolle und der Inkubation mit dem verwendeten Inhibitor dargestellt.

$$\% \text{ von } 38,5 \text{ }^{\circ}\text{C} = \frac{\text{Rohdaten } 35,5 \text{ }^{\circ}\text{C}}{\text{Mittelwert } 38,5 \text{ }^{\circ}\text{C}} \times 100 \%$$

Hierfür wurden die im Einzelexperiment erhaltenen Messwerte der Inkubation bei 35,5 °C durch den Mittelwert der bei 38,5 °C erhaltenen Messwerte dividiert und in Prozent ausgedrückt. In Abb. 9B lässt sich erkennen, dass der Temperatureffekt knapp 300 % beträgt, wohingegen der Einsatz des Inhibitors zu einem stark reduzierten Temperatureffekt auf etwas über 100 % führte. Die so normierten Daten der Einzelexperimente wurden schließlich in einer Abbildung dargestellt. Die Inhibition des Temperatureffekts drückt damit aus, dass der Einsatz des Inhibitors zu einer Reduktion des temperaturbedingten Unterschieds in der Reporteraktivität zwischen 36 und 38 °C führt (vgl. Abb. 9A Inhibitor).

Um die Verringerung des Temperatureffekts durch den verwendeten Inhibitor auszudrücken, wurde ausgehend von den Rohwerten der Einzelexperimente zunächst die

Differenz der Reporteraktivität bei 35,5 und 38,5 °C mit und ohne Inhibitor bestimmt. Anschließend wurde der prozentuale Anteil, um den der Unterschied zwischen den Temperaturen durch die Verwendung des Inhibitors verringert wurde, berechnet.

$$Inhibition [\%] = \left[1 - \frac{35,5\text{ °C} - 38,5\text{ °C (Inhibitor)}}{35,5\text{ °C} - 38,5\text{ °C (Kontrolle)}} \right] \times 100\%$$

Alle in den Einzelexperimenten normierten Daten wurden schließlich wieder in einer Abbildung dargestellt und zeigen somit Daten aus mindestens drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten mit jeweils mindestens Triplikaten.

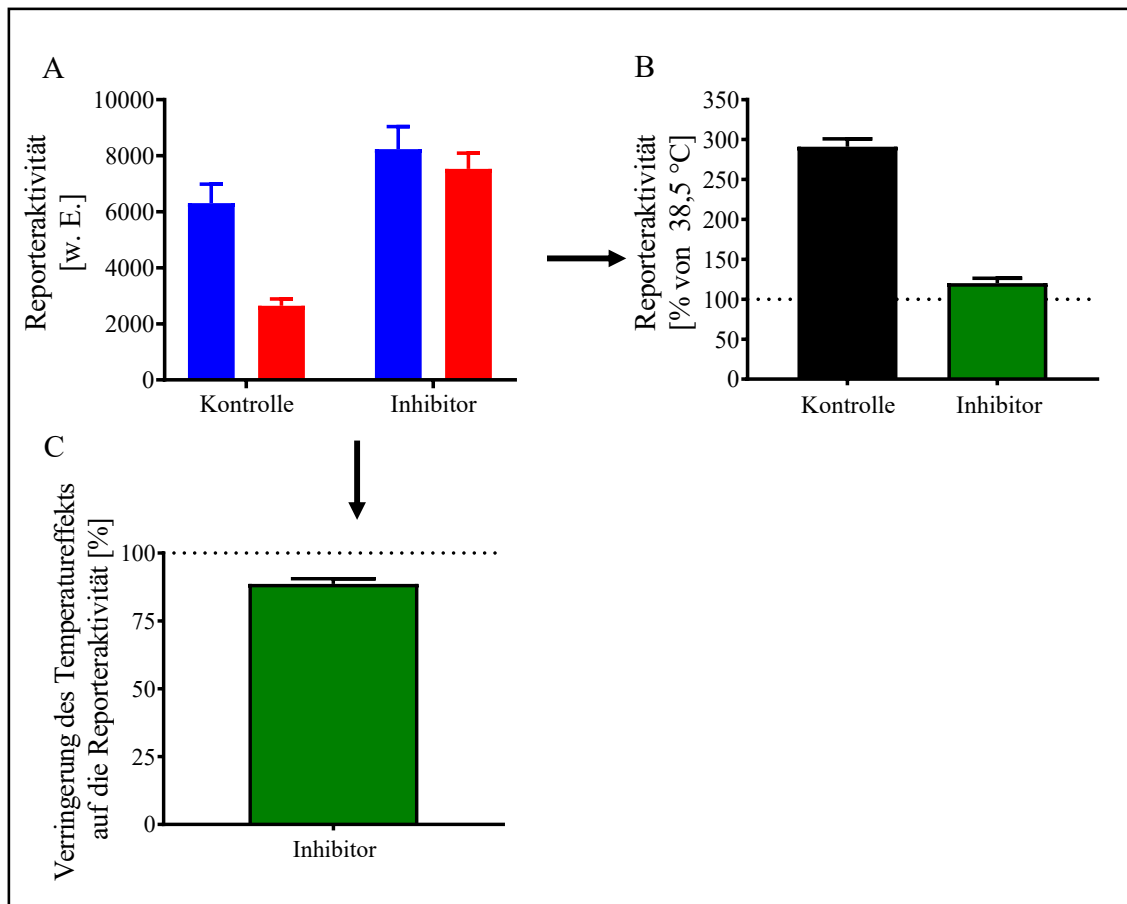


Abb. 9: Schematische Darstellung der Datenverarbeitung nach einer Luciferasemessung bei 35,5 und 38,5 °C mit der Verwendung eines Inhibitors

Hierfür wurden Zellen mit und ohne Inhibitor vorbehandelt und anschließend die temperaturabhängige Reporteraktivität bestimmt. (A) Hier ist die Summe der Rohdaten der Einzelexperimente dargestellt. (B) Die Normierung der Messwerte auf 38,5 °C ist dargestellt. (C) Die prozentuale Verringerung des Temperatureffekts auf die Reporteraktivität ist präsentiert. Eine genaue Herleitung der Normierungen findet sich im Fließtext.

3.6.5 Normierung der Daten aus der Dosis-Wirkungs-Kurve

In Abb. 10 ist die induzierte cAMP-Akkumulation in Abhängigkeit von der Agonisten-Konzentration bei 36 und 38 °C beispielhaft dargestellt. Die Normierung der Rohdaten aus Abb. 10A erfolgte, um den Temperatureffekt in Prozent darstellen zu können. Hierfür wurden die in dem Einzelexperiment erhaltenen Messwerte, die der maximalen Aktivierung bei 38 °C entsprachen, zu 100 % gesetzt. Alle anderen Messwerte wurden in das Verhältnis dazu gesetzt und in Prozent ausgedrückt.

$$\text{von } 38\text{ }^{\circ}\text{C top} = \frac{\text{Rohdaten}}{\text{Mittelwert Rohdaten (38 }^{\circ}\text{C top)}} \times 100\%$$

Alle in den Einzelexperimenten normierten Daten wurden erneut in einer Abbildung dargestellt und zeigen Daten aus mindestens drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten, mit jeweils mindestens Triplikaten.

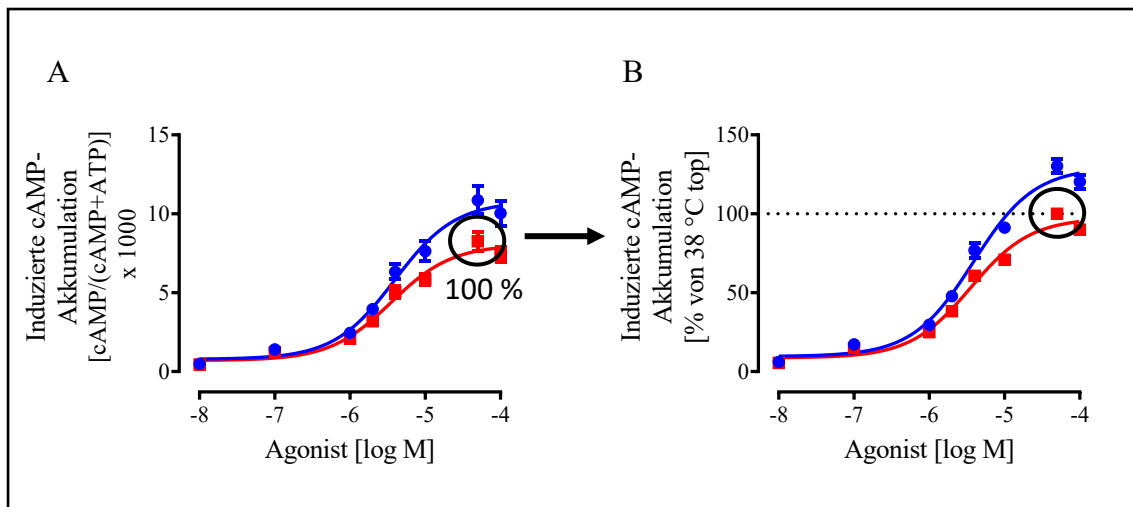


Abb. 10: Schematische Darstellung der Datenverarbeitung nach Bestimmung der Agonisten-induzierten cAMP-Akkumulation bei 36 °C und 38 °C

Zellen wurden hierfür 1 h mit einer Lösung des Agonisten in der angegebenen Konzentration inkubiert und die cAMP-Akkumulation bestimmt. (A) Es sind die gemessenen Rohdaten als ratio präsentiert (siehe Kapitel 3.3.2). (B) Normierung der Messwerte auf den bei 38 °C gemessenen Maximalwert (top) in Prozent. Die Erklärungen hierzu sind im Fließtext zu finden.

3.6.6 mRNA-Expression mittels qRT-PCR

Die durch den LightCycler® berechneten C_t -Werte des Zielgens wurden auf das Haushaltsgen normiert. Hierfür wurde die Differenz aus den gemessenen C_t -Werten des

Zielgens und des Mittelwerts des Referenzgens (gapdh) gebildet. Das Ergebnis wurde als Exponent zur Basis 0,5 gesetzt.

$$\text{Zielgen (normiert)} = 0,5^{C_t(\text{Zielgen}) - C_t(\text{Mittelwert des Referenzgens})}$$

Diese Normierung erlaubte mögliche Variationen in der cDNA-Menge zu berücksichtigen.

3.6.7 Berechnung der Ligandenbindung

Die durch Flüssigszintillation erhaltenen Messwerte wurden zunächst direkt in DPM ausgegeben. Um eine bessere Vergleichbarkeit zu bereits veröffentlichten Daten zu erreichen, wurden die gemessenen DPM mittels nachfolgender Formel in die Stoffmenge gebundenen ^{125}I -CYPs je mg Protein der Membranpräparation umgerechnet (fmol/mg).

$$\left[\frac{\text{fmol}}{\text{mg}} \right] = \frac{[\text{DPM}] \times 4,15 \times 10^{-13} \left[\frac{\text{Ci}}{\text{DPM}} \right]}{2175 \frac{\text{Ci}}{\text{mmol}}} \times 10^{12} : \text{Membranmenge [mg]}$$

Zunächst wurde die gemessene Aktivität (DPM) in Ci umgewandelt, wofür mit $4,15 \times 10^{-13}$ multipliziert wurde. Anschließend wurde die Stoffmenge bestimmt, indem durch die spezifische Aktivität des Radionuklids (^{125}I) dividiert wurde. Schließlich wurde die erhaltene Stoffmenge in mmol mit 1×10^{12} multipliziert (um in fmol umzurechnen) und der Term durch die eingesetzte Membranmenge in mg dividiert.

3.6.8 Berechnung der hochaffinen Bindestelle

Zur Berechnung der Gpp(NH)p-induzierten Reduktion der hochaffinen Bindestelle wurden in GraphPad 9.1 eine nicht-lineare Regression mit den Parametern *binding - competitive, two-sites - fit logIC₅₀* durchgeführt. Der Anteil der hochaffinen Bindestelle (*fraction high*) mit Gpp(NH)p wurde von der ohne Gpp(NH)p abgezogen und in das Verhältnis zu der ohne Gpp(NH)p gesetzt. Anschließend wurde dies mit 100 multipliziert und als Prozent ausgedrückt.

$$\text{Reduktion} = \frac{\text{ohne Gpp(NH)p} - \text{mit Gpp(NH)p}}{\text{ohne Gpp(NH)p}} \times 100 \%$$

3.6.9 Endozytoserate

Nach dem Stoppen der Reaktion und dem Auftrennen gebundener und freier Aktivität, konnte nach folgender Formel die Rezeptorendozytose berechnet werden:

$$\left[\text{basal} \left(\frac{{}^{125}\text{I-CYP} - \text{CGP1277}}{{}^{125}\text{I-CYP} - \text{Propranolol}} \right) - \text{stim.} \left(\frac{{}^{125}\text{I-CYP} - \text{CGP1277}}{{}^{125}\text{I-CYP} - \text{Propranolol}} \right) \right] \times 100 \%$$

Die Differenz aus der totalen Bindung (¹²⁵I-CYP) und der Bindung von CGP1277 an die Membranen ergab die Rezeptormenge, die an der Oberfläche exprimiert wurde. Die Differenz aus ¹²⁵I-CYP und Propranolol entsprach der gesamten Rezeptorexpression, unabhängig von der Lokalisierung (spezifische Bindung). Der Quotient daraus ergab den Anteil der Oberflächenexpression an der gesamten Rezeptorexpression für den basalen (basal) und mit NA-vorinkubierten (stim.) Zustand. Die Differenz in Prozent ergab somit die Endozytoserate. Der Vergleich zwischen Zellen, die bei 36 und 38 °C stimuliert worden sind, ermöglichte es, den Einfluss der Temperatur auf die Endozytoserate zu bewerten.

Die Herunterregulierung des Rezeptors konnte hiermit ebenso berechnet werden. Hierfür wurde die Verringerung der spezifischen Bindung berechnet. Dies wurde für Zellen durchgeführt, die mit NA vorstimuliert wurden, und für Zellen, die parallel unter basalen Bedingungen inkubiert worden waren.

$$\left[1 - \frac{NA \left({}^{125}\text{I-CYP} - \text{Propranolol} \right)}{\text{basal} \left({}^{125}\text{I-CYP} - \text{Propranolol} \right)} \right] \times 100 \%$$

Die spezifische Bindung der NA-vorstimulierten Fraktion wurde durch die spezifische Bindung der basalen Bedingung dividiert. Dies wurde von 1 abgezogen und in Prozent ausgedrückt. Hieraus ergab sich dann schließlich der NA-induzierte Rezeptorabbau.

3.6.10 Phosphodiesteraseaktivität

Die Messung der Phosphodiesteraseaktivität erfolgte durch die Bestimmung des nicht-abgebauten ${}^3\text{H-cAMP}$. Die so erhaltenen Rohwerte konnten auf das nach der Säulenchromatographie wiedergefundene ${}^3\text{H-cAMP}$, welches ohne Zellsuspension inkubiert wurde, normiert werden. Hierfür wurde dieser Anteil zu 100 % gesetzt und die mit Zellsuspension inkubierten Proben dazu in das Verhältnis gesetzt.

$$\% \text{ von gesamt} = \frac{{}^3\text{H-cAMP (mit Zellsuspension)}}{{}^3\text{H-cAMP (ohne Zellsuspension)}} \times 100 \%$$

Der prozentuale Abbau konnte schließlich durch die Bildung der Differenz aus 100 % und „% von gesamt“ berechnet werden.

3.7 Statistische Methoden

In dieser Arbeit wurden die Experimente stets mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die jeweilige Anzahl kann der Abbildungsbeschriftung entnommen werden. In den Einzelexperimenten wurden je Versuchsbedingung mindestens drei Werte gemessen, aus denen der Mittelwert und dessen Standardfehler [engl. *standard error of the mean* (SEM)] berechnet wurde.

Es wurden unterschiedliche geeignete statistische Hypothesentests verwendet, die durch das Programm GraphPad Prism 9.1 kalkuliert wurden. Zur Validierung statistischer Zusammenhänge wurden vier Signifikanzniveaus verwendet und folgendermaßen dargestellt: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ und **** $p \leq 0,0001$. Um signifikante Unterschiede zwischen zwei Bedingungen oder Versuchsgruppen festzustellen, wurde zunächst mit geeigneten Tests, die in GraphPad Prism 9.1 durchgeführt wurden, überprüft, ob die Ergebnisse normalverteilt waren. Dann wurde ein ungepaarter Zweistichproben-t-Test durchgeführt. Um Unterschiede zwischen mehr als zwei Gruppen zu testen, wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse [engl. *one-way analysis of variance* (ANOVA)] mit anschließendem *post-hoc* Test nach Tukey durchgeführt. Dies wurde auch gemacht, wenn mehrere Bedingungen gegen eine Kontrollbedingung verglichen wurden. Wurden mehr als zwei Gruppen, die durch eine Bedingung (beispielsweise Temperatur) miteinander verbunden waren, getestet, wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (*two-way* ANOVA), ebenso mit anschließendem *post-hoc* Test nach Tukey, durchgeführt. Sollte getestet werden, ob sich eine Stichprobe signifikant von einem hypothetischen Wert, beispielsweise 0 oder 100, unterschied, wurde ein Einstichproben-t-Test angewendet. Statistische Tests auf normierte Messergebnisse wurden nur nach Prüfung der Rohwerte auf statistische Signifikanz durchgeführt.

4. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde das murine hypothalamische Zellmodell mHypoA-2/10 verwendet, um Effekte von geringen Temperaturänderungen auf Signalweiterleitung und Genexpression zu untersuchen. Die physiologische Körpertemperatur in Mäusen kann im Tagesverlauf etwa zwischen 35,5 und 38,5 °C oszillieren (Refinetti 2010). Innerhalb dieser Grenzen wurden die Zellen Temperaturänderungen ausgesetzt und die daraus resultierenden zellulären Veränderungen untersucht.

4.1 Etablierung der Temperaturinkubatoren und -programme

Die verwendeten Temperaturinkubatoren (Friocell FC 22) konnten aufgrund des Peltier-Elements mit einer Genauigkeit von $\pm 0,1$ °C sowohl aktiv heizen als auch kühlen. Wegen des kleinen Inkubationsvolumens (22 l) wurde schnell eine homogene Temperaturverteilung erreicht. Die üblich verwendeten Zellkulturmedien enthalten zwischen 1,5 und 3,7 g/l Natriumbikarbonat (NaHCO_3), welches mit der CO_2 -Atmosphäre eines Inkubators im Gleichgewicht steht und das Puffersystem des Mediums ausbildet (Arora 2013). In die verwendeten Inkubatoren konnte aus technischen Gründen kein CO_2 eingespeist werden, weshalb sie unter normaler Atmosphäre betrieben wurden. In dieser Raumluft beträgt die CO_2 -Konzentration nur etwa 0,04 % (Hunter 2007). Die Verwendung des üblichen Zellkulturmediums unterhalb der empfohlenen CO_2 -Konzentration von 5 – 10 %, führt nach kürzester Zeit zu einer starken Alkalisierung des Zellkulturmediums durch Entweichen des gelösten CO_2 . Schon eine dreistündige Inkubation führte zu einem Anstieg des pH-Werts im Medium von 7,2 auf etwa 8,5 (Daten nicht gezeigt), was im Vergleich zu dem empfohlenen pH-Wert von 7,4 deutlich zu hoch war (Michl, Park et al. 2019). Die zusätzliche Supplementierung von 25 mM HEPES konnte eine Verschiebung des pH-Werts in den alkalischen Bereich nicht verhindern, weshalb NaHCO_3 -freies Medium verwendet wurde. Nun war der Zusatz von 25 mM HEPES ausreichend, um über eine Inkubationsdauer von bis zu 24 h den pH-Wert im Bereich zwischen 7,2 und 7,6 stabil zu halten (Daten nicht gezeigt). Abgesehen von diesen Modifikationen entsprach das verwendete Medium der Formulierung von *Dulbeccos Modified Eagles Medium* (DMEM) und wird in dieser Arbeit als ‚Spezialmedium‘ (SM) bezeichnet.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob Temperaturänderungen zwischen 35,5 und 38,5 °C einen Einfluss auf zelluläre Prozesse nehmen können. Außerdem sollte erläutert werden, ob es sich um direkt temperaturabhängige Prozesse handelt, oder ob circadiane Effekte eine Rolle spielen. Dafür wurden zwei verschiedene Temperaturprogramme entwickelt.

4.1.1 Akutes Programm (AP)

Im akuten Programm (AP) lassen sich direkte Einflüsse der Temperatur studieren. In Abb. 11A ist das verwendete Inkubations-Temperaturprogramm schematisch dargestellt. Die Zellen wurden hier 16 – 24 h nach dem Aussäen und einem Mediumwechsel auf serumfreies SM in den Temperaturschränken inkubiert. Nach 14 h bei 37 °C reduzierte ein Inkubator innerhalb von 30 min die Temperatur automatisch auf 36 °C, während der andere Inkubator die Temperatur zeitgleich auf 38 °C erhöhte. War die jeweilige Temperatur erreicht, verblieben die Zellen dort für bis zu 8 h. Im AP fand somit lediglich eine einzige Temperaturänderung statt.

4.1.2 Circadianes Programm (CP)

Im circadianen Programm (CP) lassen sich neben direkten Einflüssen der Temperatur, wie sie ebenso im AP beobachtet werden können, auch Einflüsse vorangegangener Temperaturänderungen im Tagesverlauf studieren.

In Abb. 11B ist das CP schematisch dargestellt. Die Zellen wurden hierfür ebenso 16 – 24 h nach dem Aussäen nach einem Mediumwechsel auf serumfreies SM in den Temperaturschränken inkubiert. Im CP wurde bereits nach 2 h die Temperatur innerhalb von 30 min auf entweder 36 °C reduziert oder auf 38 °C angehoben. Nach 11 h bei der jeweiligen Temperatur erfuhren die Zellen erneut eine Temperaturänderung. Die Temperatur der Inkubatoren wurde auf die jeweils andere Temperatur eingestellt. Betrug die Temperatur zuvor 36 °C wurde sie auf 38 °C erhöht und umgekehrt. Die Zellen verblieben auch hier anschließend für bis zu 8 h. Im CP fanden somit insgesamt zwei Temperaturänderungen statt, damit simuliert das CP die physiologische, circadiane Körpertemperaturänderung.

Der Vergleich beider Programme sollte es ermöglichen, eine Aussage zu treffen, ob eine direkte Änderung der Temperatur oder die circadiane, periodische Oszillation einen

Einfluss auf die Zellantwort nimmt. Abgesehen von der ‚Temperaturvorgeschichte‘, wurden alle Variablen zwischen den Programmen konstant gehalten. Bestand also ein Unterschied zwischen dem AP und dem CP hinsichtlich der untersuchten Messgröße, so ließ sich dieser auf den ersten Temperaturstimulus zurückführen. Damit konnte festgestellt werden, ob die erste Temperaturänderung Prozesse anstößt, die zeitversetzt Auswirkungen auf zelluläre Ereignisse hat.

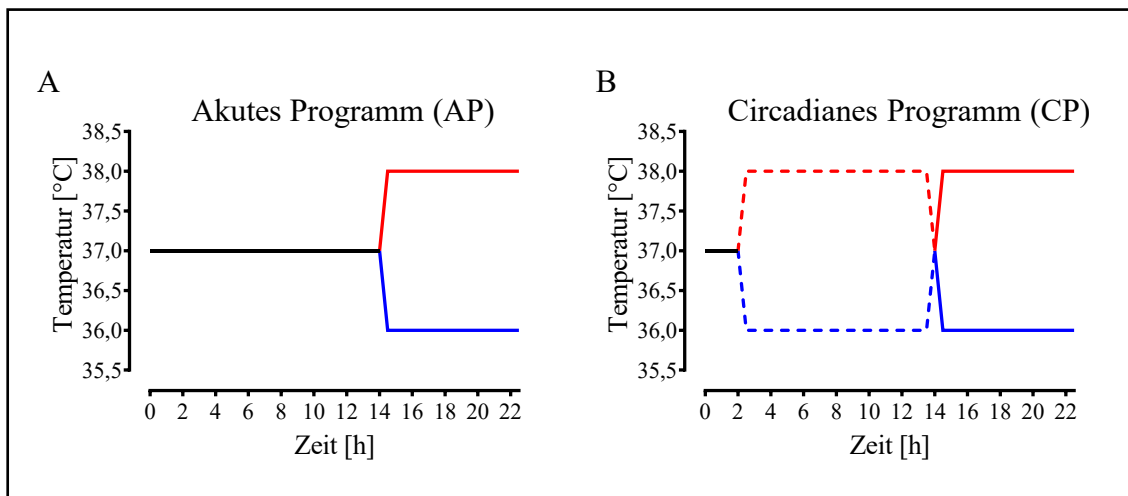


Abb. 11: Schematische Darstellung der verwendeten Temperaturprogramme

16 – 24 h nach dem Aussäen der Zellen wurde ein Mediumwechsel auf serumfreies SM durchgeführt und die Zellen zunächst bei 37 °C inkubiert. (A) Akutes Programm (AP). Nach 14 h bei 37 °C wechselte die Temperatur anschließend innerhalb von 30 min automatisch auf 36 (blaue Linie) oder 38 °C (rote Linie). Die weitere Inkubation erfolgte für bis zu 8 h.

(B) Circadianes Programm (CP). Nach 2 h bei 37 °C wurde die Temperatur auf 36 (blaue gestrichelte Linie) oder 38 °C (rote gestrichelte Linie) innerhalb einer halben Stunde geändert. Nach 11 h erfolgte ein erneuter Temperaturwechsel innerhalb einer Stunde auf die jeweilig andere Temperatur (von 36 auf 38 °C und umgekehrt). Danach folgte eine weitere Inkubation für bis zu 8 h bei dieser Temperatur (durchgezogene Linie).

4.1.3 37 °C-Kontrollinkubation

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei identische Thermoinkubatoren verwendet. Um die erhobenen Daten mit der sonst in der Zellkultur üblichen Temperatur von 37 °C vergleichen zu können, wurde in einigen Versuchen ein Inkubator über die gesamte Dauer bei 37 °C belassen. Somit konnte der zweite Inkubator nur noch für eine Temperaturänderung verwendet werden, weshalb das Experiment daher in zwei Teilschritten durchgeführt werden musste. In einem ersten Durchgang wurde die

Messreihe bei 36 und 37 °C erhoben, in einem zweiten Durchgang die bei 37 und 38 °C. Anschließend wurden die bei 36 oder 38 °C erhaltenen Messwerte zu den jeweiligen bei 37 °C erhaltenen Messwerten skaliert und die Messdaten in Prozent ausgedrückt (siehe Kapitel 3.6).

Durch diese Normierung ließen sich die bei 36 und 38 °C erhaltenen Messdaten in einer Abbildung graphisch darstellen. Außerdem konnten damit experimentell bedingte und nicht vermeidbare Unterschiede, wie die Zellpassage, in den einzelnen Versuchsansätzen korrigiert werden, um eine bessere Vergleichbarkeit der Daten zu erreichen.

In Abb. 12 ist die 37 °C-Kontrollinkubation schematisch am Beispiel des CP dargestellt. In A ist der erste Teil des Experiments zu sehen. Hier wurden die Messreihen für 36 und 37 °C nach bis zu 8 h Inkubation erhoben. In B ist dann der zweite Teil des Experiments zu sehen. Hier wurden schließlich die Messreihen bei 37 und 38 °C erhoben. Wurden die Zellen im AP mit einer 37 °C inkubiert, so musste das Experiment auf die gleiche Weise in zwei Teile geteilt werden: Zunächst wurden die Messreihen nach bis zu 8 h Inkubation bei 36 und 37 °C erhoben. Im zweiten Teilexperiment wurden die Messdaten bei 37 und 38 °C erhoben.

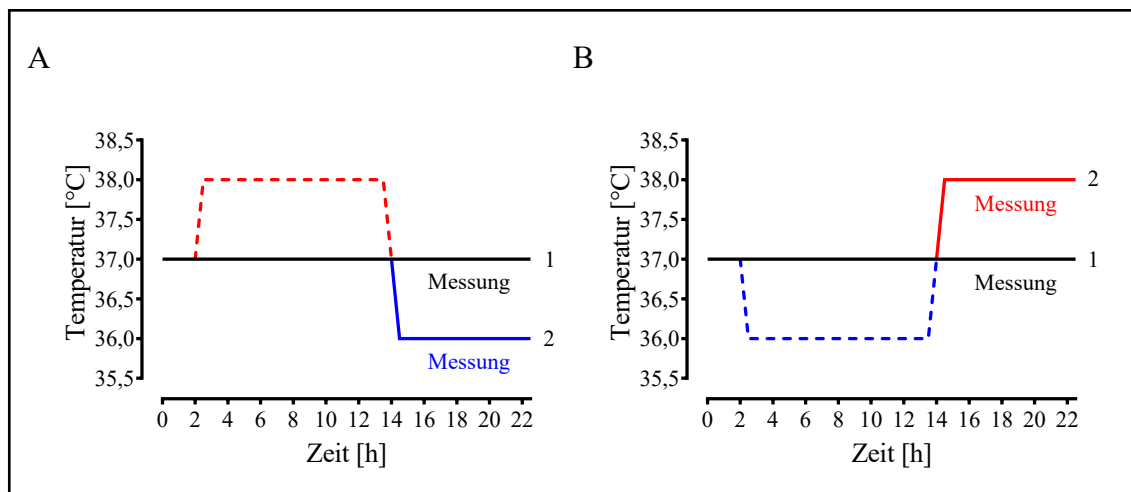


Abb. 12: Schematische Darstellung des CP mit einer 37 °C-Kontrollinkubation

(A) Es wurden zunächst Zellen 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wechselte die Temperatur in einem Schrank auf 38 °C (rote gestrichelte Linie), während sie im anderen Schrank während des gesamten Experiments bei 37 °C verblieb (schwarze Linie). Nach weiteren 11 h wechselte der Inkubator auf 36 °C und behielt die Temperatur für bis zu 8 h (blaue durchgezogene Linie). In diesem Experiment wurden also die Messwerte bei 36 °C erhoben. In B dargestellt ist der zweite Teil des Experiments. Auch hier wurden die Zellen zunächst 2 h bei 37 °C inkubiert, bevor

die Temperatur auf 36 °C wechselte (blaue gestrichelte Linie), während der andere Inkubator während des gesamten Experimentes bei 37 °C verblieb (schwarze Linie). Nach 11 h wurde die Inkubatortemperatur von 36 °C für bis zu 8 h auf 38 °C angehoben (rote durchgezogene Linie). Hier erhielt man also die Messwerte bei 38 °C. Die im jeweiligen Einzelexperiment erhaltenen Temperaturdaten von 36 °C (A) oder 38 °C (B) wurden auf die jeweiligen 37 °C-Werte skaliert und anschließend in Prozent der 37 °C-Kontrolle ausgedrückt (siehe Kapitel 3.6).

4.1.4 Kontrolle der Inkubatoren

Unabhängig von dem verwendeten Temperaturprogramm wurden die Schränke vor dem Versuch mindestens 2 h auf 37 °C vorgeheizt, um das Material vorzuwärmen und eine homogene Temperaturverteilung innerhalb der Inkubatoren zu gewährleisten. Die Inkubatoren benötigten etwa 20 min, um von Raumtemperatur (21 ± 1 °C) auf die Zieltemperatur von 37 °C aufzuheizen. Abb. 13 kann entnommen werden, dass die Aufheizperioden beider Inkubatoren annähernd identisch waren.

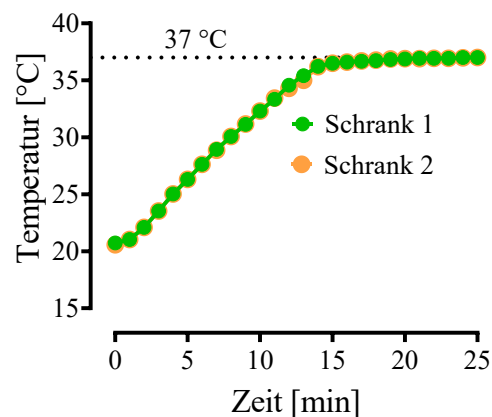


Abb. 13: Aufheizperiode der Temperaturinkubatoren auf 37 °C

Darstellung des Temperaturverlaufs in den Inkubatoren in Abhängigkeit von der Zeit. Gezeigt sind Messwerte aus jeweils drei voneinander unabhängigen Aufheizperioden als Mittelwert \pm SEM. Hierfür wurden beide Inkubatoren jeweils dreimal von der Raumtemperatur (ca. 21 °C) auf 37 °C aufgeheizt. Minütlich wurde die aktuelle Temperatur der Inkubatoren notiert. In Grün dargestellt sind die Messwerte für Schränk 1, in Gelb die Messwerte für Schränk 2.

Waren die Inkubatoren auf 37 °C aufgeheizt, führte eine 5-sekündige Öffnung der Inkubatortür zu einem Temperaturabfall auf $36,5 \pm 0,1$ °C. Nach 82 ± 10 s wurde die Ausgangstemperatur von 37 °C wieder erreicht.

In Tabelle 3 ist die Zeit dargestellt, die notwendig war, um die Zieltemperatur ausgehend von der Ausgangstemperatur einzustellen. Anhand dieser Daten lässt sich erkennen, dass die Temperaturanpassung in den Inkubatoren schnell erfolgte.

Tabelle 3: Benötigte Zeit für die Temperaturwechsel der Inkubatoren

Darstellung der benötigten Zeit in Sekunden für den Wechsel der Ausgangstemperatur zu der Zieltemperatur. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM aus je drei Testläufen beider Inkubatoren.

| Ausgangstemperatur | Zieltemperatur | | |
|--------------------|----------------|-------------|-------------|
| | 36 °C | 37 °C | 38 °C |
| 36 °C | - | 115 \pm 5 | 190 \pm 9 |
| 37 °C | 110 \pm 6 | - | 75 \pm 6 |
| 38 °C | 140 \pm 7 | 80 \pm 4 | - |

4.2 Einfluss der Temperatur auf die basale Promotoraktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren

Studien, die an murinen Fibroblasten durchgeführt wurden, haben gezeigt, dass die Simulation physiologischer Temperaturzyklen einen Einfluss auf die durch den Transkriptionsfaktor BMAL1 vermittelte Promotoraktivität hatte (Saini, Morf et al. 2012). Auch in mHypoA-2/10-Zellen, die den BMAL1-Promotor stabil exprimierten (mHypoA-2/10-BMAL1), konnte eine temperaturabhängige Aktivierung des Promotors gezeigt werden (Breit, Miek et al. 2018). Erwärmung auf 38,5 °C führte hier zu einer Verringerung der Promotoraktivität, wohingegen die Abkühlung auf 36,0 °C zu einer Aktivierung, verglichen mit 37 °C, führte.

4.2.1 Einfluss von Temperaturänderungen auf die basale BMAL1-Promotoraktivität

Um diesen Befund mit dem hier verwendeten experimentellen Aufbau zu bestätigen, wurden mHypoA-2/10-BMAL1-Zellen im AP bzw. CP untersucht. Für die Bewertung

des Unterschieds der transkriptionellen Aktivität zu 37 °C wurde der zweite Inkubator bei 37 °C belassen (vgl. Kapitel 4.1.3). Die Bestimmung der Luciferaseaktivität als Maß für die Aktivierung des BMAL1-Promotors erfolgte 2, 4, und 8 h nach dem Erreichen der angegebenen Temperatur.

Die Luciferaseaktivität war in beiden Programmen signifikant von der Temperatur abhängig (Abb. 14E und F). Im CP bestand zwischen 36 und 38 °C nach 2 h, 4 h und 8 h ein signifikanter Unterschied in der BMAL1-Promotoraktivität. In Abb. 14E kann man erkennen, dass bei 36 °C eine erhöhte Aktivität im Vergleich zu der bei 38 °C gemessen werden konnte. Der BMAL1-Reporter wurde also durch Kälte induziert.

Im AP hingegen konnte nur 4 h nach Erreichen der angegeben Temperatur ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (Abb. 14F). Im direkten Vergleich der beiden Temperaturprogramme war auffällig, dass der nach 4 h gemessene Unterschied in der Reporteraktivität nur im CP auch nach 8 h noch zu messen war. Im AP allerdings war nach 8 h kein signifikanter Unterschied mehr nachzuweisen.

Über HSE in der PER2-Promotorregion kann es zu einer temperaturabhängigen PER2-Expression kommen, die letztlich zu einer verringerten BMAL1-Promotoraktivität bei 38 °C führt (siehe Kapitel 1.1.4). Der BMAL1-Promotor wurde also abhängig von der akuten Temperatur reguliert und zeigte darüber hinaus eine stärkere temperaturabhängige Regulierung im CP, was für eine zusätzliche circadiane Regulierung des BMAL1-Promotors spricht. Dies könnte damit zusammenhängen, dass der BMAL1-Promotor ein Bestandteil des molekularen Rückkopplungsnetzwerks der Clockgene ist (Dunlap 1999).

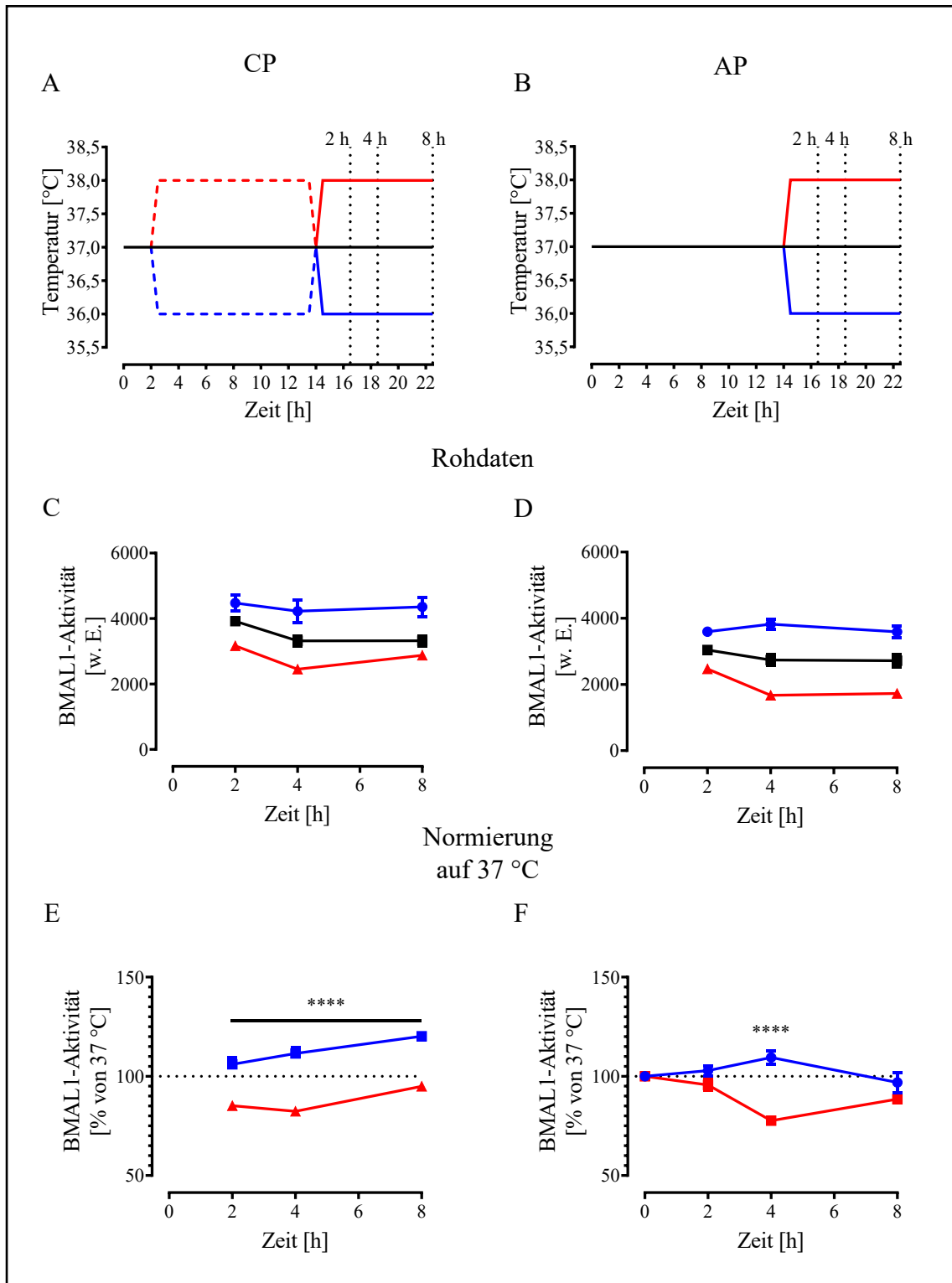


Abb. 14: BMAL1-Promotoraktivität in mHypoA-2/10-Zellen (AP und CP)

Abbildungen A und B zeigen jeweils die Temperaturprofile über die Zeit, die für die Inkubation der mHypoA-2/10-BMAL1-Zellen verwendet wurden. **A** zeigt schematisch das CP, **B** das AP. Als Maßeinheit für die BMAL1-Aktivität wurde die Luciferaseaktivität, dargestellt in willkürlichen Lichteinheiten (w. E.), zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt (2, 4 und 8 h). Die Messwerte, die nach der Inkubation im CP bzw. AP erhalten wurden, sind in **C** bzw. in **D**

dargestellt. E und F zeigen die Normierung der Ergebnisse aus C bzw. D auf 37 °C. Hierfür wurden die bei 36 und 38 °C erhaltenen Messwerte auf die bei 37 °C erhaltenen Messwerte skaliert (siehe Kapitel 3.6). Die gestrichelte Linie zeigt zur besseren Erkennbarkeit den 100 %-Wert an. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten dargestellt. Mit Sternchen wurden signifikante Unterschiede zwischen 36 und 38 °C gekennzeichnet (D, F). Für eine bessere Übersichtlichkeit wurde auf die Kennzeichnung der Signifikanzniveaus bei den Rohdaten verzichtet. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels *two-way* ANOVA und anschließend *post-hoc* Test nach Tukey.

4.2.2 Einfluss von Temperaturänderungen auf die basale CREB-, STAT- und FOXO-Promotoraktivität im CP

Im Folgenden wurden nun weitere mHypoA-2/10-Reporterzelllinien hinsichtlich ihrer temperaturabhängigen Promotoraktivität untersucht. Hierfür wurden mHypo-A-2/10-Zellen mit stabil exprimierenden CREB-, STAT-, und FOXO-abhängigen Reportergenen (siehe Kapitel 1.3.2.2 - 1.3.2.4) im CP untersucht (vgl. Abb. 14A).

In Abb. 15 ist erkennbar, dass alle drei Reporterzelllinien auf die vorgenommenen Temperaturänderungen mit einer angepassten Aktivität reagierten. Daran lässt sich erkennen, dass minimale Änderungen der Temperatur von lediglich 2 °C die Aktivität von drei im Hypothalamus wichtigen Transkriptionsfaktoren beeinflussten. Die CREB-abhängige Reporteraktivität wurde durch eine Verringerung der Inkubationstemperatur auf 36 °C nach 8 h um bis zu 35 ± 1 % gegenüber der 37 °C-Kontrollinkubation erhöht. Umgekehrt wurde die Aktivität durch eine Erhöhung der Temperatur auf 38 °C um 21 ± 2 % verringert (Abb. 15B). Auffallend ist, dass 2 h nach dem zweiten Temperaturstimulus die CREB-Reporteraktivität bei 38 °C gegenüber der bei 36 °C erhöht war.

Die STAT-abhängige Reporteraktivität wurde auch deutlich durch eine Veränderung der Temperatur beeinflusst. Die Aktivität stieg um 25 ± 5 % bei 36 °C und fiel um 18 ± 4 % bei 38 °C nach 8 h (Abb. 15D). Die FOXO-abhängige Aktivierung des Luciferasereporters hingegen war nach 8 h deutlich weniger von der Inkubationstemperatur abhängig. Hier unterschied sich die FOXO-Aktivität bei 36 °C nicht signifikant von der bei 37 °C. Eine achtstündige Inkubation bei 38 °C führte lediglich zu einer um 16 ± 1 % verringerten Aktivierung, verglichen mit der 37 °C-Kontrollinkubation. Interessanterweise war nach 2 h, geringer ausgeprägt auch nach 4 h, die Reporteraktivität bei 38 °C gegenüber der bei 36 °C erhöht. Erst nach etwa 6 h wurde eine höhere Reporteraktivität bei 36 °C gemessen. An den oben aufgeführten Befunden

lässt sich erkennen, dass die durchgeführten Temperaturänderungen einen Einfluss auf die Aktivität des CREB-, STAT- und weniger, des FOXO-abhängigen Reporters nahmen.

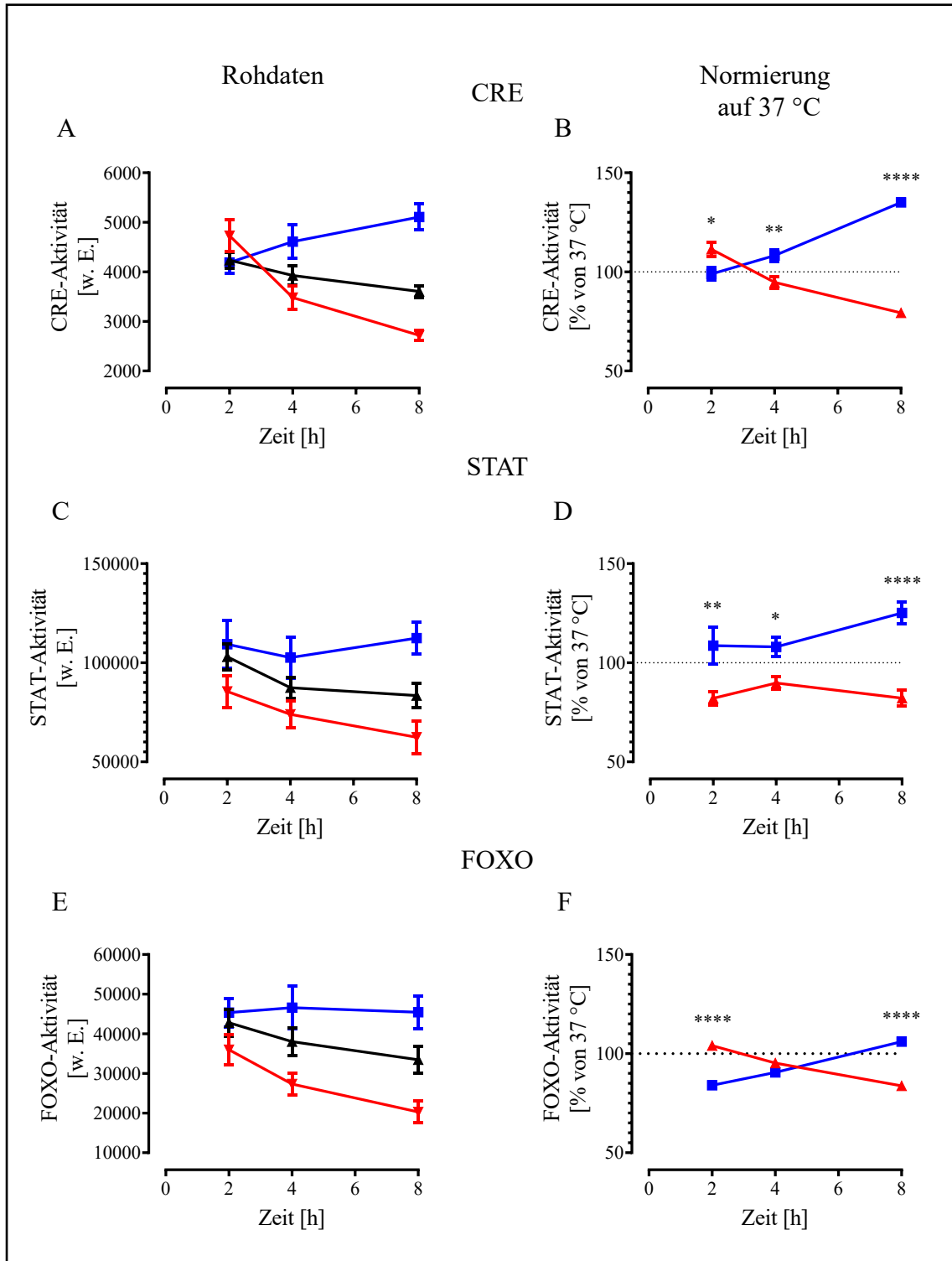


Abb. 15: mHypoA-2/10-CREB-, STAT- und FOXO-abhängige Reporteraktivität (CP)

mHypoA-2/10-CREB-, STAT- oder FOXO-Zellen wurden im CP inkubiert (siehe Abb. 14A). Zunächst wurden die Zellen 11 h bei 36 oder 38 °C und anschließend bis zu 8 h bei der jeweils anderen Temperatur inkubiert. Danach wurde die Luciferaseaktivität bestimmt. Als Maßeinheit für die Reporteraktivität wurde jeweils die Luciferaseaktivität (dargestellt in w. E.) zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt (2, 4 und 8 h). In A, C und E sind die Messwerte der CREB-, STAT bzw. FOXO-abhängigen Reporteraktivierung bei 36, 37 und 38 °C dargestellt.

(B, D, F) Normierung der Messwerte aus A, C bzw. E auf die jeweiligen bei 37 °C erhaltenen Datenreihen (siehe Kapitel 3.6). Es sind Daten aus jeweils vier unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen der Reporteraktivität bei 36 und 38 °C wurden mit Sternchen markiert (B, D, F). Für eine bessere Übersichtlichkeit wurde auf die Kennzeichnung der Signifikanzniveaus bei den Rohdaten verzichtet. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels *two-way* ANOVA und anschließendem *post-hoc* Test nach Tukey.

4.2.3 Einfluss von Temperaturänderungen auf die basale CREB-, STAT- und FOXO-Promotoraktivität im AP

Um herauszufinden, ob eine akute Änderung der Temperatur ausreichend ist, um die im CP beobachteten Effekte auf die Promotoraktivität zu messen, wurden mHypoA-2/10-CREB-, STAT- und FOXO-Zellen im AP untersucht. Hierfür wurden die Zellen wieder bis zu 8 h bei 36 oder 38 °C inkubiert und anschließend die Luciferaseaktivität bestimmt.

In Abb. 16 ist die Aktivität der Transkriptionsfaktoren CREB, STAT und FOXO in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur dargestellt. Im Falle des CREB-abhängigen Reporters war bereits nach 4 h Temperaturstimulus ein signifikanter Unterschied zwischen 36 und 38 °C zu erkennen, der nach weiteren 4 h kaum größer wurde (Abb. 16B). Die maximale kälteinduzierte Aktivierung der Reporteraktivität war nach 8-stündiger Inkubation erreicht. Im Vergleich zu den bei 37 °C erhaltenen Messwerten waren diese um 27 ± 3 %, erhöht. Die wärmeinduzierte Reporteraktivität wurde verglichen mit der 37 °C-Kontrollinkubation um 31 ± 2 % reduziert. Der Vergleich zu 38 °C als Maß der Temperaturabhängigkeit ergab für die CREB-abhängige Reporteraktivität bei 36 °C das $1,8 \pm 0,2$ -fache, welche damit vergleichbar mit der des CPs ($1,7 \pm 0,1$ -fach) war. Ein ähnliches Bild zeigte sich im Falle des STAT-abhängigen Reporters: Hier war die temperaturabhängige Aktivitätsänderung zwischen 36 und 38 °C ($1,5 \pm 0,3$ -fach) sogar identisch mit der des CP (vgl. Abb. 15D und Abb. 16D). Die Aktivität des FOXO-abhängigen Reporters im AP hingegen zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen 36 und 38 °C (Abb. 16F). Somit führte eine Änderung der

Inkubationstemperatur nicht zu einer veränderten FOXO-abhängigen Genexpression. Nur im CP konnte eine Temperaturabhängigkeit der FOXO-Reporteraktivität gemessen werden, was möglicherweise eine Konsequenz von circadianen Prozessen sein könnte. Insgesamt konnte hier gezeigt werden, dass akute Änderungen der Temperatur ausreichend sind, um die CREB- bzw. STAT-, nicht aber die FOXO-abhängige Genexpression, zu modulieren.

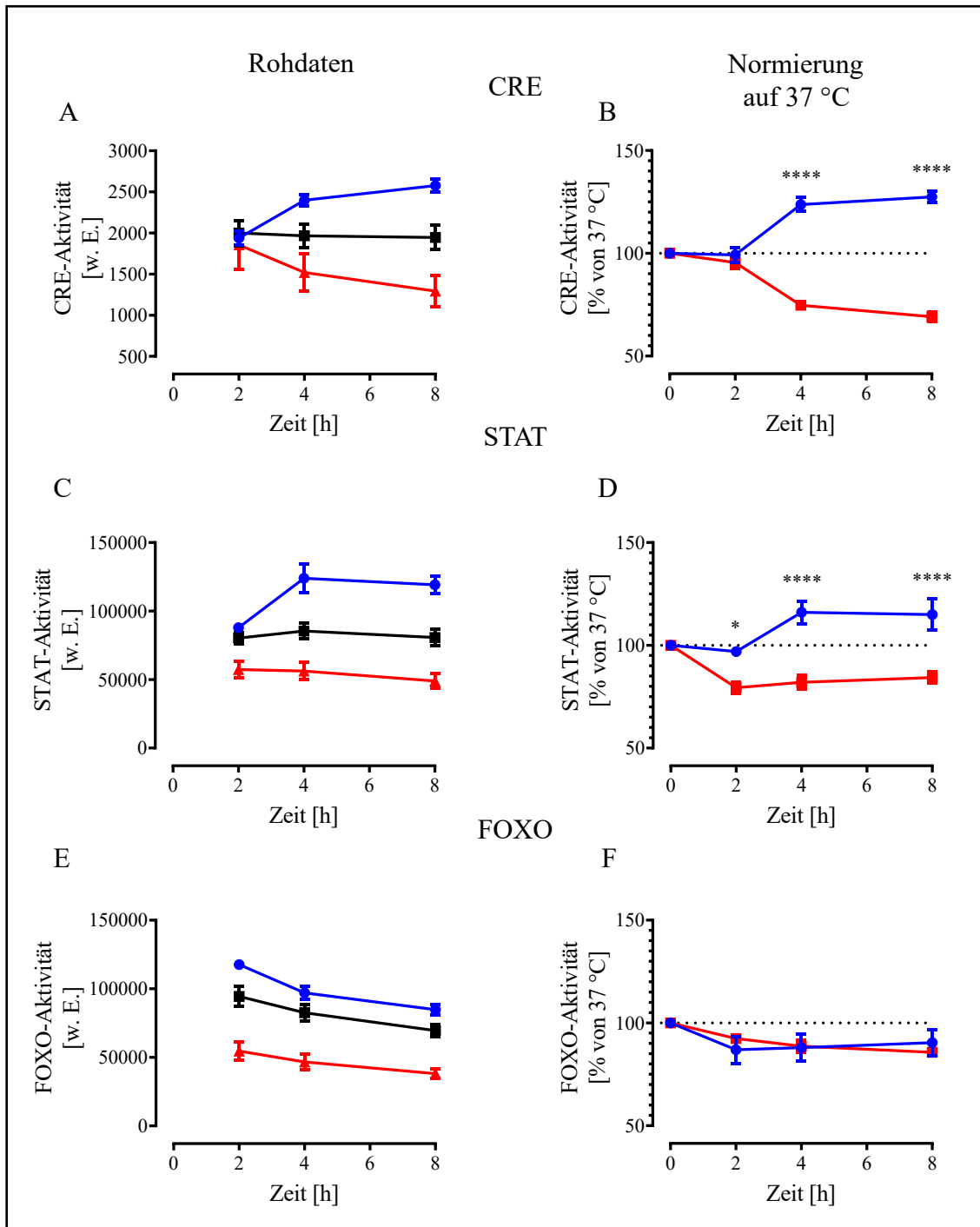


Abb. 16: CREB-, STAT- und FOXO-abhängige Reporteraktivität (AP)

mHypoA-2/10-CREB-, STAT- oder FOXO-Zellen wurden im AP bis zu 8 h bei der angegebenen Temperatur inkubiert und anschließend die Luciferaseaktivität bestimmt. Darstellung der Luciferaseaktivität in Abhängigkeit von der Temperatur des CREB-abhängigen Reporters (A) STAT-abhängigen Reporters (B) und FOXO-abhängigen Reporters (C). (D, E, F) Normierung der Messwerte aus A, B und C auf die jeweiligen bei 37 °C erhaltenen Datenreihen. Die abgebildeten 37 °C-Werte stellen das arithmetische Mittel beider Telexperimente dar (siehe Kapitel 3.6). Es sind Daten aus jeweils vier unabhängig voneinander durchgeführten

Experimenten als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen 36 und 38 °C wurden mit Sternchen gekennzeichnet (B, D, F). Für eine bessere Übersichtlichkeit wurde auf die Kennzeichnung der Signifikanzniveaus bei den Rohdaten verzichtet. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels *two-way* ANOVA und anschließendem *post-hoc* Test nach Tukey.

4.2.4 Einfluss von Temperaturänderungen auf die basale prepro-TRH-Promotoraktivität

mHypoA-2/10-Zellen sind ähnlich zu Thyreoliberin-positiven Neuronen des PVN und daher in der Lage, TRH zu synthetisieren (siehe Kapitel 1.3.4). Der prepro-TRH-Promotor hat Bindestellen für CREB und STAT, weshalb eine erhöhte CREB- bzw. STAT-Aktivität möglicherweise zu einer veränderten prepro-TRH-Promotoraktivität führt. Daher wurde die temperaturabhängige prepro-TRH-Promotoraktivität an mHypoA-2/10-TRH-Zellen (siehe Kapitel 2.3.3) bestimmt. In Abb. 17 ist diese, in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur, im Zeitverlauf dargestellt. Bereits 2 h nach dem Temperaturwechsel von 37 °C auf entweder 36 oder 38 °C konnte ein signifikanter Unterschied in der Luciferaseaktivität, die eine veränderte prepro-TRH-Promotoraktivität anzeigt, gemessen werden. Nach 4-stündiger Inkubation war der temperaturbedingte Unterschied in der Reporteraktivierung noch ausgeprägter (36 °C: 748 ± 35 w. E.; 38 °C: 409 ± 10 w. E.). Eine Abkühlung auf 36 °C, ausgehend von 37 °C, führte somit zu einer Aktivierung des Reporters, während eine Erwärmung auf 38 °C zu einer Verringerung der Reporteraktivität führte. Durch Veränderungen der Temperatur konnte also die prepro-TRH-Promotoraktivität signifikant beeinflusst werden, was möglicherweise durch eine erhöhte CREB- oder STAT-Aktivität bedingt wurde.

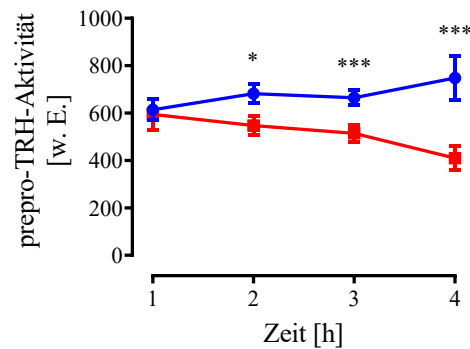


Abb. 17: prepro-TRH-Promotoraktivität in mHypoA-2/10-TRH-Zellen (AP)

mHypoA-2/10-TRH-Zellen wurden bis zu 4 h bei der angegebenen Temperatur inkubiert und anschließend die Luciferaseaktivität bestimmt (siehe Kapitel 3.2.1). Es sind Daten aus jeweils drei unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen 36 und 38 °C wurden mit Sternchen markiert. Die Prüfung der Werte auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test.

4.2.5 Weitere Charakterisierung des cAMP-abhängigen Signalwegs

4.2.5.1 Erweiterung der untersuchten Kinetik

Bisher konnte gezeigt werden, dass geringe Temperaturänderungen, im Vergleich zu einer 37 °C-Kontrollinkubation, ausreichend waren, um eine signifikante Aktivitätsänderung des CREB-abhängigen Reporters nachzuweisen (siehe Abb. 16B). Da in diesem Experiment nicht erkennbar war, ob eine 8-stündige Inkubation bei 36 oder 38 °C bereits zu einer maximalen temperaturabhängigen Reporteraktivität führte, wurden mHypoA-2/10-CREB-Zellen insgesamt 12 h im CP inkubiert. Abb. 18B ist zu entnehmen, dass nach 8-stündiger Inkubation bereits der maximale Temperatureffekt erreicht war.

Diese Darstellung wird der dynamischen Regulierung der CREB-Aktivität allerdings nicht gerecht. In Abb. 18C ist daher eine erweiterte Darstellung der Ergebnisse präsentiert. Hierfür wurde die X-Achse als die vergangene Zeit seit dem Temperaturwechsel auf 36 °C definiert. Die Zellen, die zuletzt bei 36 °C inkubiert waren (Abb. 18B, blaue Linie), erfuhren 2, 4, 8 bzw. 12 h vor der Messung den Temperaturwechsel auf 36 °C. Die Messwerte können daher in Abb. 18C dementsprechend eingetragen werden. Die Zellen, die zuletzt bei 38 °C inkubiert waren (Abb. 18B, rote Linie), hatten bereits zuvor die Temperaturänderung auf 36 °C erfahren, weshalb der erste Temperaturwechsel auf 36 °C bereits 14, 16, 20 bzw. 24 h zurücklag.

Die Messwerte konnten daher in Abb. 18C entsprechend eingesetzt werden. Somit konnte in einer Abbildung der Effekt der Erwärmung auf die CRE-Aktivität nach vorheriger Abkühlung dargestellt werden. Um diese circadiane CREB-abhängige Reporteraktivität besser erkennen zu können, wurden die Messwerte kopiert und zweimal hintereinander eingefügt („Simulation“). Damit konnte durch Änderungen der Temperatur eine oszillierende CREB-Aktivierung mit einer Amplitude von $44,1 \pm 1,2 \%$ berechnet werden.

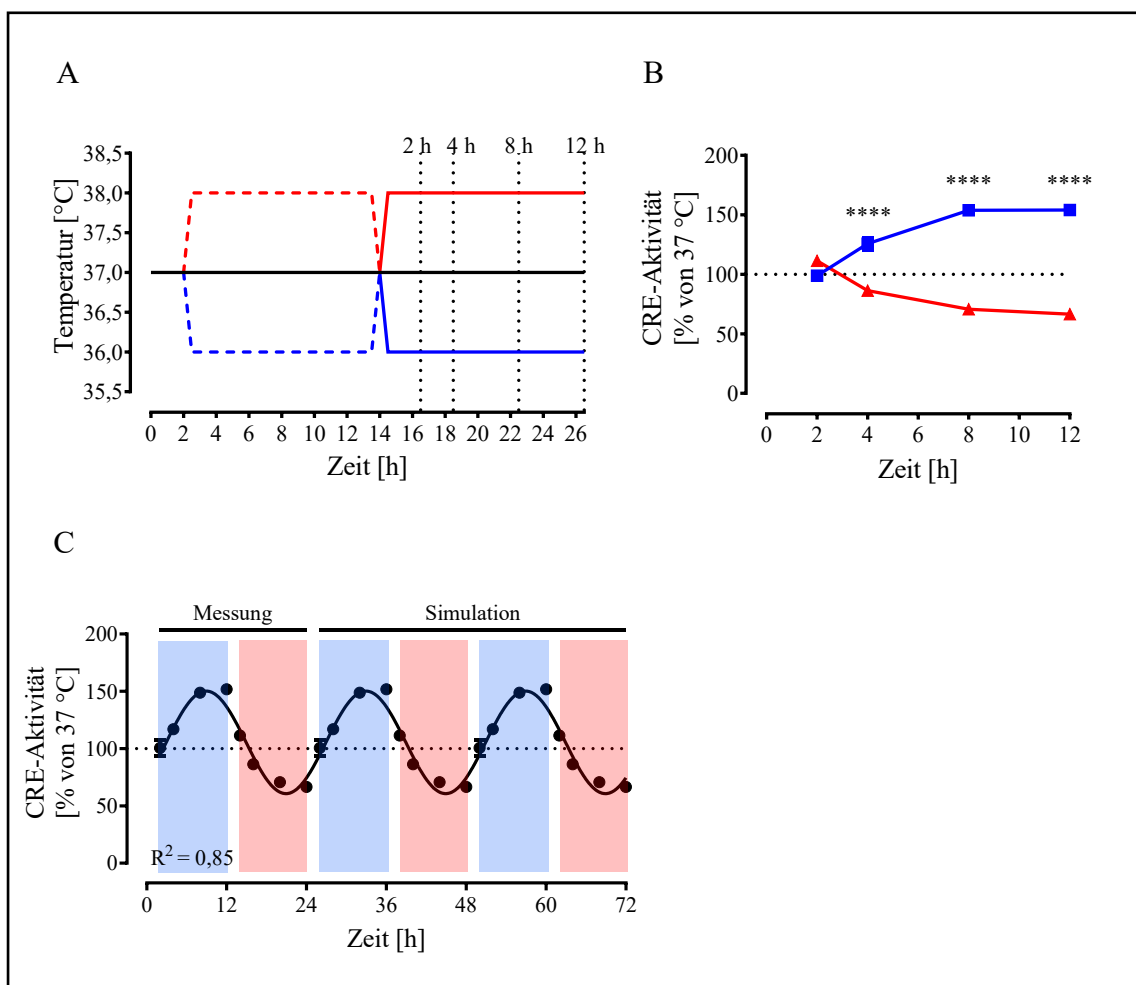


Abb. 18: CREB-abhängige Reporteraktivierung in mHypoA-2/10-CREB-Zellen nach bis zu 12-stündiger Inkubation im CP

In **A** ist schematisch das CP mit bis zu 12-stündiger Inkubation bei 36, 37 oder 38 °C dargestellt. Die Zellen wurden im CP inkubiert, die Luciferaseaktivität nach 2, 4, 8 und 12 h bestimmt und mit der von Zellen verglichen, die dauerhaft bei 37 °C (schwarze Linie) inkubiert waren. (**B**) Darstellung der Luciferaseaktivität bei 36 und 38 °C skaliert auf die bei 37 °C erhaltenen Messwerte (siehe Kapitel 3.6). (**C**) Alternative Darstellung der in B dargestellten Messreihen. Die X-Achse zeigt die Zeit in Stunden seit dem Temperaturwechsel auf 36 °C an. Die in B blau

dargestellte Kurve zeigt die Promotoraktivität von Zellen an, deren Temperaturwechsel auf 36 °C vor 2, 4, 8 bzw. 12 h erfolgte, weshalb sie in C demzufolge abgebildet wurden (blau hinterlegte Fläche). Die rot dargestellten Punkte in B zeigen die Luciferaseaktivität von Zellen, deren Temperaturwechsel auf 36 °C bereits 14, 16, 20 und 24 h zurücklag, weshalb sie in C dementsprechend eingetragen wurden (rot hinterlegte Fläche).

Zur besseren Darstellung der circadianen CREB-Rhythmik wurden die gemessenen Werte (2 – 24 h) extrapoliert (26 – 72 h). Damit ist in Abb. 18C die Luciferaseaktivität zwischen 2 und 72 h nach dem ersten Temperaturwechsel auf 36 °C dargestellt. Es wurde eine nicht-lineare Regression in Form einer Sinuswelle mit einer Wellenlänge von 24 h durchgeführt ($R^2=0,85$). Es sind Daten aus jeweils fünf voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen den Messwerten bei 36 und 38 °C wurden mit Sternchen markiert (B).

4.2.5.2 Erweiterung der untersuchten Inkubationstemperatur

Um den Einfluss der Temperatur auf die CREB-Aktivierung noch genauer zu untersuchen, wurde über den gesamten physiologischen Bereich der Körpertemperatur bei Mäusen, 35,5 – 38,5 °C (Brown, Zumbrunn et al. 2002, Kornmann, Schaad et al. 2007, Saini, Morf et al. 2012), die CREB-abhängige Reporteraktivierung im Vergleich zu einer 37 °C-Kontrollinkubation bestimmt. Hierfür wurden mHypoA-2/10-Zellen im AP inkubiert und 4 h nach dem Temperaturwechsel die Luciferaseaktivität im Vergleich zu einer 37 °C-Kontrollinkubation bewertet.

In Abb. 19 ist zu erkennen, dass die temperaturabhängige CREB-Aktivierung über den physiologischen Bereich annähernd linear abfiel. Leichte Unterschiede erkennt man erst bei höheren Temperaturen. Dort flacht die Reduktion der CREB-Aktivität ab. Abb. 19D zeigt zusätzlich noch die FOXO-abhängige Reporteraktivierung, um die Temperaturabhängigkeit des CREB-Reporters besser bewerten zu können. Die FOXO-Aktivität war unter diesen Bedingungen deutlich weniger temperaturabhängig, da sich die FOXO-abhängige Reporteraktivierung ohne erkennbare Tendenz durchwegs um den 100 %-Wert der 37 °C Kontrolle konzentriert (Abb. 19D). In dieser Darstellung ist die Temperaturabhängigkeit der Reporteraktivierung durch die Steigung zwischen zwei Temperaturen gegeben. Je höher der Betrag der Steigung ist, desto empfindlicher reagierte der jeweilige Reporter auf Temperaturänderungen im Vergleich zu der 37 °C-Kontrollinkubation. Es zeigte sich hier, dass Änderungen der Temperatur einen starken Einfluss auf die Aktivierung des CREB-abhängigen Reporters hatten. Außerdem lässt sich feststellen, dass es sich nicht um einen allgemeingültigen Effekt auf die

Transkriptions- oder Translationsaktivität handelt, sondern bestimmte Signalwege spezifisch beeinflusst wurden.

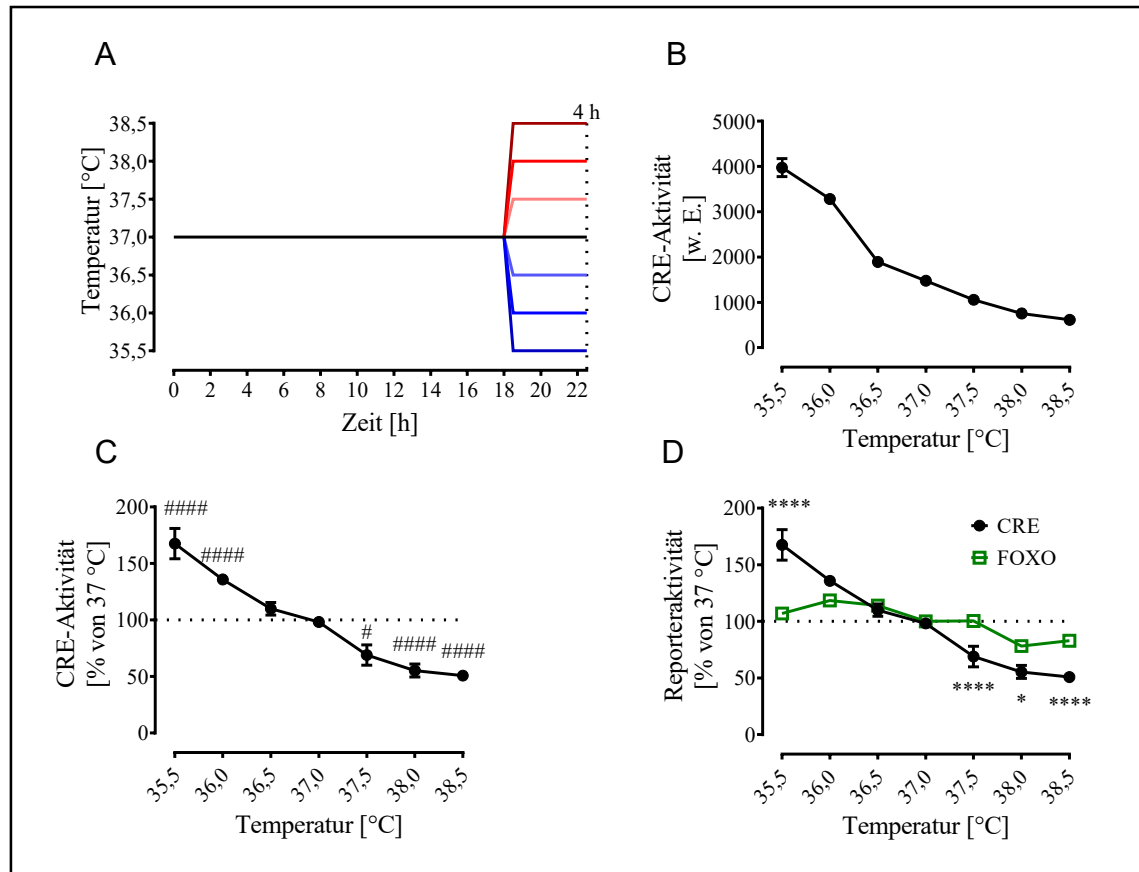


Abb. 19: Reporteraktivität in mHypoA-2/10-Zellen in Abhängigkeit von der Temperatur nach 4 h (AP)

(A) Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung. Nach 18 h bei 37 °C wurde die Temperatur eines Inkubators für 4 h zwischen 35,5 und 38,5 °C eingestellt, während der zweite Inkubator zur Kontrolle bei 37 °C verblieb. Im Anschluss wurde die Luciferaseaktivität bestimmt (gestrichelte Linie). (B) Die gemessene Luciferaseaktivität ist als Maß der CRE-Reporteraktivität in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur dargestellt. In C ist die CRE-Reporteraktivität im Vergleich zu einer 37 °C-Kontrollinkubation (100 %) gezeigt. Hierfür wurden die bei der jeweiligen Temperatur erhaltenen Messwerte auf 37 °C normiert (siehe Kapitel 3.6). In D ist die Luciferaseaktivität im Vergleich zur 37 °C-Kontrollinkubation abgebildet. Die schwarze Linie zeigt die bereits in Panel C dokumentierte CRE-Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur; in Grün ist die FOXO-Reporteraktivität zum Vergleich abgebildet. Je Temperatur sind Daten aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM dargestellt. In C wurden signifikante Unterschiede zu der 37 °C-Kontrollinkubation mit Rauten markiert. In D ist der signifikante Unterschied zwischen FOXO- und CRE-Aktivität mit Sternchen markiert. Die Prüfung der Werte auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels *two-way* ANOVA und anschließendem *post-hoc* Test nach Tukey.

4.2.6 Temperatursensitive Proteine mit Signalwirkung im Hypothalamus

Im Rahmen der Arbeit konnte bisher gezeigt werden, dass bereits geringfügige Abweichungen von 37 °C deutliche Auswirkungen auf die Aktivität bestimmter Transkriptionsfaktoren haben. Im Folgenden sollten nun mögliche Temperatursensoren, welche die temperatursensitive Reporteraktivität vermitteln könnten, identifiziert werden.

4.2.6.1 Hitzeschockproteine

Eine Erhöhung der Temperatur kann zu einer gesteigerten hsf1-Aktivität führen, was die Synthese von HSPs induziert (Hentze, Le Breton et al. 2016). HSPs können dann als Chaperone mit anderen Proteinen, wie Kinasen und Transkriptionsfaktoren, interagieren. Außerdem kann hsf1 an HSEs weiterer Zielgene binden und direkt die Genexpression modulieren (siehe Kapitel 1.2.1).

In Abb. 20 sind RNAseq-Daten dargestellt, die einen Überblick über die Expression von HSPs und hsf1 in dem Zellsystem bieten. Der Vergleich der *reads per kilobase per million mapped reads* (RPKM)-Werte als Maß für die Expression eines bestimmten Gens zeigt, dass HSPs in mHypoA-2/10-Zellen deutlich exprimiert werden. Aufgrund der großen Anzahl exprimierter Subtypen und der zentralen Rolle von hsf1 an der Hitzeschock-Antwort (Pincus 2020), wurde im Rahmen dieser Arbeit nur der Einfluss von hsf1 auf die CREB-abhängige Genexpression weiter untersucht.

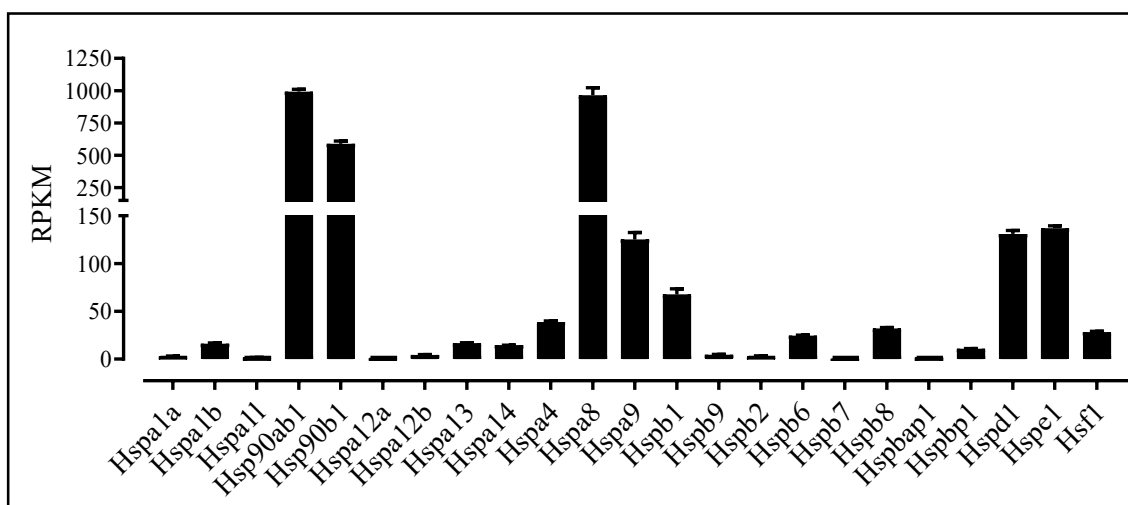


Abb. 20: Expression von hsf1 und HSPs in mHypoA-2/10-Zellen

Darstellung der in mHypoA-2/10-Zellen exprimierten HSPs und hsf1 in *reads per kilo base per million mapped reads* (RPKM). Diese Daten wurden durch totale RNA-Sequenzierung erhalten

(siehe Kapitel 3.2.3). Es sind Daten aus sechs voneinander unabhängigen Zellpools als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Prüfung auf signifikante Expression erfolgte mittels Einstichproben-t-Test. Nur bei signifikantem Unterschied zu dem hypothetischen Wert 0 wurden die Daten abgebildet.

Es wurde zunächst untersucht, ob die Expression von *hsf1* durch Inkubation der Zellen im CP moduliert wurde. Dafür wurde mittels qRT-PCR die mRNA-Expression von *hsf1* nach 8 h bei 36 und 38 °C bestimmt (Abb. 21). Im Verhältnis zu der *gapdh*-Expression, als Haushaltsgen, konnte zwischen der Inkubation bei 36 und der bei 38 °C kein signifikanter Unterschied in der quantitativen *hsf1*-Expression festgestellt werden (Abb. 21A+B).

Da auch ohne veränderte *hsf1*-mRNA-Spiegel eine veränderte Hitzeschock-Antwort möglich sein könnte (Ellis, van der Vies et al. 1989), wurde die Synthese von *hsf1*, durch Verwendung des synthetischen Benzylidenlactams KNK437, inhibiert. KNK437 verhindert die Aktivierung von *hsf1* und somit die Interaktion von *hsf1* mit HSEs. Dadurch wird auch die Synthese einiger HSPs blockiert (Sharma and Seo 2018).

Dazu wurden mHypoA-2/10-CREB-Zellen 24 h vor dem Temperaturstimulus mit KNK437 behandelt, um die Neusynthese von *hsf1* zu inhibieren. Nach Inkubation der Zellen im CP wurde die CRE-Reporteraktivität bestimmt. Unter den beschriebenen Bedingungen führte KNK437 nicht zu einer veränderten temperaturabhängigen CREB-Aktivität (Abb. 21C). Da die Inhibition der *hsf1*-Aktivierung und HSP-Synthese keinen Einfluss auf die CRE-Reporteraktivität hatte, wurde im Rahmen der Arbeit davon ausgegangen, dass die temperaturabhängige CREB-Aktivierung nicht durch *hsf1* oder HSPs vermittelt wird.

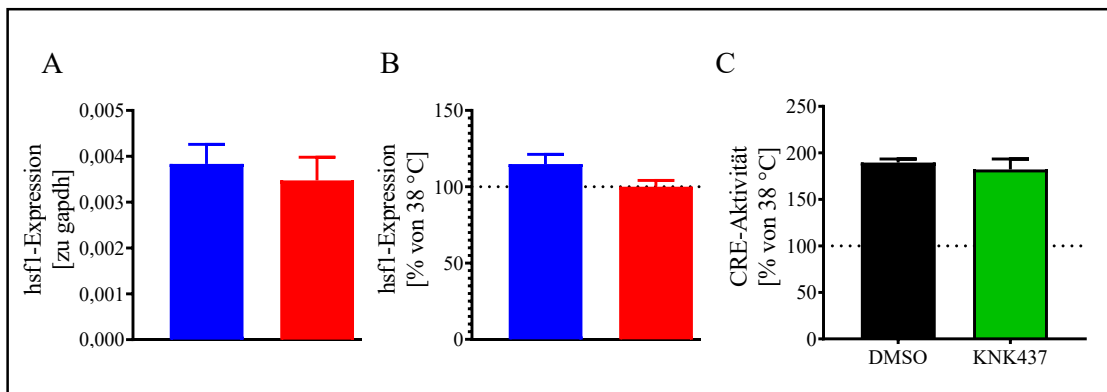


Abb. 21: Expression von hsf1 in mHypoA-2/10-CREB-Zellen und der Einfluss von KNK437 auf die CREB-abhängige Genexpression (CP)

mHypoA-2/10-CREB-Zellen wurden im CP inkubiert und nach 8 h bei 36 oder 38 °C mittels qRT-PCR die hsf1-Expression bestimmt (siehe Kapitel 3.2.2). (A) Darstellung der hsf1-mRNA-Expression im Verhältnis zu der von gapdh in Abhängigkeit von der Temperatur (siehe Kapitel 3.6). (B) Die bei 38 °C erhaltenen Messwerte wurden zu 100 % gesetzt und die Messwerte bei 36 °C entsprechend skaliert. (C) Einfluss des hsf1-Inhibitors KNK437 (100 µM) auf die temperaturabhängige CRE-Aktivität im Vergleich zu der Lösemittelkontrolle (0,1 % DMSO). Hierfür wurden mHypoA-2/10-Zellen 16 h vor dem Temperaturwechsel mit KNK437 oder DMSO inkubiert. Nach der Inkubation im CP wurde die Luciferaseaktivität bestimmt. Die Rohdaten wurden auf die bei 38 °C erhaltenen Messwerte normiert (100 %) (siehe Kapitel 3.6). Es sind Daten aus drei voneinander unabhängigen Experimenten als Mittelwert ± SEM gezeigt. Die Prüfung der Werte auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test.

4.2.6.2 Kälteinduzierte Proteine

In diesem Zusammenhang soll noch auf eine weitere Gruppe potenzieller Regulator-Proteine eingegangen werden. Kälteinduzierte Proteine, wie *cold inducible RNA-binding protein* (CIRBP/CIRP) und *putative RNA-binding protein 3* (RBM3), werden bei milder Hypothermie vermehrt exprimiert und sind dann in der Lage RNA zu stabilisieren und diese damit vor dem Abbau zu schützen (siehe Kapitel 1.2.2). Interessant ist allerdings, dass die gesteigerte Expression von CIRP auch bei geringen Abweichungen von 37 °C demonstriert werden konnte (Gotic, Omid et al. 2016). Daher sollte überprüft werden, ob CIRP in mHypoA-2/10-Zellen temperaturabhängig exprimiert wird.

Hierfür wurde mittels qRT-PCR die mRNA-Expression von CIRP im Verhältnis zu der von gapdh untersucht. In Abb. 22A ist zu erkennen, dass ein signifikanter Unterschied zwischen der Inkubation bei 36 und der bei 38 °C besteht. In Abb. 22B wird ersichtlich, dass die CIRP-Expression nach Inkubation im CP bei 36 °C mehr als verdoppelt ($213 \pm 19 \%$) war.

Als nächstes sollte überprüft werden, ob eine einmalige Temperaturänderung ausreichend ist, um die Expression zu modulieren. Dafür wurden mHypoA-2/10-Zellen im AP inkubiert und die CIRP-Expression nach 30, 60, 90 und 120 min bestimmt (Abb. 22C). Diese wurde bereits nach 60 min im AP temperaturabhängig moduliert. Nach 120 min bei 36 °C konnte bereits das $1,6 \pm 0,2$ -fache der CIRP-mRNA, im Vergleich zu 38 °C, nachgewiesen werden. Damit konnte gezeigt werden, dass CIRP direkt durch eine Änderung der Inkubationstemperatur moduliert wird: Bei einer Verringerung der Temperatur kommt es zu einer signifikanten Induktion, während die Erhöhung der Temperatur auf 38 °C zu einer Verringerung der mRNA-Expression führte. Somit wurde mit CIRP ein Protein mit Signalwirkung (Stabilisierung von mRNA-Transkripten) in mHypoA-2/10-Zellen identifiziert, dessen Transkription bei physiologischen Temperaturänderungen moduliert wird. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob CIRP zu einer Aktivierung des CRE-Reporters führt.

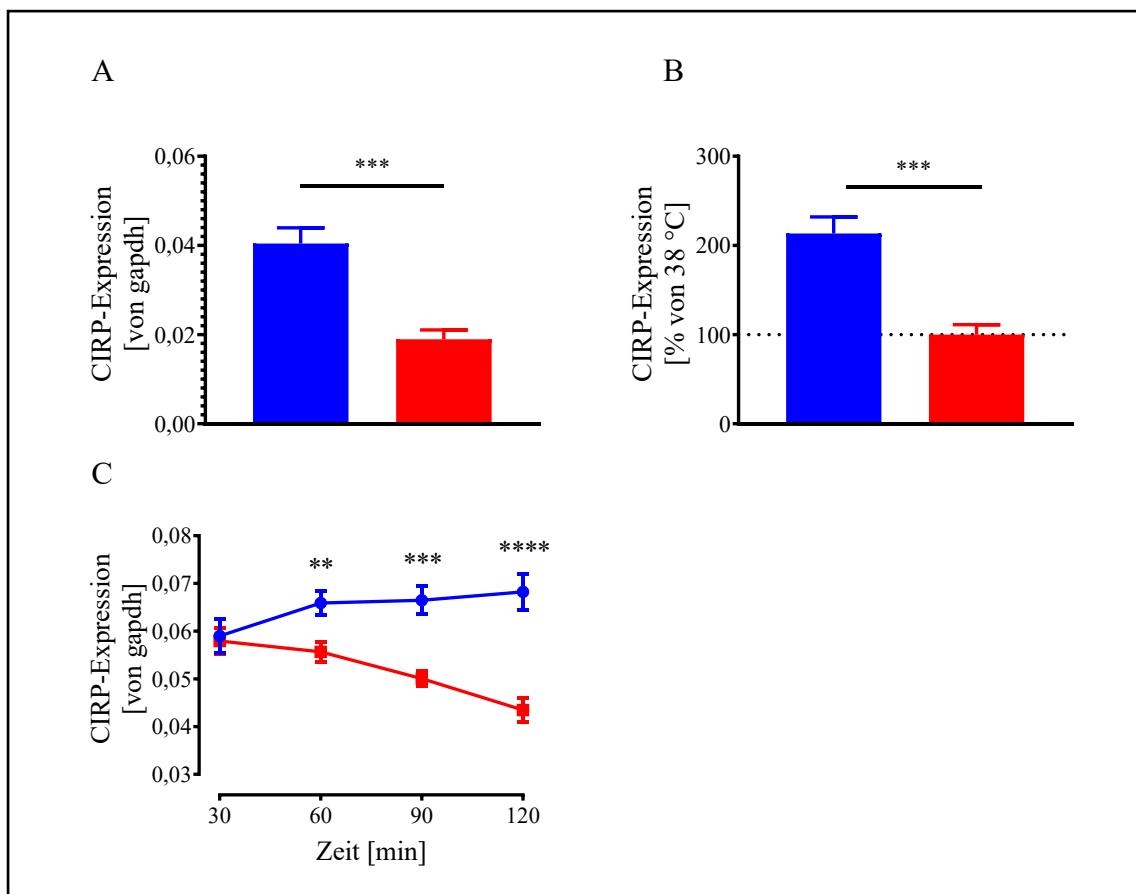


Abb. 22: mRNA-Expression von CIRP (CP und AP)

mHypoA-2/10-CREB-Zellen wurden entweder im CP (A, B) oder im AP (C) inkubiert und die CIRP-Expression mittels qRT-PCR bei 36 oder 38 °C bestimmt. (A) Dargestellt ist die CIRP-Expression 8 h nach dem Temperaturwechsel im Verhältnis zum Haushaltsgen gapdh. (B)

Normierung der in A erhaltenen Messwerte. Die bei 38 °C erhaltenen Messwerte sind hierfür zu 100 % gesetzt worden (siehe Kapitel 3.6). (C) mHypoA-2/10-CREB-Zellen wurden im AP inkubiert und im Abstand von 30 min die CIRP-Expression im Verhältnis zu der von gapdh bei 36 oder 38 °C bestimmt. Es sind Daten aus drei voneinander unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Prüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test. Signifikante Unterschiede zwischen 36 und 38 °C wurden mit Sternchen markiert.

Um den Einfluss von CIRP auf die CREB-abhängige Reporteraktivität zu untersuchen, wurde im Folgenden CIRP in mHypoA-2/10-CREB-Zellen überexprimiert. Hierfür wurden mHypoA-2/10-CREB-Zellen mit einem HA-Epitop-markierten CIRP-Plasmid transfiziert und anschließend die CREB-abhängige Reporteraktivität bei 37 °C bestimmt.

In Abb. 23A erkennt man, dass die Überexpression von CIRP keinen signifikanten Einfluss auf die CRE-Reporteraktivität in mHypoA-2/10-Zellen hatte. Um zu überprüfen, ob die Transfektion erfolgreich war, wurde die CIRP-Proteinmenge mittels Western Blot bestimmt. In Abb. 23B ist der Proteinnachweis der Überexpression in mHypoA-2/10-CREB-Zellen beispielhaft dargestellt. Mit steigender Plasmidmenge wurde eine erhöhte Expression des HA-Epitops nachgewiesen, weshalb davon ausgegangen wurde, dass die Überexpression erfolgreich war. Der verwendete Antikörper war gegen das HA-Epitop gerichtet, weshalb der Nachweis endogen exprimierten CIRPs mit diesem Antikörper nicht möglich war.

Die Überexpression von humanen CIRP in murinen Zellen führte möglicherweise zu einer abweichenden Funktionalität des Proteins, obwohl die Sequenzhomologie der humanen und der murinen CIRP-Variante etwa 95 % beträgt (Nishiyama, Higashitsuji et al. 1997). Um dies zu überprüfen, wurde das gleiche Plasmid für die Überexpression in HEK-293-CREB-Zellen (Zelllinie humanen Ursprungs, siehe Kapitel 2.3.3) verwendet. Der Erfolg der Transfektion wurde erneut mittels Western Blot überprüft. In HEK-293-CREB-Zellen wurde mit steigender Plasmidmenge eine erhöhte Expression des HA-Epitops nachgewiesen (Abb. 23D). Die Luciferasemessung ergab eine deutliche Tendenz der CIRP-induzierten CRE-Reporteraktivierung (Abb. 23C). Allerdings zeigten die Daten der Einzelmessungen keine signifikante CIRP-abhängige Aktivierung des CRE-Reporters, weshalb auf eine Normierung der Daten verzichtet wurde.

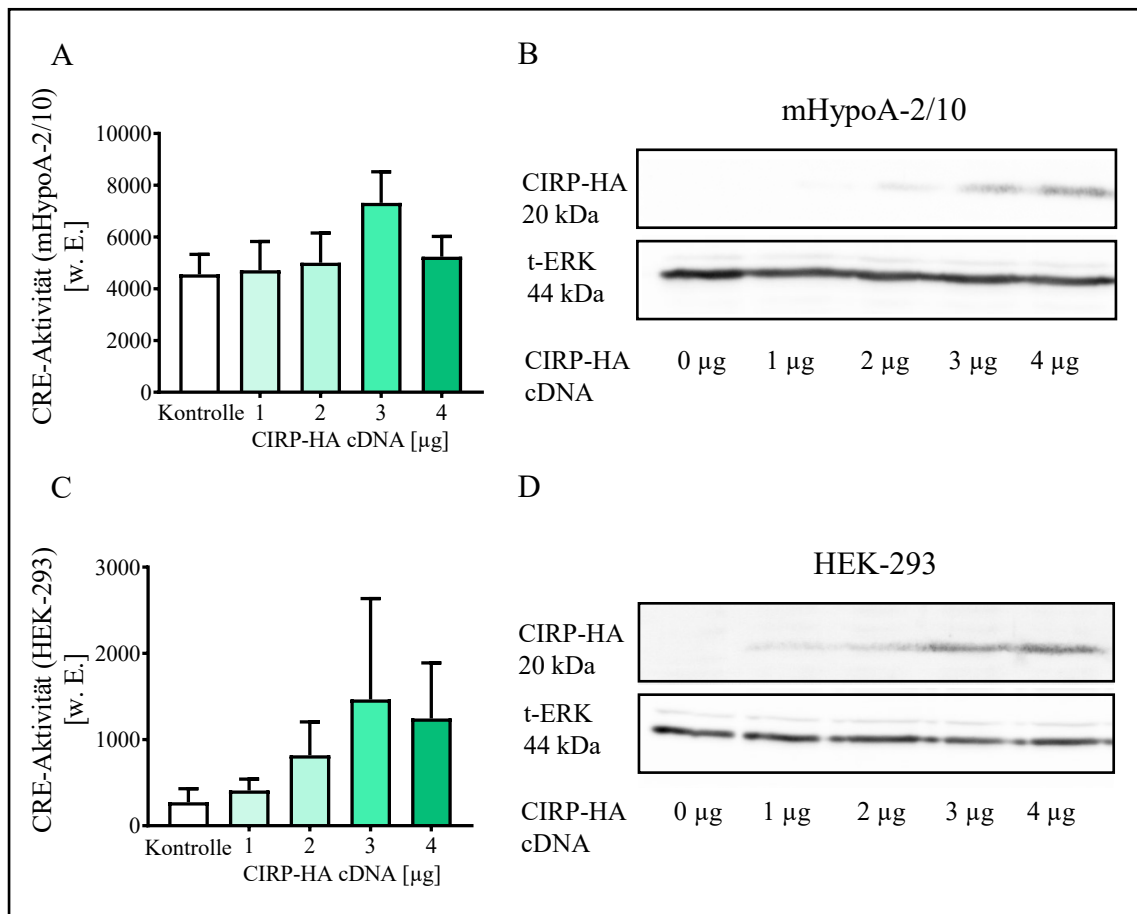


Abb. 23: Überexpression von CIRP in mHypoA-2/10-CREB- und HEK-293-CREB-Zellen bei 37 °C und Kontrolle der Überexpression mittels Western Blot

Hierfür wurden mHypoA-2/10-CREB- oder HEK-293-CREB-Zellen mit HA-markierter CIRP-cDNA (1, 2, 3 oder 4 μ g) oder 4 μ g pcDNA4-Vektor (Kontrolle) transfiziert (siehe Kapitel 3.5.1.1). Nach 16 h wurde die Luciferaseaktivität bestimmt. Dargestellt ist die CRE-Aktivität in Abhängigkeit von der verwendeten Menge CIRP-HA-Plasmid in μ g in mHypoA-2/10-CREB- (A) und HEK-293-CREB-Zellen (C). Es sind Daten aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Prüfung der Werte auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels *one-way* ANOVA und anschließendem *post-hoc* Test nach Tukey. Die erfolgreiche Überexpression von CIRP-HA wurde mittels Western Blot kontrolliert (siehe Kapitel 3.4.3). Es ist je ein exemplarischer Blot für die Überexpression in mHypoA-2/10-CREB-Zellen (B) und HEK-293-CREB-Zellen (D) dargestellt. Als Ladekontrolle wurde ERK-1 verwendet.

Um herauszufinden, ob CIRP einen Anteil an der Temperaturabhängigkeit der CREB-abhängigen Reporteraktivierung hat, wurde im Folgenden die endogene Expression von CIRP in mHypoA-2/10-CREB-Zellen durch RNA-Interferenz (siehe Kapitel 3.5.1.2) verringert. Anschließend wurde im AP oder CP der Einfluss der verminderten Expression von CIRP auf die temperaturabhängige CREB-Aktivität überprüft.

Die in Abb. 24 dargestellten Ergebnisse verdeutlichen, dass die CREB-abhängige Reporteraktivität im AP bzw. CP durch eine verringerte CIRP-Expression nicht signifikant verändert wurde. Um sicherzustellen, dass die Menge an CIRP-Protein durch die Elektroporation der CIRP-siRNA tatsächlich relevant verringert wurde, wurde die CIRP-Expression mittels Western Blot überprüft (Abb. 24E). Während die Expression von ERK-1 als Ladekontrolle unverändert blieb, wurde die CIRP-Expression durch die Verwendung von 50 nM CIRP-siRNA deutlich reduziert. Daraus lässt sich schließen, dass der *knock-down* von CIRP die CREB-abhängige Reporteraktivierung nicht beeinflusste. Daher war CIRP unter den gewählten Bedingungen wahrscheinlich nicht an der temperaturvermittelten CRE-Aktivität beteiligt.

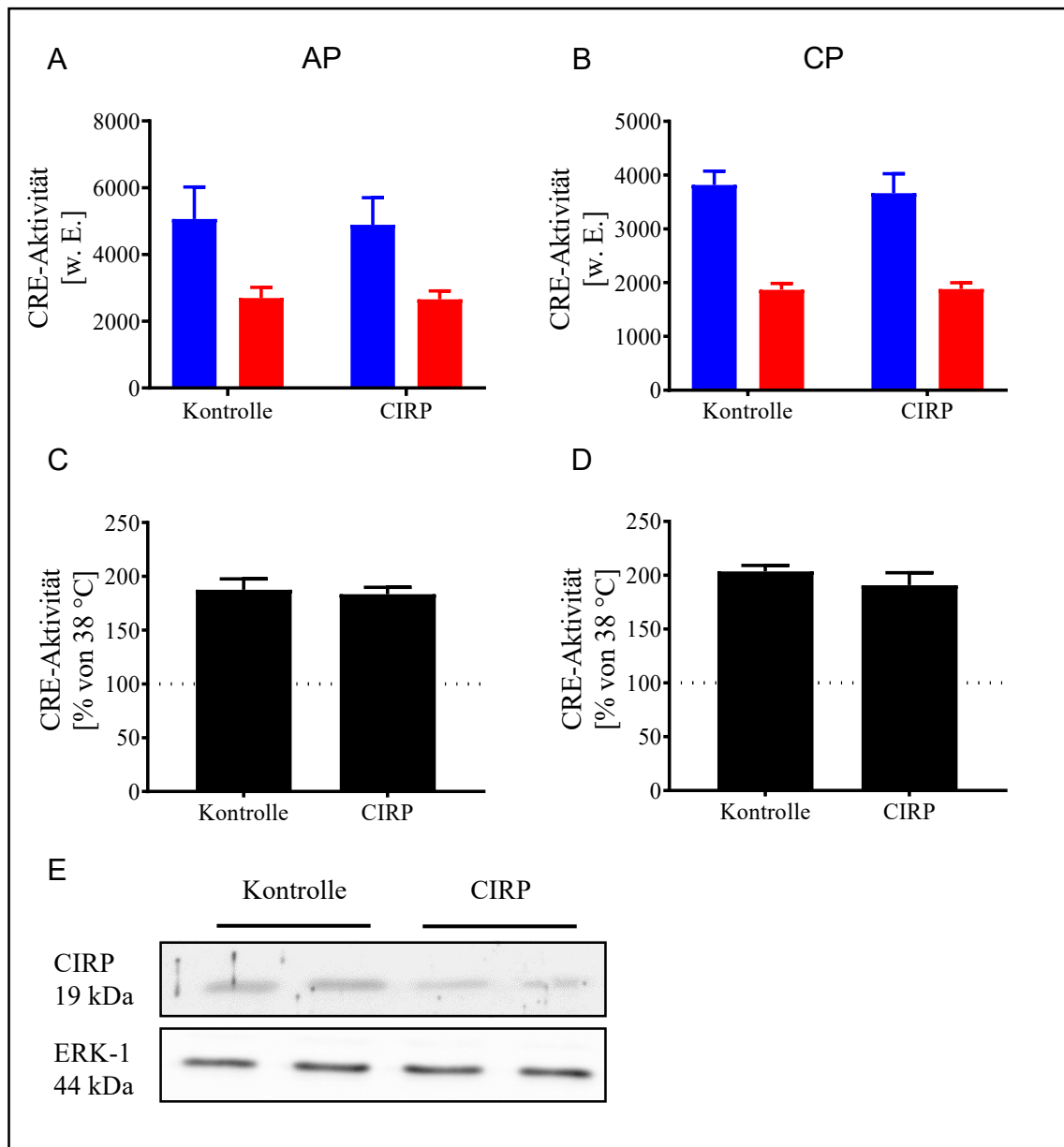


Abb. 24: Verringerung der CIRP-Expression in mHypoA-2/10-CREB-Zellen mittels RNA-Interferenz

mHypoA-2/10-CREB-Zellen wurden entweder mit 50 nM CIRP-siRNA oder 50 nM Zufalls-siRNA elektroporiert. Nach 16 – 24 h wurde das Serum durch einen Mediumwechsel entzogen und die Zellen im AP (A, C) oder im CP (B, D) inkubiert. Unabhängig vom verwendeten Programm wurden die Zellen nach 8 h bei 36 oder 38 °C aus den Inkubatoren entnommen und die Luciferaseaktivität bestimmt. (A) Die CRE-Aktivität ist bei 36 oder 38 °C in Abhängigkeit von der verwendeten siRNA im AP dargestellt. Blaue Säulen geben die Daten für die Inkubation bei 36 °C wieder; rote Säulen die Messdaten für die Inkubation bei 38 °C. (B) Die CRE-Aktivität ist in Abhängigkeit von der Temperatur und der verwendeten siRNA im CP dargestellt. (C, D) Normierung der in A und B erhaltenen Messwerte. Hierfür wurden die bei 38 °C erhaltenen Werte zu 100 % gesetzt (siehe Kapitel 3.6). (E) Exemplarischer Western Blot der siRNA-vermittelten Verringerung der CIRP-Expression. Als Ladekontrolle wurde ERK-1 verwendet. Es sind Daten

aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM präsentiert (A-D). Die Prüfung der Werte auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels *two-way* ANOVA (A, B) und anschließendem *post-hoc* Test nach Tukey oder Zweistichproben-t-Test (C, D).

Insgesamt konnte bislang also gezeigt werden, dass die basale CRE-Aktivität abhängig von der Temperatur war. Eine Erhöhung der Temperatur führte zu einer verminderten Aktivität, wohingegen die Verringerung der Temperatur das Gegenteil bewirkte. Es konnte ferner nachgewiesen werden, dass die mRNA-Expression von CIRP im Bereich der physiologischen Körpertemperatur reguliert wurde. Die untersuchten wärme- und kälteinduzierten Proteine übten unter den gewählten Bedingungen allerdings keinen Einfluss auf die CRE-Aktivität in mHypoA-2/10-Zellen aus.

4.2.6.3 TRP-Kanäle

Eine weitere Gruppe temperatursensitiver Proteine stellen *transient receptor potential* (TRP)-Kanäle dar. Sie sind eine große Familie von Ionenkanälen, die aus sechs Transmembrandomänen aufgebaut sind (siehe Kapitel 1.2.3). Sie besitzen unterschiedliche Leitfähigkeiten für Ionen, wie beispielsweise Ca^{2+} , Na^{+} , Mg^{2+} und Zn^{2+} (Ramsey, Delling et al. 2006). Es konnte bereits gezeigt werden, dass ein Teil der TRP-Kanäle, sogenannte Thermo-TRPs, temperaturabhängig reguliert werden (Patapoutian, Peier et al. 2003). So ist es denkbar, dass TRP-Kanäle durch Änderung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels beispielsweise die Aktivität von Enzymen oder Transkriptionsfaktoren beeinflussen könnten.

Als erstes wurde daher in mHypoA-2/10-Zellen die Expression von TRP-Kanälen mittels RNAseq (siehe Kapitel 3.2.3) untersucht. In Abb. 25A sind die in mHypoA-2/10-Zellen exprimierten TRP-Kanäle dargestellt. TRP-Kanäle, die in der Literatur als Thermo-TRPs beschrieben wurden, sind gesondert in Abb. 25B dargestellt. Es ist erkennbar, dass in dem untersuchten Zellmodell hauptsächlich TRPM4 und TRPV4 als mögliche Thermosensoren exprimiert werden, in geringerem Umfang auch TRPV1-3, TRPV6, TRPM2 und TRPM3.

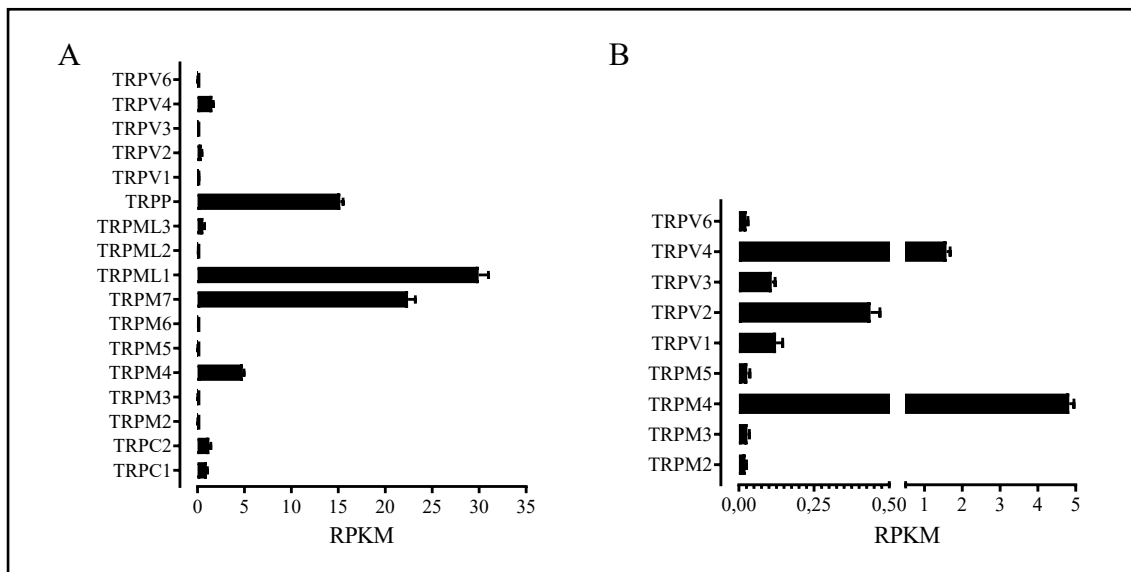


Abb. 25: mRNA-Expression von TRP-Kanälen in mHypoA-2/10-Zellen

Es ist die mRNA-Expression von TRP-Kanälen dargestellt. Die Daten wurden durch totale RNA-Sequenzierung von mHypoA-2/10-Zellen erhalten (siehe Kapitel 3.2.3). (A) Alle statistisch signifikant exprimierten TRP-Kanäle sind dargestellt. (B) Darstellung der als temperatursensitiv publizierten TRP-Kanäle aus A. Es sind Daten aus sechs unabhängigen Zellpopulationen als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Prüfung auf signifikante Expression erfolgte mittels Einstichproben-t-Test. Nur bei einem signifikanten Unterschied zu dem hypothetischen Wert von 0 wurden die Daten abgebildet.

Um den funktionellen Beitrag von TRP-Kanälen an der temperaturabhängigen CRE-Aktivität abschätzen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit Rutheniumrot (RuR) und 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB) verwendet, welche die Leitfähigkeit vieler TRP-Kanäle modulieren können (Holzer and Izzo 2014). Falls ein oder mehrere Thermo-TRPs zur temperaturabhängigen CREB-Aktivität beitragen, sollten diese durch eine Inhibition des oder der jeweiligen TRP-Kanäle beeinflussbar sein. Dazu wurden mHypoA-2/10-CREB-Zellen im AP mit 2-APB oder RuR inkubiert und nach 4 h die Luciferaseaktivität bestimmt.

In Abb. 26 ist der Einfluss der verwendeten Inhibitoren auf die CRE-Aktivität dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass die Inkubation der Zellen mit RuR zu keiner signifikanten Änderung der durch die Temperaturänderungen induzierten CREB-abhängigen Genexpression führte. Die Inkubation mit 2-APB hingegen konnte den temperaturbedingten Unterschied der CREB-Aktivität zwischen 36 und 38 °C annähernd vollständig aufheben (Abb. 26B). Hierbei wurde die durch eine Erhöhung der Temperatur

verursachte Verringerung der CREB-Aktivität annähernd vollständig ausgeglichen. Der temperaturbedingte Unterschied wurde auf 120 ± 4 % reduziert, was einer $88,6 \pm 3,5$ -prozentigen Inhibition entspricht.

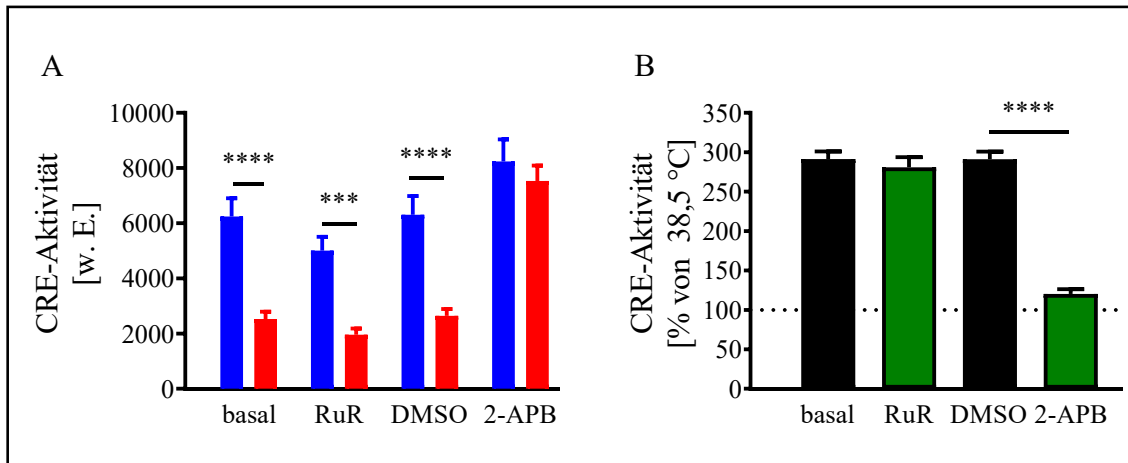


Abb. 26: Einfluss der Ionenkanalmodulatoren RuR und 2-APB auf die CREB-abhängige Reporteraktivität nach Inkubation von mHypoA-2/10-CREB-Zellen (AP)

mHypoA-2/10-Zellen wurden im AP 4 h entweder bei 35,5 °C oder 38,5 °C inkubiert. 30 min zuvor wurde entweder RuR (10 µM) oder 2-APB (100 µM) hinzugegeben. Als Lösemittelkontrolle für 2-APB diente 0,1 % DMSO. RuR lag in SM gelöst vor, weshalb keine Lösemittelkontrolle erforderlich war. (A) Die Luciferaseaktivität wurde bestimmt und die gemessenen Rohdaten der CREB-abhängigen Reporteraktivität dargestellt. (B) Die bei 38,5 °C erhaltenen Messwerte wurden zu 100 % gesetzt und die 35,5 °C dementsprechend normiert (siehe Kapitel 3.6). Es sind Daten aus jeweils 11 unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Signifikante Unterschiede wurden mit Sternchen markiert. Die Prüfung der Werte auf signifikante Unterschiede zwischen der CRE-Aktivität bei 35,5 und 38,5 °C (A) bzw. der CRE-Aktivität zwischen DMSO und 2-APB (B) erfolgte mittels *two-way* ANOVA (A) bzw. *one-way* ANOVA (B) und anschließendem *post-hoc* Test nach Tukey.

Nachdem die Inkubation mit 2-APB einen starken Effekt auf die temperaturabhängige CREB-Aktivierung hatte, wurde der Einfluss von 2-APB auf die CRE-Aktivität in der Temperatur-Wirkungs-Kurve (siehe Abb. 19) genauer charakterisiert. Hierfür wurde 30 min vor dem Temperaturwechsel 2-APB zugesetzt, um die TRP-Aktivität zu modulieren. In Abb. 27A ist der 2-APB-induzierte Effekt auf die CRE-Aktivität bei Temperaturen zwischen 35,5 und 38,5 °C im Vergleich zu der 37 °C-Kontrollinkubation dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass der durch verringerte Temperaturen ($< 37,0$ °C) bedingte Unterschied zur Kontrollinkubation bei 37 °C durch 2-APB aufgehoben wurde. Zuvor

wurde nachgewiesen, dass die Inkubation der Zellen mit 0,1 % DMSO keinen Einfluss auf die temperaturabhängige CRE-Aktivität nahm (Daten nicht gezeigt).

In Abb. 27B ist dargestellt, dass 2-APB den CRE-Reporter bei erhöhter Temperatur im Vergleich zu der Lösemittelkontrolle stärker aktivierte. Daher führte eine Inkubation mit 2-APB zu dem in Abb. 26 beobachteten verringerten Temperatureffekt. Die FOXO-abhängige Reporteraktivität wurde durch die Inkubation mit 2-APB nicht relevant beeinflusst, da sich die 2-APB induzierte Reporteraktivität kaum von der Lösemittelkontrolle (100 %) unterschied.

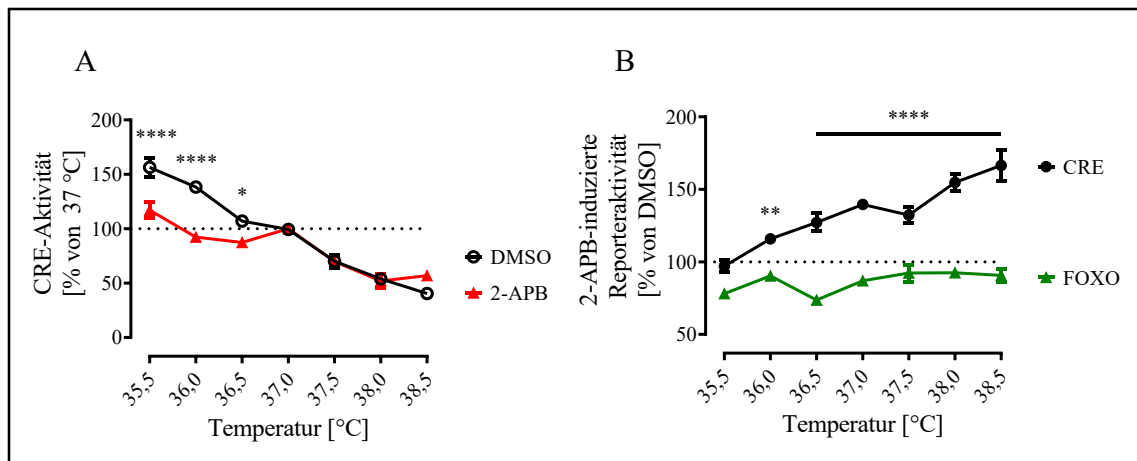


Abb. 27: Einfluss von 2-APB auf die temperaturabhängige CRE-Aktivität (AP)

mHypoA-2/10-CREB-Zellen wurden im AP bei 37 °C inkubiert. Nach 18 h wurde 2-APB (100 μ M) oder DMSO (0,1%) zugegeben. 30 min danach wechselte der Inkubator für einen Zeitraum von 4 h auf die auf der X-Achse angezeigte Temperatur. Anschließend wurde die Luciferaseaktivität bestimmt. **(A)** Vergleich der CRE-Aktivität zwischen der Inkubation mit 2-APB und DMSO. Die Luciferaseaktivität der 37 °C-Kontrollinkubation wurde zu 100 % gesetzt und die bei den anderen Temperaturen erhaltenen Werte entsprechend normiert (siehe Kapitel 3.6) **(B)** Es ist der Einfluss von 2-APB auf die CRE- und FOXO-Aktivität im Vergleich zur DMSO-Kontrolle dargestellt. Hierfür wurden die bei der jeweiligen Temperatur erhaltenen Messwerte der DMSO-Inkubation zu 100 % gesetzt und die Messwerte der mit 2-APB behandelten Proben entsprechend skaliert. Es sind Daten aus jeweils drei unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen Lösemittelkontrolle und 100 μ M 2-APB (A) bzw. der CRE- und FOXO-Aktivität (B) werden mit Sternchen angezeigt. Die Prüfung der Werte auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels *two-way* ANOVA und anschließendem *post-hoc* Test nach Tukey.

Das pharmakologische Profil der Thermo-TRP-Kanäle hinsichtlich der RuR- und 2-APB-Sensitivität ist in Tabelle 4 zusammengefasst. Falls in wissenschaftlichen Publikationen

(Colton and Zhu , Zholos 2010, Chen, Zeng et al. 2012, Holzer and Izzo 2014, Moran 2018, O'Malley, Seibt et al. 2020) ein Einfluss von RuR oder 2-APB auf den jeweiligen TRP-Kanal gezeigt werden konnte, wurde dies in der Tabelle mit einem Haken dargestellt. Falls gezeigt werden konnte, dass der Kanal nicht sensitiv für den jeweiligen Modulator ist, wurde dies mit einem Kreuz markiert, und falls keine Daten zu der Interaktion zwischen 2-APB oder RuR und dem TRP-Kanal publiziert worden sind, wurde dies mit N/V (nicht verfügbar) markiert.

Tabelle 4: Pharmakologisches Profil der TRP-Kanäle

In der ersten Reihe sind die verschiedenen TRP-Kanäle dargestellt. Gibt es verlässliche Daten, die eine Sensitivität des TRP-Kanalmodulators in Spalte 1 belegen, ist dies mit einem Haken dargestellt. Gibt es hingegen verlässliche Daten, die zeigen konnten, dass der Modulator keinen Einfluss auf den jeweiligen TRP-Kanal hat, wurde dies mit einem Kreuz markiert. Sind keine Daten verfügbar wurde dies mit N/V markiert.

| | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 | M8 | V1 | V2 | V3 | V4 |
|--------------|----|----|----|-----|-----|----|----|----|----|----|
| RuR | X | ✓ | ✓ | N/V | N/V | ✓ | X | X | X | X |
| 2-APB | X | ✓ | ✓ | X | X | ✓ | X | ✓ | ✓ | X |

Vergleicht man das in Tabelle 4 dargestellte pharmakologische Profil der exprimierten TRP-Kanäle mit dem in Abb. 26 gezeigten Effekt von 2-APB bzw. RuR auf die CRE-Aktivität, wird ersichtlich, dass TRPM2, TRPM3 oder TRPM8 möglicherweise die temperaturabhängige CRE-Reporteraktivierung vermitteln.

TRPM2 wurde als hypothalamischer Hitzesensor beschrieben und wird bei physiologischen Temperaturen aktiviert (Song, Wang et al. 2016). Auch TRPM3 kann bei physiologischen Temperaturen aktiviert werden (Vriens and Voets 2018). Daher wurden im Folgenden Mefenaminsäure (MefAc), ein TRPM-Kanalinh inhibitor mit erhöhter Spezifität für TRPM3, und Flufenaminsäure (FluAc), ein nicht-selektiver TRPM-Kanalinh inhibitor (Chen, Zeng et al. 2012), eingesetzt, um den möglichen Einfluss auf die temperaturabhängige CRE-Aktivität zu prüfen. Um eine mögliche Beteiligung des kälteinduzierten TRPM8-Kanals zu untersuchen, wurde der Kanalinh inhibitor BCTC verwendet. Zusätzlich wurde SKF96365 als Inhibitor von *stromal interaction molecule* (STIM)/Orai verwendet (Zou, Gao et al. 2011), um eine Beteiligung von

speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom (*store operated calcium entry*, SOCE) am Temperatureffekt zu prüfen. STIM1 wurde kürzlich als thermosensitives Protein, welches in Zusammenarbeit mit Orai den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel beeinflussen kann, beschrieben (Liu, Wang et al. 2019). Um außerdem noch die generelle Beteiligung von Ca^{2+} an der (temperaturabhängigen) CRE-Aktivität zu untersuchen, wurde 1,2-Bis-(2-aminophenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure-tetrakis-(acetoxymethyl)-ester (BAPTA-AM), ein zellmembranpermeabler Ca^{2+} -Chelator, verwendet. In Abb. 28 ist der Einfluss von 2-APB, RuR, SKF96365, BAPTA-AM, BCTC, MefAc und FluAc auf die temperaturabhängige CRE-Aktivität dargestellt.

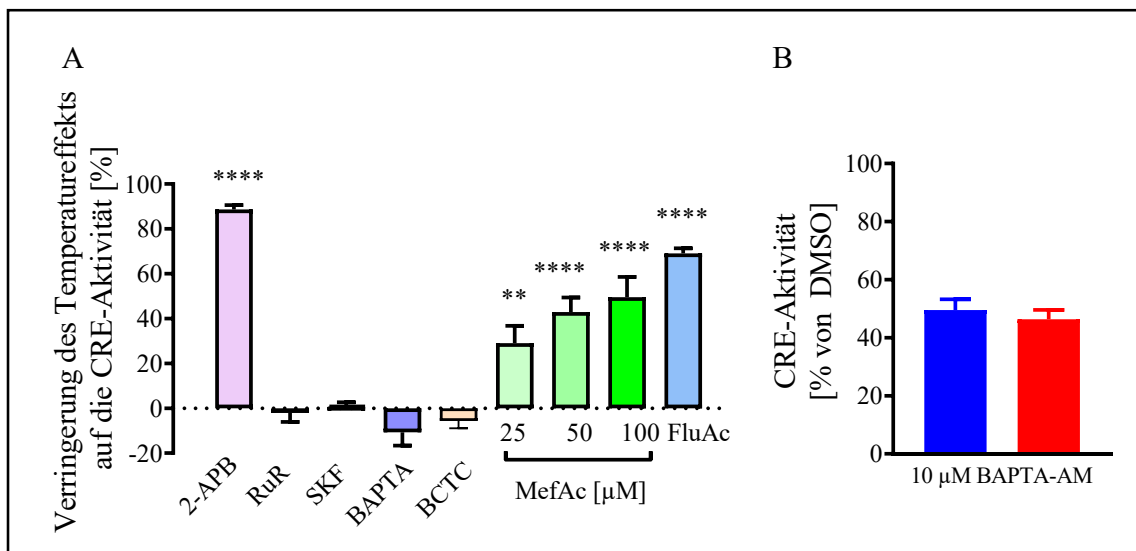


Abb. 28: Einfluss von TRP-Kanalmodulatoren auf die temperaturabhängige CRE-Aktivität (AP)

mHypoA-2/10-CREB-Zellen wurden 4 h im AP bei 36 oder 38 °C mit oder ohne 30-minütiger Präinkubation des jeweiligen Inhibitors inkubiert und anschließend wurde die Luciferaseaktivität bestimmt. **(A)** Einfluss von 100 µM 2-APB, 10 µM RuR, 10 µM SKF96365, 10 µM BAPTA-AM, 5 µM BCBC, 25 – 100 µM MefAc und 100 µM FluAc auf die temperaturabhängige CRE-Aktivierung. Die Berechnungen dazu können in Kapitel 3.6 nachvollzogen werden. Der Einfluss von 2-APB wurde bereits in Abb. 26 gezeigt. Zur besseren Vergleichbarkeit werden hier die Daten erneut präsentiert. Darstellung aus 11 (2-APB, RuR), 3 (SKF96365, BAPTA-AM, BCTC, FluAc) und 5 (MefAc) voneinander unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM. Signifikante Unterschiede zwischen der Lösemittelkontrolle und dem jeweiligen Inhibitor wurden mit Sternchen markiert. Die Prüfung der Werte auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels *one-way* ANOVA und anschließendem *post-hoc* Test nach Tukey. **(B)** Der Einfluss von BAPTA-AM auf die CRE-Aktivität ist im Vergleich zu der Lösemittelkontrolle dargestellt. Hierfür wurde die CRE-Aktivität der Lösemittelkontrolle zu 100 % gesetzt und die CRE-Aktivität der BAPTA-AM-

Inkubation dazu skaliert. Die Prüfung der Werte auf signifikante Unterschiede zwischen 36 und 38 °C erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test.

2-APB inhibierte den Temperatureffekt, wie bereits in Abb. 26B gezeigt, annähernd vollständig, während RuR, SKF96365, BAPTA-AM und BCTC keinen signifikanten Effekt auf die temperaturabhängige CRE-Reporteraktivität hatten. BAPTA-AM reduzierte die CRE-Aktivität unabhängig von der Temperatur im Vergleich zu der Lösemittelkontrolle auf etwa 50 % (siehe Abb. 28B). MefAc führte dosisabhängig zu einer Verringerung des Temperatureffekts. Auch FluAc konnte die temperaturabhängige CRE-Aktivierung um $69,5 \pm 2,5$ % hochsignifikant inhibieren.

Zusammenfassend konnte hier gezeigt werden, dass mit 2-APB, MefAc und FluAc die CREB-abhängige Reporteraktivierung temperaturabhängig moduliert werden konnte. In zukünftigen Experimenten wäre es interessant, den Einfluss von Mitgliedern der TRPM-Familie auf die CRE-Aktivierung durch gezielte Verringerung der Proteinexpression mittels RNA-Interferenz genauer zu untersuchen.

4.3 Einfluss der Temperatur auf die Liganden-induzierte Reporteraktivität

Bislang wurde der Einfluss der Temperatur auf die basale Zellantwort betrachtet. Im Folgenden wurde nun das Augenmerk auf temperaturabhängige Effekte nach Stimulation mit Liganden und Hormonen gerichtet.

Zunächst wurde die mRNA-Expression von Transmembranrezeptoren in mHypoA-2/10-Zellen mittels RNAseq (siehe Kapitel 3.2.3) überprüft. Abb. 29 ist zu entnehmen, dass endogen eine Reihe von Rezeptoren exprimiert wird. So konnten beispielsweise Adrenozeptoren, Purinrezeptoren, wie der Adenosinrezeptor A_{2B} (AdR_{2B}), und der Bradykininrezeptor B2 (B2R), nachgewiesen werden. Durch die endogene Expression vieler Rezeptoren waren die verwendeten mHypoA-2/10-Zellen geeignet, um den Einfluss von Temperaturänderungen auf Liganden-induzierte Signalweiterleitung zu studieren. Im Folgenden sollte daher die Aktivierung des CREB-abhängigen Reporters nach Stimulierung von BK- und AR-Rezeptoren untersucht werden.

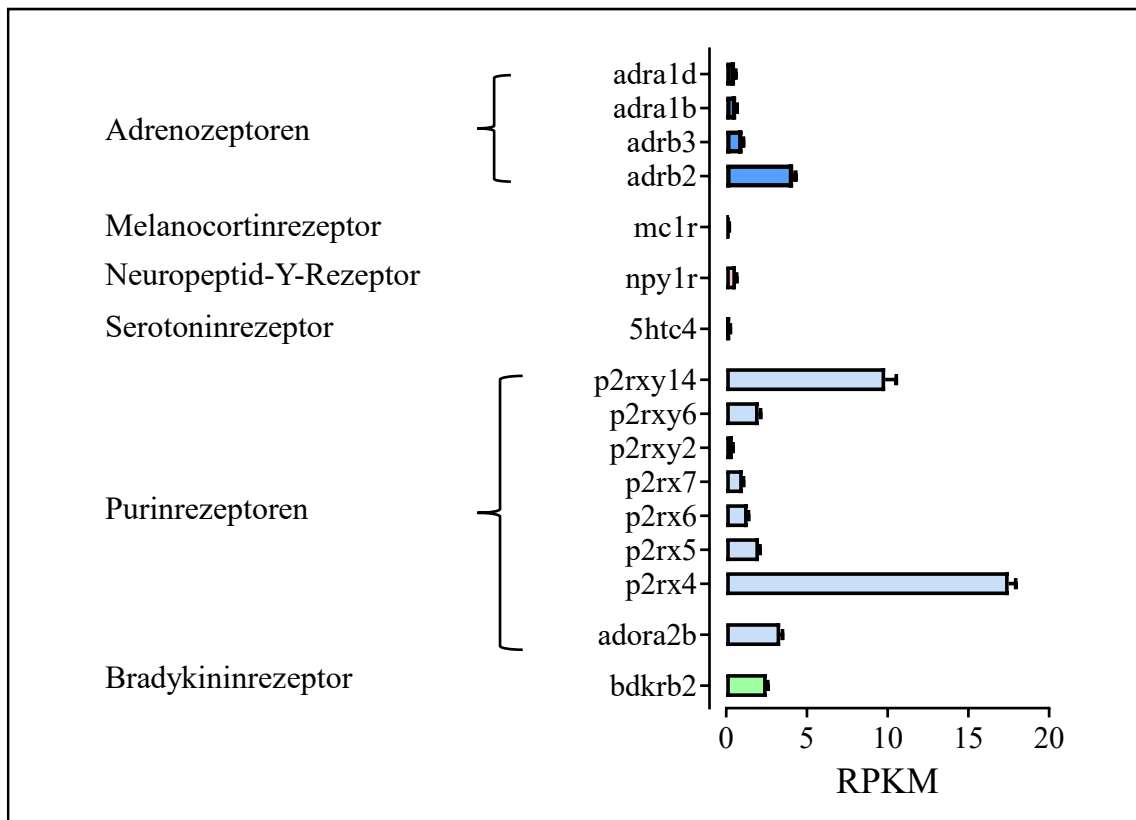


Abb. 29: Expression ausgewählter Rezeptoren in mHypoA-2/10-Zellen

Die Expression ausgewählter Transmembranrezeptoren ist in *reads per kilo base per million mapped reads* (RPKM) gezeigt. Die präsentierten Daten wurden durch totale RNAseq erhalten (siehe Kapitel 3.2.3). Es sind Daten aus sechs voneinander unabhängigen Zellpopulationen als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

4.3.1 Einfluss auf die CRE-Reporteraktivität

4.3.1.1 Bradykininrezeptoren

Der B2R ist ein $G_{q/11}$ - und G_i -gekoppelter Rezeptor, weshalb die Aktivierung unter anderem zu einer erhöhten zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration führt. Vorversuche innerhalb der Arbeitsgruppe zeigten, dass Stimulation des B2R mit BK in einer PKC-vermittelten Phosphorylierung von CREB in mHypoA-2/10-Zellen resultiert (siehe Kapitel 1.4.1).

Zunächst wurden mHypoA-2/10-CREB-Zellen bei 37 °C mit BK stimuliert, um so die funktionelle Expression des B2Rs zu bestätigen. Anschließend wurde die CREB-abhängige Luciferaseaktivität bestimmt (Abb. 30A). Nach 2 h Stimulation war bereits

eine hochsignifikante BK-induzierte CRE-Aktivität festzustellen, die nach 4 h auf das $26,9 \pm 0,4$ -fache der basalen Aktivität gesteigert wurde.

Um auch den Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach Stimulierung mit BK in dem verwendeten hypothalamischen Zellsystem zu überprüfen, wurde das Ca^{2+} -sensitive Photoprotein Aequorin verwendet. Die Expression von Aequorin mit nachfolgender Stimulierung durch BK, führte innerhalb weniger Sekunden zu einem $26,5 \pm 5,4$ -fachen Anstieg der basalen Ca^{2+} -Konzentration (Abb. 30B). Aufbauend auf diesen Befunden wurde untersucht, ob die Stimulierung des B2R mit seinem endogenen Liganden BK, zu einer temperaturabhängigen CRE-Aktivierung führt.

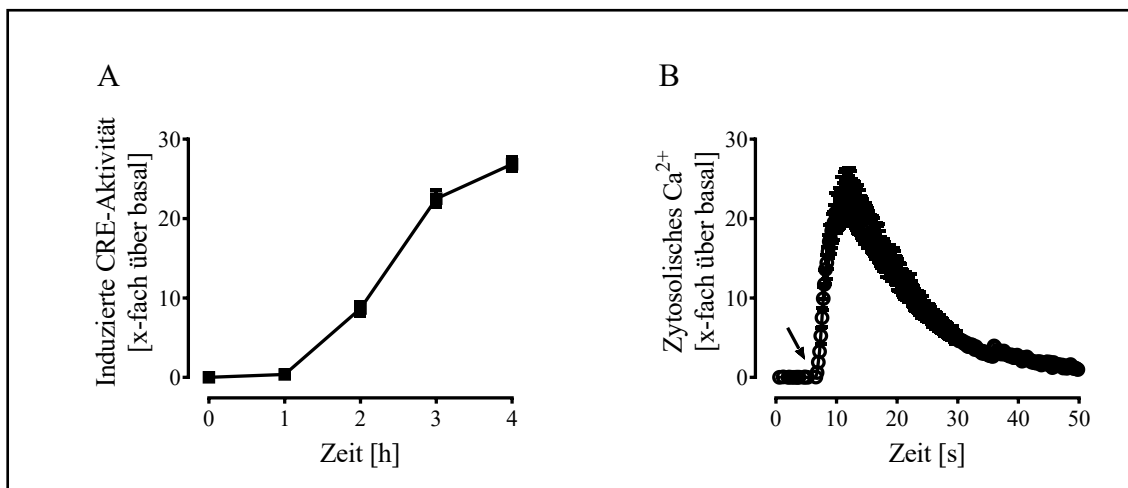


Abb. 30: Funktioneller Nachweis des B2Rs in mHypoA-2/10-Zellen

(A) mHypoA-2/10-CREB-Zellen wurden mit $1 \mu\text{M}$ BK für 1 – 4 h bei 37°C stimuliert und die Luciferaseaktivität bestimmt. Die BK-induzierte CRE-Aktivität ist als x-faches über dem Basalwert dargestellt. (B) In mHypoA-2/10-CREB Zellen wurde die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration als x-faches über dem Basalwert bestimmt (siehe Kapitel 3.6). Hierfür wurden 1×10^6 Zellen mit dem Aequorinplasmid ($10 \mu\text{g}$) transfiziert und am nächsten Tag mit einer 0,5-prozentigen Coelenterazinlösung für 30 min inkubiert. Anschließend wurde BK (Zielkonzentration $1 \mu\text{M}$) oder Pufferlösung injiziert (siehe Kapitel 3.2.4). Der Pfeil in der Abbildung gibt den Zeitpunkt der Injektion an ($t=5$ s). Es sind Daten aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

Die Zellen wurden hierfür im CP inkubiert und nach 4 – 7 h bei 36 oder 38°C 1 – 4 h mit BK stimuliert. Anschließend wurde die BK-induzierte CREB-Aktivierung mittels Messung der Luciferaseaktivität bestimmt.

In Abb. 31A ist der Versuchsablauf schematisch dargestellt. Die Stimulierung von mHypoA-2/10-CREB-Zellen mit BK führte zu einer Aktivierung des CRE-Reporters, welche allerdings unabhängig von der Inkubationstemperatur war. In Abb. 31B ist erkennbar, dass sich die x-fache Aktivierung des Reporters über den Basalwert bei 36 °C nicht signifikant von der bei 38 °C unterschied. Somit erfolgt die Aktivierung des B2R unter den beschriebenen Bedingungen unabhängig von der Inkubationstemperatur.

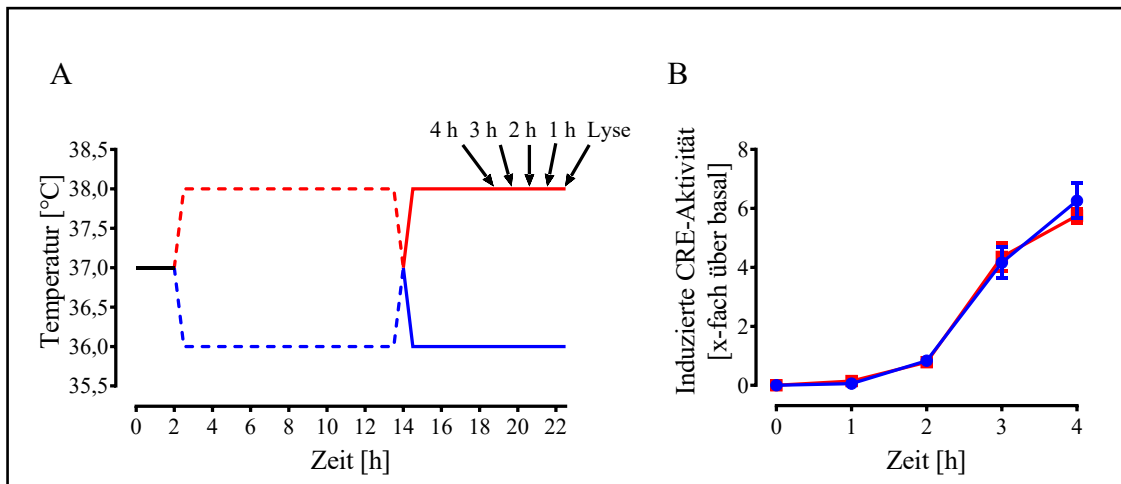


Abb. 31: BK-induzierte CRE-Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur (CP)

mHypoA-2/10-CREB-Zellen wurden im CP inkubiert. Nach 4 – 7 h bei 36 oder 38 °C wurde 1 bis 4 h mit 1 μ M BK stimuliert. Die Zellen waren somit insgesamt 8 h bei der angegebenen Temperatur inkubiert. **(A)** Schematische Darstellung zur Durchführung des Experiments. Die Pfeile geben den Zeitpunkt an, bei der für die angegebene Zeit stimuliert wurde bzw. wann die Zellen lysiert wurden. **(B)** Die BK-induzierte CRE-Aktivität ist als x-faches über dem Basalwert, in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer, bei 36 und 38 °C angegeben. Es sind Daten aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen der BK-induzierten CREB-Aktivität bei 36 und 38 °C erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test.

4.3.1.2 Adrenerge Rezeptoren

Die mRNA-Expression von AR in mHypoA-2/10-Zellen kann Abb. 29 entnommen werden. Hauptsächlich exprimiert werden β_2 - und β_3 -AR, zu einem geringeren Ausmaß auch α_{1b} - und α_{1d} -AR. Sie werden physiologisch durch Adrenalin und NA aktiviert und führen über Aktivierung von G_s -Proteinen (β_2 -/ β_3 -AR) zu einer erhöhten AC-Aktivität und cAMP-Akkumulation, oder über G_q -Proteine (α_{1b} -/ α_{1d} -AR) zu einer erhöhten PLC β -Aktivität mit Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels (siehe Kapitel 1.4.2) (Strosberg

1993). Analog zu den Bradykininrezeptoren sollte zunächst überprüft werden, ob die AR auch funktionell in mHypoA-2/10-Zellen exprimiert werden.

Hierfür wurden die Zellen für verschiedene Zeitpunkte mit 10 μ M NA stimuliert und die Luciferaseaktivität im Anschluss bestimmt. Abb. 32A zeigt, dass bereits nach einstündiger NA-Stimulierung eine signifikante Zunahme der CREB-abhängigen Reporteraktivität gemessen wurde, die etwa nach 3 h ihren Höhepunkt erreichte. Die Signalstärke war mit dem etwa 80-fachen der basalen CREB-Aktivität äußerst hoch.

Um die Frage zu beantworten, ob die NA-induzierte CREB-Aktivität abhängig von der Inkubationstemperatur ist, wurden die Zellen im CP inkubiert und nach 4 – 7 h bei der angegebenen Temperatur 1 – 4 h mit NA stimuliert (vgl. Abb. 31). Abb. 32B zeigt die induzierte CRE-Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur. Stimulation der Zellen für 4 h mit NA im CP führte zu einer über den Basalwert hinausgehenden temperaturabhängigen Aktivierung des CREB-abhängigen Reporters. Die induzierte CREB-Aktivität war bei 36 °C um $38,5 \pm 3,9$ % höher als bei 38 °C (Abb. 32C). Interessanterweise führt eine Aktivierung von ARs unter den gewählten Bedingungen also zu einer temperaturabhängigen CREB-abhängigen Genexpression. In Abb. 32D ist zusätzlich noch die NA-induzierte CRE-Aktivierung nach Inkubation der Zellen im AP dargestellt. Damit sollte überprüft werden, ob die zuvor beschriebenen Effekte direkt abhängig von der Temperatur waren. Die temperaturabhängige Aktivierung des CRE-Reporters im AP war vergleichbar mit der im CP bestimmten. Somit konnte gezeigt werden, dass eine Änderung der Inkubationstemperatur direkt zu einer signifikanten Veränderung der NA-induzierten CRE-Aktivität führt.

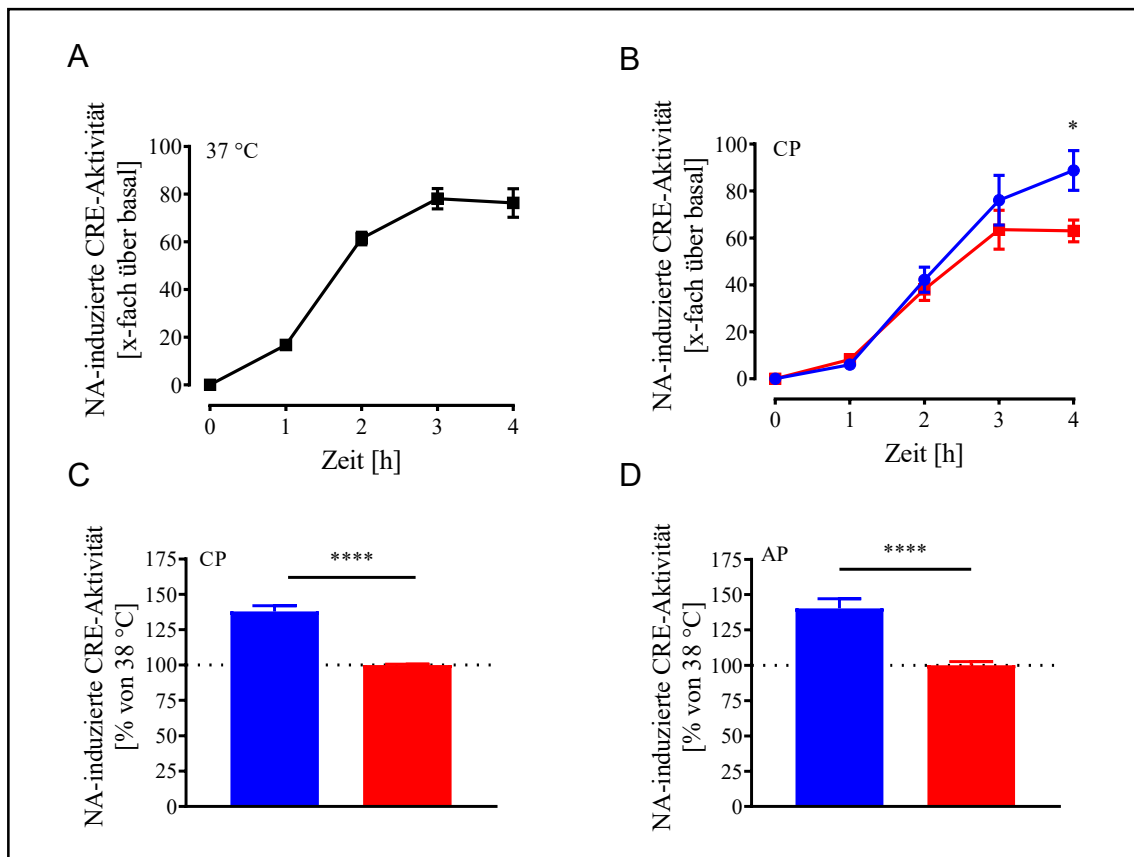


Abb. 32: NA-vermittelte CRE-Aktivität in mHypoA-2/10-Zellen

mHypoA-2/10-CREB-Zellen wurden 1 – 4 h bei 37 °C (A), im CP bei 36 und 38 °C (B, C) oder im AP bei 36 und 38 °C (D) mit 10 μ M NA stimuliert. Im Anschluss wurde die Luciferaseaktivität bestimmt. Die NA-induzierte CRE-Aktivierung ist in Abhängigkeit von der Stimulationszeit bei 37 (A) bzw. 36 oder 38 °C (B) als x-faches über dem Basalwert dargestellt (siehe Kapitel 3.6). C zeigt die Normierung der Messwerte auf 38 °C. Hierfür wurden die bei 38 °C erhaltenen Werte zu 100 % gesetzt. (D) Zum Vergleich der in C dargestellten temperaturabhängigen CRE-Aktivierung im CP, wurde diese auch im AP überprüft. Die Messwerte wurden wie in C normiert. Es sind Daten aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen der CRE-Aktivität bei 36 und 38 °C wurden mit Sternchen markiert. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen der NA-induzierten CRE-Aktivität bei 36 und 38 °C erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test.

4.3.2 Einfluss auf die prepro-TRH-Promotoraktivität

Nachdem die CREB-abhängige Reporteraktivierung abhängig von der Temperatur war, wurde untersucht, ob die NA-induzierte prepro-TRH-Promotoraktivität (siehe Kapitel 1.3.3) möglicherweise ebenso abhängig von Temperaturänderungen war. Hierfür wurden mHypoA-2/10-TRH-Zellen untersucht. Diese wurden im AP mit NA inkubiert und die Luciferaseaktivität zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt.

In Abb. 33 ist die NA-induzierte prepro-TRH-Aktivität nach 1 – 4 h bei 36 oder 38 °C dargestellt. Zuvor konnte bereits gezeigt werden, dass die basale Promotoraktivität abhängig von der Temperatur war (siehe Abb. 17). Hier ist nun erkennbar, dass auch die NA-induzierte prepro-TRH-Aktivität durch Temperaturänderungen verändert war. Bereits nach 2 h Stimulation konnte ein signifikanter Unterschied in der Reporteraktivität festgestellt werden. Nach Berücksichtigung der basalen Temperaturabhängigkeit des Promotors war nach 3 h Stimulation ein signifikanter Unterschied zwischen 36 und 38 °C zu sehen (Abb. 33B). Die NA-vermittelte Wirkung auf den prepro-TRH-Promotor war somit abhängig von der Temperatur und nach 3 h bei 36 °C um $75,1 \pm 12,3 \%$ erhöht.

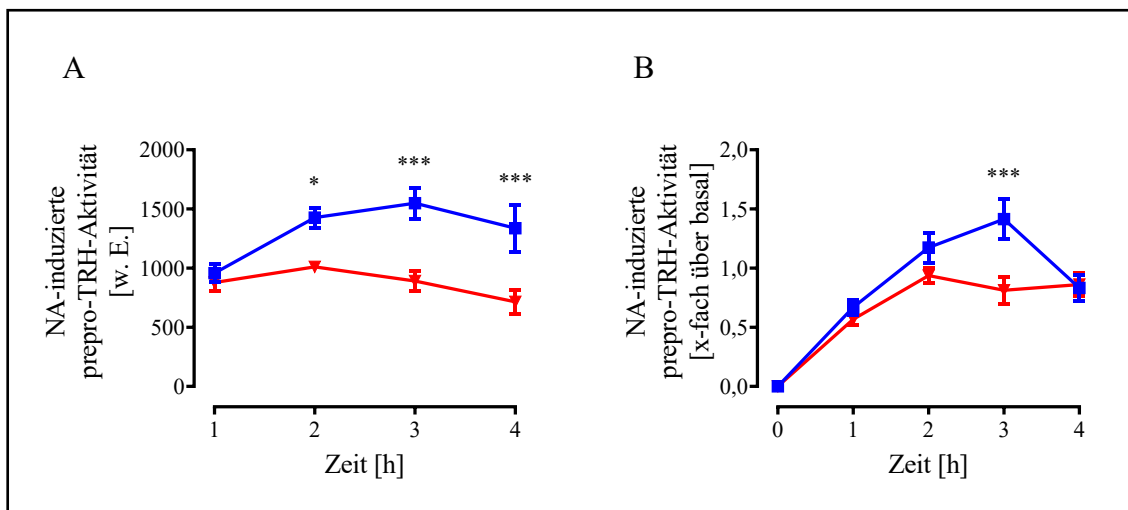


Abb. 33: NA-induzierte TRH-Reporteraktivität (AP)

mHypoA-2/10-TRH-Zellen wurden bis zu 4 h mit NA (10 μ M) bei 36 oder 38 °C stimuliert. Anschließend wurde die Luciferaseaktivität bestimmt. (A) Die NA-induzierte prepro-TRH-Aktivität ist in Abhängigkeit von der Stimulationszeit dargestellt. (B) Die Normierung der gemessenen Rohwerte auf das x-fache des Basalwerts ist präsentiert. Es sind Daten aus drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen 36 und 38 °C erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test. Signifikante Unterschiede wurden mit Sternchen markiert.

4.3.3 Einfluss auf die STAT-Promotoraktivität

Temperaturänderungen führten zu einer veränderten CREB-abhängigen Genexpression in mHypoA-2/10-Zellen. Auch der prepro-TRH-Promotor wurde von physiologischen Temperaturänderungen reguliert. Der Promotor hat neben einer CREB- auch eine STAT-

Bindestelle. Die Bindung dieser Transkriptionsfaktoren kann daher zu einer Aktivierung des prepro-TRH-Promotors führen (siehe Kapitel 1.3.2.1).

Um den Beitrag der STAT-Transkriptionsfaktoren an der NA-induzierten prepro-TRH-Aktivität zu untersuchen, wurde untersucht ob mHypoA-2/10-Zellen mit stabil exprimierenden STAT-abhängigen Reportergen (mHypoA-2/10-STAT) auf eine NA-Stimulierung mit einer erhöhten STAT-Aktivität reagieren. Hierfür wurden die Zellen im CP stimuliert und mit Zellen, die bei 37 °C stimuliert wurden, verglichen. In Abb. 34 ist zu erkennen, dass die basale STAT-Aktivität durch Stimulation mit NA nicht erhöht wurde, sondern überraschenderweise verringert wurde (36 °C $20,4 \pm 0,2$ %, 37 °C $20,3 \pm 0,5$ %, 38 °C $20,6 \pm 0,3$ %). Diese Verringerung war allerdings nicht abhängig von der Temperatur. Dieser Befund eröffnet daher die Möglichkeit, dass die temperaturabhängige Aktivierung des TRH-Promotors möglicherweise auf die temperaturabhängige NA-induzierte CREB-Aktivität (Abb. 32) zurückzuführen ist.

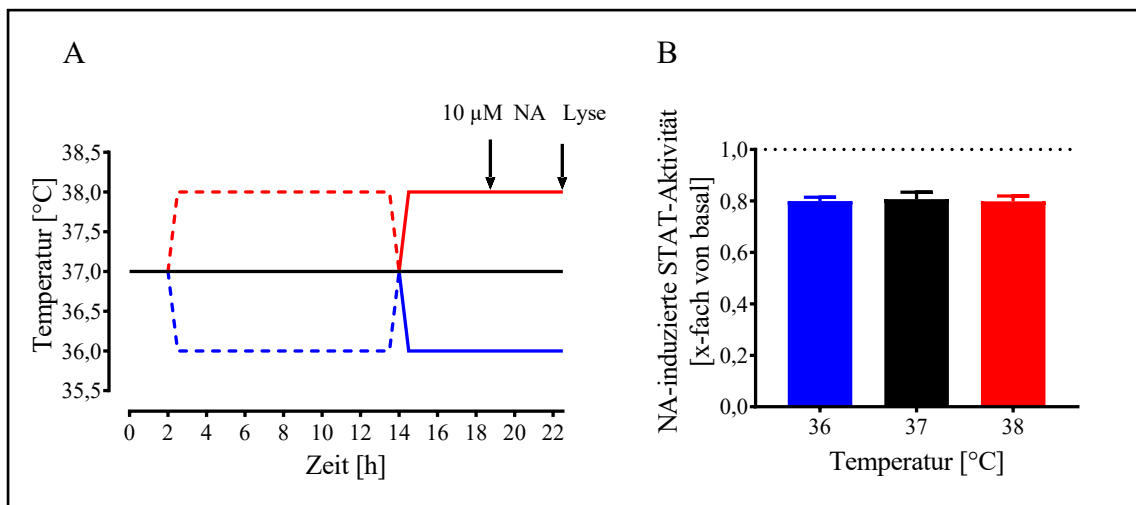


Abb. 34: NA-induzierte STAT-Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur (CP)

(A) Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs. mHypoA-2/10-STAT-Zellen wurden im CP inkubiert und nach 4 h mit NA (10 µM) bei 36 oder 38 °C 4 h stimuliert und mit einer 37 °C-Kontrollinkubation verglichen. Anschließend wurde die Luciferaseaktivität bestimmt. (B) Darstellung der NA-induzierten STAT-Reporteraktivierung in Abhängigkeit von der Temperatur. Es sind Daten aus drei voneinander unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen der STAT-Aktivität bei der jeweiligen Temperatur erfolgte mittels *one-way* ANOVA und *post-hoc* Test nach Tukey. Die Prüfung ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Temperaturen.

4.4 Untersuchung der β -AR-induzierten cAMP-Produktion

Nachdem in Kapitel 4.3.1.2 gezeigt werden konnte, dass die NA-induzierte CRE-Aktivierung nach einer Inkubation der Zellen bei 36 °C höher als bei 38 °C war, sollten im Folgenden die Mechanismen, die zu einer Aktivierung des CRE-Promotors führen, näher untersucht werden.

4.4.1 Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor

Die Interaktion von Molekülen mit Rezeptoren ist abhängig von der freien Energie des Systems, welche maßgeblich durch die vorliegende Temperatur bestimmt wird (siehe Kapitel 1.2.4). Bei der Interaktion zwischen NA und seinem Rezeptor findet bekanntermaßen ein Wechselspiel aus Bindung, Dissoziation und Konformationsänderung statt. Hier sollte daher untersucht werden, ob die Bindung von NA an AR von der Temperatur abhängig ist.

Zuvor sollte geklärt werden, über welchen Rezeptorsubtyp oder welche Rezeptorsubtypen das NA-induzierte CREB-abhängige Signal vermittelt wurde. In dem untersuchten Zellsystem werden sowohl α - als auch β -AR exprimiert (vgl. Abb. 29). In unserer Arbeitsgruppe konnte zuvor bereits gezeigt werden, dass die Inkubation von mHypoA-2/10-Zellen mit Oxymetazolin, einem Agonisten an α_1 -AR, nicht zu einer Erhöhung der CRE-Aktivität führte (Breit et al., Daten nicht gezeigt). Außerdem war bekannt, dass die NA-induzierte Aktivierung des CRE-Reporters nicht durch Phentolamin, einem Antagonisten an α_1 -AR, blockierbar war (Breit et al., Daten nicht gezeigt). Daher wurde im Folgenden getestet, welcher β -AR-Subtyp für die NA-vermittelte CRE-Aktivierung verantwortlich war. Hierfür wurden NA-stimulierte mHypoA-2/10-CREB-Zellen mit steigender Konzentration von entweder SR 59230A, einem selektiven β_3 -AR-Antagonisten, oder ICI 118,551, einem selektiven β_2 -AR-Antagonisten, inkubiert und die Luciferaseaktivität bestimmt (Abb. 35).

Beide Antagonisten konnten die NA-induzierte CRE-Aktivität verringern, was für eine Beteiligung beider Subtypen spricht. Da die verwendeten Inhibitoren bei höheren Konzentrationen NA auch am jeweils anderen Rezeptorsubtyp verdrängen können (Baker 2005), führte die Inkubation mit den Inhibitoren jeweils zu einer vollständigen Inhibition der NA-induzierten Luciferaseaktivität. Anhand dieser Daten wurde im Rahmen dieser

Arbeit davon ausgegangen, dass die NA-induzierte CREB-abhängige Reporteraktivierung durch die Aktivierung von β_2 - und β_3 -AR vermittelt wurde.

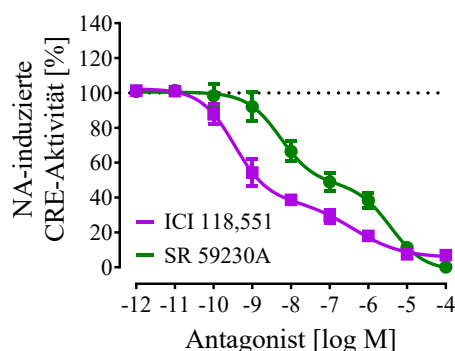


Abb. 35: Inhibierung der NA-induzierten CRE-Aktivität in mHypoA-2/10-CREB-Zellen durch SR 59230A und ICI 118,551

mHypoA-2/10-CREB-Zellen wurden 30 min vor der Stimulation mit NA (10 μ M) mit SR 59230A oder ICI 118,551 (10 pM – 100 μ M) inkubiert. Nach 4 h weiterer Inkubation bei 37 °C wurde die Luciferaseaktivität bestimmt. Die Reporteraktivität wurde auf die NA-induzierte Aktivität ohne Inhibitor normalisiert. Hierfür wurde die NA-induzierte Reporteraktivität zu 100 % gesetzt und die unter Inhibition erhaltenen Messwerte dazu in das Verhältnis gesetzt. Es sind Daten aus drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten dargestellt. Es wurde eine biphasische nicht-lineare Regression in GraphPad 9.1 durchgeführt.

4.4.1.1 Bestimmung der Sättigungsbindung

Radioaktiv markierte Liganden sind ein hilfreiches Werkzeug, um die Wechselwirkung zwischen dem Liganden und seinem Rezeptor zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hierfür [125 I]-(\pm)-Cyanopindolol (125 I-CYP), ein inverser Agonist an β_2 - und in geringerem Ausmaß auch an β_3 -AR, verwendet (Baker 2005).

Zunächst wurde durch Bestimmung der Sättigungsbindung die endogen exprimierte Rezeptormenge quantifiziert. Hierfür wurden Membranpräparationen von mHypoA-2/10-Zellen mit steigenden 125 I-CYP-Konzentrationen inkubiert und anschließend die Bindung bestimmt (siehe Kapitel 3.3.1.1). In Abb. 36A ist die gesamte Bindung (Schwarz) von 125 I-CYP dargestellt, die sich aus der spezifischen Bindung (Rot) an den β_2 -AR und der unspezifischen Bindung an Membranen (Schwarz gestrichelt) ergibt. Die spezifische Bindung von 125 I-CYP in fmol/mg Protein ist in Abb. 36B dargestellt. Daraus geht hervor, dass die maximale Bindung bei $79,4 \pm 4,2$ fmol/mg erreicht war. Diese maximale Bindung zeigt die endogen exprimierte β_2 -AR Menge in mHypoA-2/10-Zellen

an, deren Ausprägung vergleichbar mit anderen endogenen System ist (Hopkinson, Latif et al. 2000). Da ^{125}I -CYP bei höheren Konzentrationen auch an den β_3 -AR bindet, könnte die tatsächliche β_2 -AR-Expression allerdings etwas geringer ausfallen.

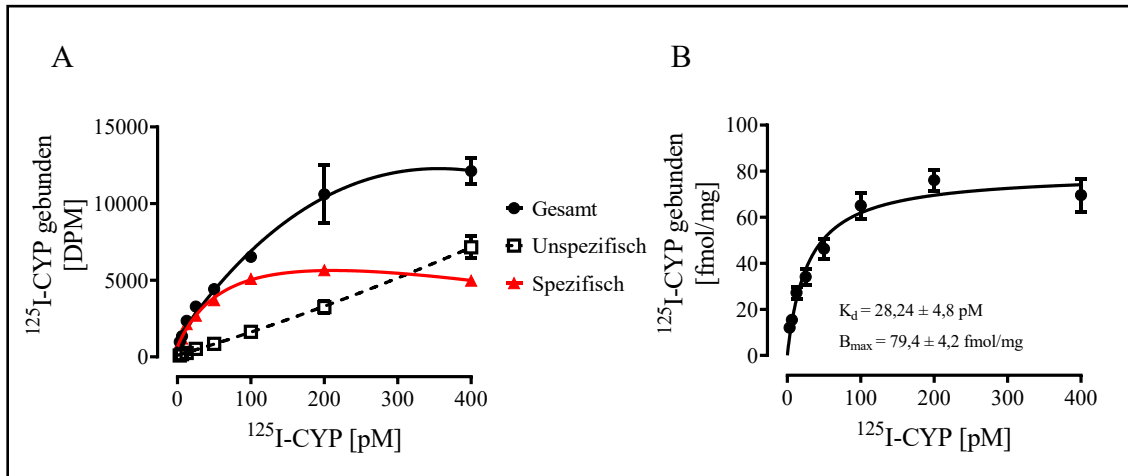


Abb. 36: Bindung von ^{125}I -CYP an Membranpräparationen von mHypoA-2/10-Zellen

10 μg der Zellmembranpräparation (siehe Kapitel 3.1.5) wurden mit 3,125 – 400 pM ^{125}I -CYP 60 min bei 37 °C inkubiert. Um spezifisch gebundenes ^{125}I -CYP an den β_2 -AR zu bestimmen, wurden die Membranen zusätzlich mit 10 μM Propranolol inkubiert. Das gebundene ^{125}I -CYP wurde durch Filtration getrennt und mittels Flüssigszintillationsmessung bestimmt (siehe Kapitel 3.3.5). (A) Darstellung des gebundenen ^{125}I -CYP in DPM in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration. (B) Die spezifische Bindung von ^{125}I -CYP ist in fmol/mg dargestellt (siehe Kapitel 3.6). Es sind Daten aus 3 voneinander unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM präsentiert. Die Berechnung der spezifischen Bindung erfolgte mittels GraphPad 9.1 (*nonlinear regression, saturation binding, one site - total and nonspecific binding*).

4.4.1.2 Untersuchung der Affinität zwischen Liganden und dem β_2 -AR

In Abb. 32B konnte gezeigt werden, dass die NA-vermittelte CREB-Aktivität abhängig von der Inkubationstemperatur war. Um zu untersuchen, ob die Affinität von NA an den β_2 -AR abhängig von der Temperatur ist (und damit für die temperaturabhängige Aktivierung des CRE-Reporters verantwortlich sein könnte), wurden Zellmembranfraktionen mit 75 pM ^{125}I -CYP und steigenden NA-Konzentrationen bei 36 und 38 °C inkubiert.

Abb. 36B ist zu entnehmen, dass durch Inkubation der Membranen mit 75 pM ^{125}I -CYP etwa 75 % der β_2 -AR belegt waren, was eine sinnvolle Zielgröße für

Verdrängungsexperimente ist (Hulme and Trevethick 2010). Die Bindung an den β_3 -AR sollte bei dieser Konzentration keine wesentliche Rolle spielen (Niclauß, Michel-Reher et al. 2006). Es ist zu erkennen, dass sich die Verdrängungskurven bei 36 und 38 °C nicht signifikant voneinander unterscheiden. Außerdem kann der Abbildung entnommen werden, dass der Einsatz von 100 μ M NA nicht ausreichend war, um eine vollständige Verdrängung des 125 I-CYP vom β_2 -AR zu erreichen.

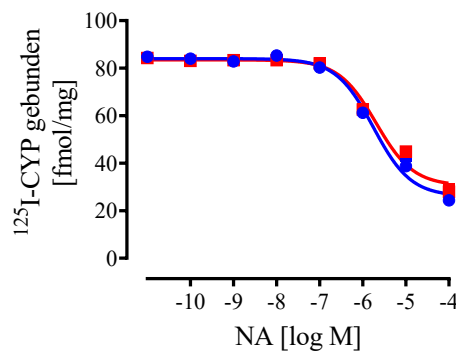


Abb. 37: Temperaturabhängige Verdrängung von 125 I-CYP durch NA an Zellmembranfraktionen von mHypoA-2/10-Zellen (AP)

20 μ g Zellmembran wurden mit 75 pM 125 I-CYP und der angegebenen NA-Konzentration für 60 min bei 36 oder 38 °C inkubiert. Anschließend wurde gebundenes 125 I-CYP durch Filtration und Flüssigszintillationsmessung bestimmt. Gebundenes 125 I-CYP ist in fmol/mg Protein angegeben (siehe Kapitel 3.6). Es sind Daten aus drei voneinander unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM gezeigt. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels *two-way* ANOVA und anschließendem *post-hoc* Test nach Tukey. Es wurde eine nichtlineare Regression in GraphPad 9.1 durchgeführt (*Binding - competitive, one site - fit LogIC₅₀*).

Um mögliche temperaturinduzierte Effekte auf die Bindung an den β_2 -AR studieren zu können, wurde Salmeterol (Sal), ein selektiver β_2 -AR-Agonist, verwendet. Sal besitzt eine deutlich höhere Affinität zum β_2 -AR als NA [K_D (Sal): $0,55 \pm 0,08$ nM; K_D (NA) $3,89 \pm 0,67$ μ M], weshalb eine geringere Konzentration für eine vollständige Verdrängung spezifisch gebundenen 125 I-CYP ausreichen sollte.

In Abb. 38 ist die Verdrängung von gebundenem 125 I-CYP in Abhängigkeit von der verwendeten Sal-Konzentration dargestellt. Es ist erkennbar, dass der Einsatz von Sal zu einer deutlich gesteigerten absoluten Verdrängung führte, die allerdings nicht abhängig von der Temperatur war. Daraus lässt sich schließen, dass die Affinität von Sal an den β_2 -AR nicht abhängig von der Inkubationstemperatur war. Außerdem konnte ein

biphasischer Verlauf der Verdrängung mit zwei IC_{50} -Werten beobachtet werden [$IC_{501} = 2,45/2,13$ pM (36/38 °C); $IC_{502} = 15,13/17,37$ nM (36/38 °C)], worauf in Kürze näher eingegangen wird (siehe Kapitel 4.4.1.3).

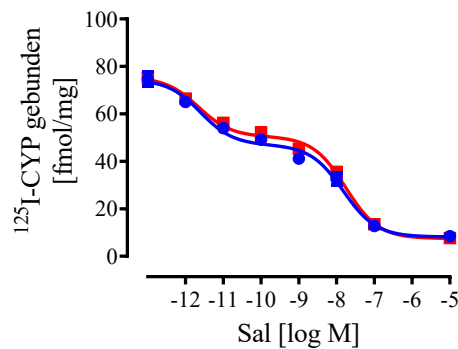


Abb. 38: Temperaturabhängige Verdrängung von ^{125}I -CYP durch Sal an Zellmembranfraktionen von mHypoA-2/10-Zellen (AP)

20 µg Zellmembran wurden mit 75 pM ^{125}I -CYP und 1 pM – 10 µM Sal 60 min bei 36 oder 38 °C inkubiert. Gebundenes ^{125}I -CYP wurde mittels Filtration getrennt und durch Flüssigszintillationsmessung nachgewiesen. Gebundenes ^{125}I -CYP ist in fmol/mg in Abhängigkeit von der verwendeten Sal-Konzentration bei 36 oder 38 °C dargestellt (siehe Kapitel 3.6). Es sind Daten aus sechs voneinander unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM gezeigt. Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen der Bindung bei 36 und 38 °C erfolgte mittels *two-way* ANOVA und anschließendem *post-hoc* Test nach Tukey. Es wurde eine nichtlineare Regression in GraphPad 9.1 durchgeführt (*Binding - competitive, two sites - fit LogIC₅₀*).

Anhand dieser Daten konnte gezeigt werden, dass die Inkubationstemperatur keinen Einfluss auf die Affinität von NA oder Sal zum β_2 -AR nimmt. Darauf aufbauend war es von Interesse, ob die vorherige Inkubation der Zellen im CP zu einer temperaturabhängigen Affinität von NA oder Sal zum β_2 -AR führt.

Hierfür wurden mHypoA-2/10-Zellen im CP inkubiert. 8 h nach dem zweiten Temperaturwechsel wurden Membranen präpariert (siehe S. 66, Abb. 3). Im Anschluss wurde durch Inkubation der Membranpräparationen mit ^{125}I -CYP und NA-Konzentrationen zwischen 0,1 nM und 100 µM die Affinität von NA an den Rezeptor bei 36 oder 38 °C bestimmt. In Abb. 39 lässt sich erkennen, dass der Verlauf der Verdrängungskurve identisch bei 36 und 38 °C ist. Daher nimmt die Vorinkubation der Zellen im CP keinen Einfluss auf die Affinität von NA zum β_2 -AR.

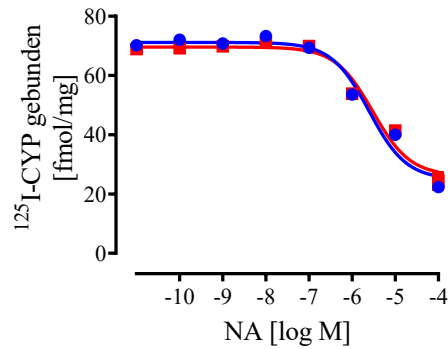


Abb. 39: Temperaturabhängige Verdrängung von ^{125}I -CYP durch NA an Zellmembranfraktionen von mHypoA-2/10-Zellen (CP)

20 μg der Zellmembranfraktion wurden mit 75 pM ^{125}I -CYP und der angegebenen NA-Konzentration 60 min bei 36 oder 38 °C inkubiert. Anschließend wurde gebundenes ^{125}I -CYP durch Filtration und Flüssigszintillationsmessung bestimmt. Gebundenes ^{125}I -CYP ist in fmol/mg in Abhängigkeit von der verwendeten NA-Konzentration bei 36 oder 38 °C dargestellt (siehe Kapitel 3.6). Es sind Daten aus drei voneinander unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM gezeigt. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels *two-way* ANOVA und anschließendem *post-hoc* Test nach Tukey. Es wurde eine nichtlineare Regression in GraphPad 9.1 durchgeführt (*Binding - competitive, one site - fit LogIC₅₀*).

Auch im CP war keine vollständige Verdrängung von ^{125}I -CYP durch NA (100 μM) erzielt worden (vgl. Abb. 37 und Abb. 39). Deshalb wurde im Anschluss wieder die Verdrängung von ^{125}I -CYP durch Sal untersucht.

Hierfür wurden die präparierten Membranen nach Inkubation der Zellen im CP bei 36 oder 38 °C 60 min mit ^{125}I -CYP und Sal inkubiert und mittels Flüssigszintillationsmessung gebundenes ^{125}I -CYP bestimmt. Abb. 40 ist zu entnehmen, dass kein signifikanter Unterschied zwischen der Verdrängungskurve bei 36 °C und der bei 38 °C festgestellt werden konnte. Die durchgeführten Experimente konnten daher zeigen, dass die Bindung von β_2 -AR-Liganden weder abhängig von akuten (AP) noch circadianen (CP) Temperaturänderungen ist.

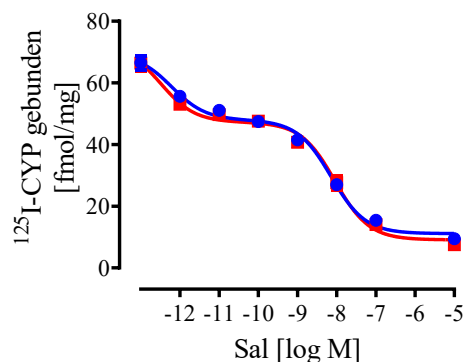


Abb. 40: Temperaturabhängige Verdrängung von ^{125}I -CYP durch Sal an Zellmembranfraktionen von mHypoA-2/10-Zellen (CP)

mHypoA-2/10-Zellen wurden im CP inkubiert. 8 h nach dem zweiten Temperaturwechsel wurden Membranen präpariert (siehe Abb. 3). 20 μg der Zellmembranfraktion wurden anschließend bei 36 oder 38 °C 60 min mit 75 pM ^{125}I -CYP und 1 pM – 10 μM NA inkubiert. Danach wurde gebundenes ^{125}I -CYP mittels Filtration getrennt und durch Flüssigszintillationsmessung nachgewiesen. Die erhaltenen Messwerte sind in fmol/mg, in Abhängigkeit von der Sal-Konzentration und der Inkubationstemperatur dargestellt (siehe Kapitel 3.6). Es sind Daten aus vier voneinander unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM gezeigt. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen der Bindung bei 36 und 38 °C erfolgte mittels *two-way* ANOVA und anschließendem *post-hoc* Test nach Tukey. Es wurde eine nichtlineare Regression in GraphPad 9.1 durchgeführt (*Binding - competitive, two sites - fit LogIC₅₀*).

4.4.1.3 Einfluss der Temperatur auf die Rezeptorkonformation

Zuvor wurde bereits beschrieben, dass die Verdrängung von ^{125}I -CYP durch Sal zu einer biphasischen Verdrängung mit zwei definierten IC_{50} -Werten führte (siehe Abb. 38 und Abb. 40). Dafür gibt es mindestens zwei mögliche Erklärungen: Zum einen könnte ^{125}I -CYP an beide AR-Subtypen, β_2 - und β_3 -AR, binden und von diesen verdrängt werden. Zum anderen könnte Sal an die Konformationen [R] und [R*] des β_2 -AR binden (siehe

Kapitel 1.4.2.1). Um zu beantworten, welche Ursache für den biphasischen Verlauf der Sal-Verdrängungskurve verantwortlich war, wurde Propranolol als Antagonist an β -AR eingesetzt. Propranolol bindet die Konformationen, [R] und [R*], mit gleicher Affinität und sollte somit zu einem monophasischen Verlauf führen (Baker 2005). Wäre auch hier ein biphasischer Verlauf erkennbar, würde dies für eine Bindung von ^{125}I -CYP an beide Rezeptorsubtypen sprechen, da Propranolol mit mehr als 100-fach erhöhter Affinität an β_2 - als an β_3 -AR bindet (Baker 2005).

mHypoA-2/10-Zellen wurden hierfür im CP inkubiert. Anschließend wurden Zellmembranen präpariert. Diese wurden mit ^{125}I -CYP und steigenden Propranololkonzentrationen bei 36 bzw. 38 °C inkubiert. In Abb. 41 ist die ^{125}I -CYP-Bindung in Abhängigkeit von der verwendeten Propranololkonzentration dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass die Verdrängung von ^{125}I -CYP mittels Propranolol zu einem monophasischen Verlauf der Verdrängung führte. Ein biphasischer Verlauf, wie er bei der Verdrängung durch Sal vorlag, ist nicht mehr erkennbar. Dies spricht dafür, dass die Bindung von Sal an [R] und [R*] des β_2 -AR erfolgte.

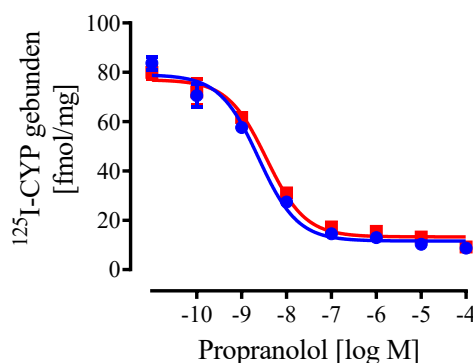


Abb. 41: Verdrängung von ^{125}I -CYP durch Propranolol an Zellmembranfraktionen von mHypoA-2/10-Zellen (CP)

mHypoA-2/10-Zellen wurden im CP inkubiert. 8 h nach dem zweiten Temperaturwechsel wurden Membranen präpariert (siehe Abb. 3). 20 μg der Zellmembranfraktion wurden anschließend bei 36 oder 38 °C 60 min mit 75 pM ^{125}I -CYP und 0,1 nM – 100 μM Propranolol inkubiert. Anschließend wurde gebundenes ^{125}I -CYP mittels Filtration getrennt und durch Flüssigszintillationsmessung bestimmt. Die erhaltenen Messwerte sind in fmol/mg in Abhängigkeit von der Propranololkonzentration und der Inkubationstemperatur dargestellt (siehe Kapitel 3.6). Es sind Daten aus fünf voneinander unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM gezeigt. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen der Bindung bei 36 und 38 °C erfolgte mittels *two-way* ANOVA und anschließendem *post-hoc* Test nach Tukey. Es wurde eine

nichtlineare Regression in GraphPad 9.1 durchgeführt (*Binding - competitive, one site - fit LogIC₅₀*).

Um diese Hypothese näher zu überprüfen, wurde Gpp(NH)p, ein nicht hydrolysierbares GTP-Analogon, eingesetzt (Petrovic, McDonald et al. 1983). Die Ausbildung der hochaffinen Konformation eines GPCRs ist auf die intrazelluläre Bindung des G-Proteins zurückzuführen. Liegt das G-Protein in seiner aktivierbaren Form, GDP-gebunden, vor, so ist eine hochaffine Bindung des Liganden an die Rezeptorkonformation [R*] möglich (siehe Kapitel 1.4.2.1). Mittels Gpp(NH)p lässt sich GDP gezielt vom G-Protein verdrängen und ersetzen. Der Rezeptor wird nun quantitativ in die niederaffine Konformation überführt (Weis and Kobilka 2018).

Um herauszufinden, ob die Bindung von Sal an verschiedene Konformationen des β_2 -AR erfolgte, wurden die Zellen im CP inkubiert, Membranen präpariert und anschließend die Zellmembranfraktionen mit Gpp(NH)p versetzt. Danach erfolgte die Verdrängung von ^{125}I -CYP durch aufsteigende Sal-Konzentrationen bei 36 und 38 °C für 60 min.

In Abb. 42 ist der Einfluss von Gpp(NH)p auf die Verdrängung von ^{125}I -CYP durch Sal dargestellt. Abb. 42A zeigt die Verdrängung von ^{125}I -CYP durch Sal ohne und Abb. 42B mit Vorinkubation der Membranen mit Gpp(NH)p. In Abb. 42C ist schließlich die kombinierte Darstellung präsentiert. Der Abbildung kann entnommen werden, dass die Vorinkubation der Membranen mit Gpp(NH)p zu einer Veränderung der Verdrängungskurve führte. Die Verdrängung von ^{125}I -CYP mit Sal erfolgte nun erst bei höheren Konzentrationen. Die biphasische Verdrängung, wie sie ohne Vorinkubation erkennbar war, wurde deutlich reduziert. Der Kurvenverlauf ähnelte nun mehr einem monophasischen Verlauf. Daran lässt sich erkennen, dass die hochaffine Bindestelle des β_2 -AR durch Gpp(NH)p reduziert wurde. Dies ist graphisch in Abb. 42D dargestellt. Die Reduktion der hochaffinen Bindestelle erfolgte unabhängig von der Temperatur und beträgt für 36 und 38 °C jeweils $37 \pm 6 \%$.

Anhand dieser Resultate wurde deutlich, dass der biphasische Verlauf der Verdrängungskurve von ^{125}I -CYP durch Sal der hoch- und niederaffinen Bindung an den β_2 -AR geschuldet war. In Kombination mit den erhaltenen Daten der ^{125}I -CYP-Verdrängung durch Propranolol konnte hier gezeigt werden, dass der biphasische Verlauf der Sal-Bindung auf die Rezeptorkonformation und nicht auf den Rezeptorsubtyp zurückzuführen ist. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das Verhältnis zwischen

hochaffiner und niederaffiner Bindung nicht abhängig von Temperaturänderungen ist, was theoretisch auch zu einer temperaturabhängigen CRE-Aktivierung hätte führen können.

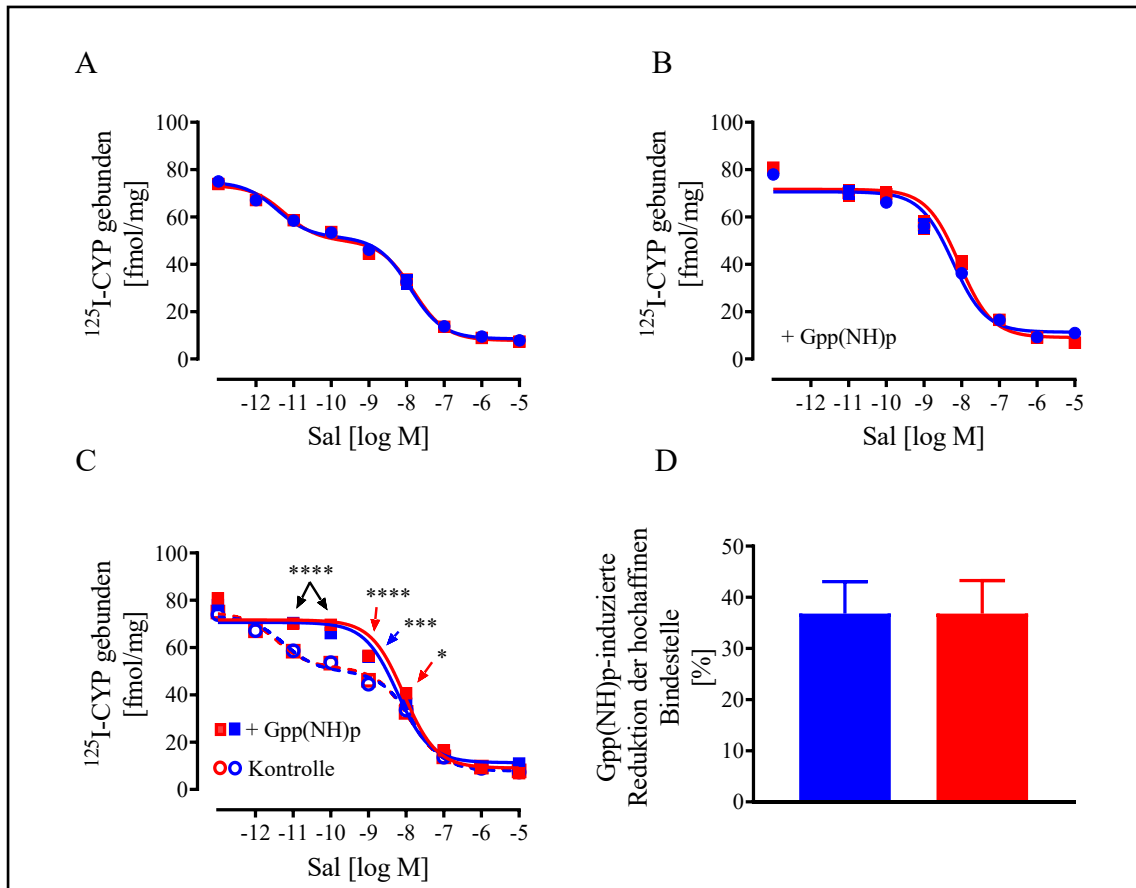


Abb. 42: Bindung von ^{125}I -CYP an den β_2 -AR in Zellmembranfraktionen von mHypoA-2/10-Zellen in Abhängigkeit von der Vorinkubation mit Gpp(NH)p (CP)

mHypoA-2/10-Zellen wurden im CP inkubiert. 8 h nach dem zweiten Temperaturwechsel wurden Membranen präpariert (siehe Abb. 3). 20 μg der Zellmembranfraktion wurden anschließend 20 min mit oder ohne Gpp(NH)p (100 μM) bei 4 °C vorinkubiert und anschließend bei 36 oder 38 °C 60 min mit 75 pM ^{125}I -CYP und 1 pM – 10 μM Sal inkubiert. Anschließend wurde gebundenes ^{125}I -CYP mittels Filtration getrennt und durch Flüssigszintillationsmessung bestimmt. A-C zeigen die Verdrängung von ^{125}I -CYP durch Sal in Abhängigkeit von der Temperatur. **A** und **B** zeigen die Messwerte in fmol/mg mit (B) und ohne (A) Gpp(NH)p. **C** zeigt die kombinierte Darstellung aus A und B in fmol/mg. Es sind Daten aus mindestens drei unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen der Bindung bei 36 und 38 °C erfolgte mittels *two-way* ANOVA und anschließendem *post-hoc* Test nach Tukey. Signifikante Unterschiede zwischen Membranen, die mit und ohne Gpp(NH)p vorbehandelt worden waren, wurden mit Sternchen markiert. Rote Pfeile zeigen den signifikanten Unterschied bei 38, blaue bei 36 °C (E). In **D** ist der Anteil der hochaffinen Bindestelle an der

gesamten Bindung bei 36 und 38 °C in Prozent dargestellt (Berechnung siehe Kapitel 3.6). Es wurde eine nichtlineare Regression in GraphPad 9.1 durchgeführt [*Binding - competitive, one site - fit LogIC₅₀* (B, C); *Binding - competitive, two sites - fit LogIC₅₀* (A, C)].

4.4.1.4 Rezeptorendozytose und -abbau.

Neben der Affinität von Liganden wie NA oder Sal zum β_2 -AR, könnten auch Rezeptordesensibilisierung, -endozytose, oder -abbau, für die in Abb. 15 und Abb. 16 beobachteten temperaturabhängigen Effekte auf die CREB-abhängige Reporteraktivierung, verantwortlich sein. Andauernde Stimulierung kann trotz unverändert vorliegender Konzentration des Liganden zu einer verringerten Zellantwort führen (siehe Kapitel 1.4.2.1). Somit könnte eine erhöhte Rezeptordesensibilisierung oder -endozytose bei einer Inkubation der Zellen bei 38 °C zu einer reduzierten induzierten Aktivierung des CRE-Reporters führen. Im Folgenden sollte daher der Einfluss von der Temperatur auf Rezeptorendozytose und -abbau untersucht werden.

Hierfür wurden mHypoA-2/10-Zellen mit NA bei 36 oder 38 °C 1 h stimuliert, um Endozytose zu induzieren. Die Endozytoserate wurde anschließend mit der von naiven Zellen verglichen. In Abb. 43 ist der Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Endozytoserate unter basalen Bedingungen und nach der Stimulation mit NA dargestellt. Unter basalen Bedingungen waren über 90 % des β_2 -AR an der Zelloberfläche exprimiert (Abb. 43A). Nach einstündiger Stimulation kam es zu einer Verringerung der β_2 -AR-Expression an der Zelloberfläche auf etwa 80 % (Abb. 43B). Die Endozytoserate (Abb. 43C) betrug demnach $9,3 \pm 1,8$ % bei 36 °C und $15,3 \pm 3,2$ % bei 38 °C. Die Tendenz erhöhter NA-induzierter β_2 -AR-Endozytose bei 38 °C war erkennbar, allerdings war der Unterschied statistisch nicht signifikant ($p = 0,1159$) (Abb. 43C).

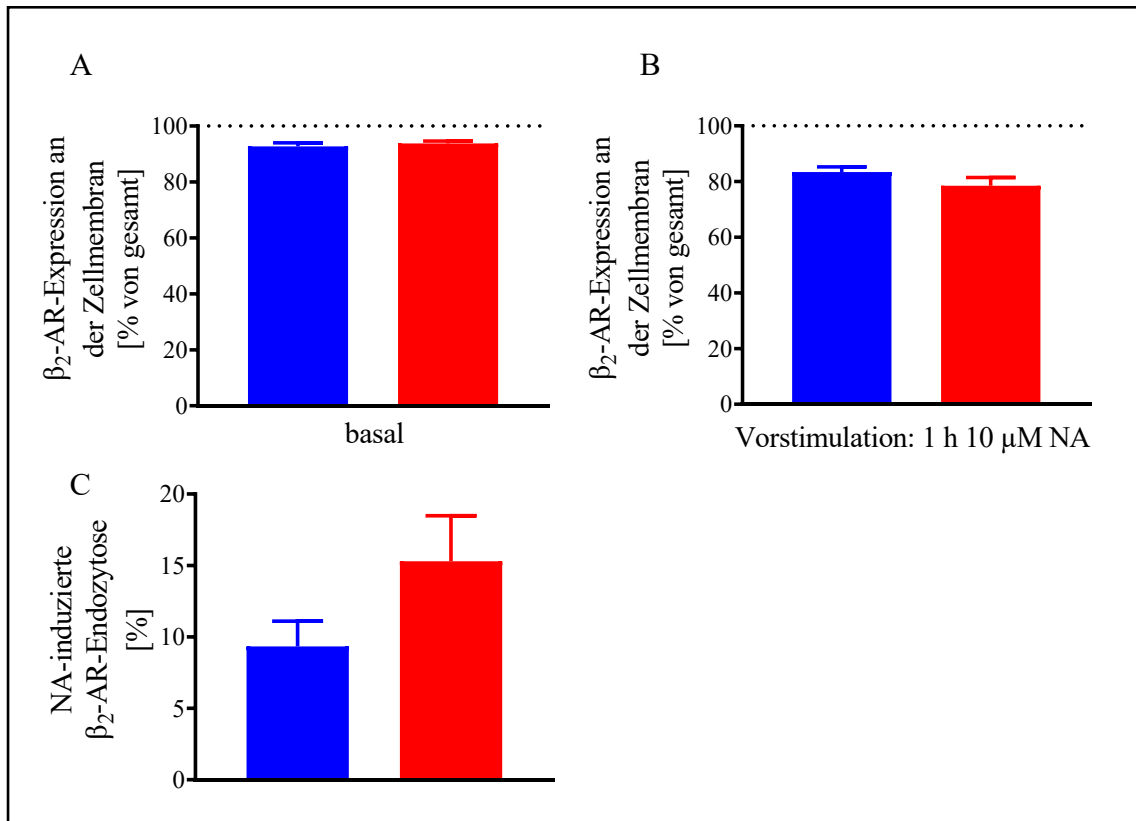


Abb. 43: Bestimmung der NA-vermittelten Rezeptorendozytose von mHypoA-2/10-Zellen

mHypoA-2/10-Zellen wurden entweder 1 h mit NA bei 36 oder 38 °C zur Induktion der Endozytose stimuliert oder direkt durch Abschaben geerntet und in SM resuspendiert. Zur Bestimmung der basalen und NA-induzierten Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche, wurden 400 μ l der Zellsuspension mit 25 pM 125 I-CYP allein oder zusätzlich mit 100 nM CGP1277 oder 10 μ M Propranolol bei 4 °C 16 h inkubiert. Anschließend wurde durch Filtration, gebundenes von nicht-gebundenem 125 I-CYP getrennt und mittels Flüssigszintillationszählung bestimmt. **(A)** Oberflächenexpression des β_2 -AR unter basalen Bedingungen bei 36 oder 38 °C normiert auf die gesamte β_2 -AR-Expression in Prozent. **(B)** Anteil der β_2 -AR-Expression an der Zelloberfläche an der gesamten β_2 -AR-Expression in Prozent nach einstündiger Vorstimulation mit 10 μ M NA bei 36 oder 38 °C. **(C)** Aus A und B errechnete NA-induzierte β_2 -AR-Endozytose in Abhängigkeit von der Temperatur in Prozent. Es sind Daten aus drei unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen 36 und 38 °C erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test. Die Berechnungen können in Kapitel 3.6 nachvollzogen werden.

Auf Rezeptorendozytose folgt entweder das Recycling oder der Abbau des Rezeptors (Zhang, Barak et al. 1997). Der Abbau des Rezeptors kann zu einer verminderten Stimulierbarkeit führen, weshalb überprüft wurde, ob die Degradation des Rezeptors abhängig von der Temperatur war.

Für die Untersuchung des Rezeptorabbaus wurde die Reduktion der spezifischen Bindung nach Stimulation der Zellen mit NA untersucht. In Abb. 44A ist diese in Abhängigkeit von der Vorstimulation bei 36 oder 38 °C dargestellt. In Abb. 44B ist der daraus berechnete β_2 -AR-Abbau gezeigt. Die Vorinkubation von mHypoA-2/10-Zellen mit NA führte zu einer deutlich verringerten spezifischen Bindung, was auf eine verringerte Anzahl an β_2 -AR schließen ließ. Der berechnete Rezeptorabbau betrug bei 36 °C $46,3 \pm 6,0$ % und bei 38 °C $35,0 \pm 1,3$ %. Die Tendenz eines erhöhten Abbaus bei 36 °C war erkennbar ($p = 0,0771$), jedoch statistisch nicht signifikant. Ein erhöhter Rezeptorabbau bei 36 °C würde wahrscheinlich zu einer verringerten Aktivierung der CREB-abhängigen Genexpression führen, was nicht im Einklang mit den in Abb. 16B gezeigten Daten stünde.

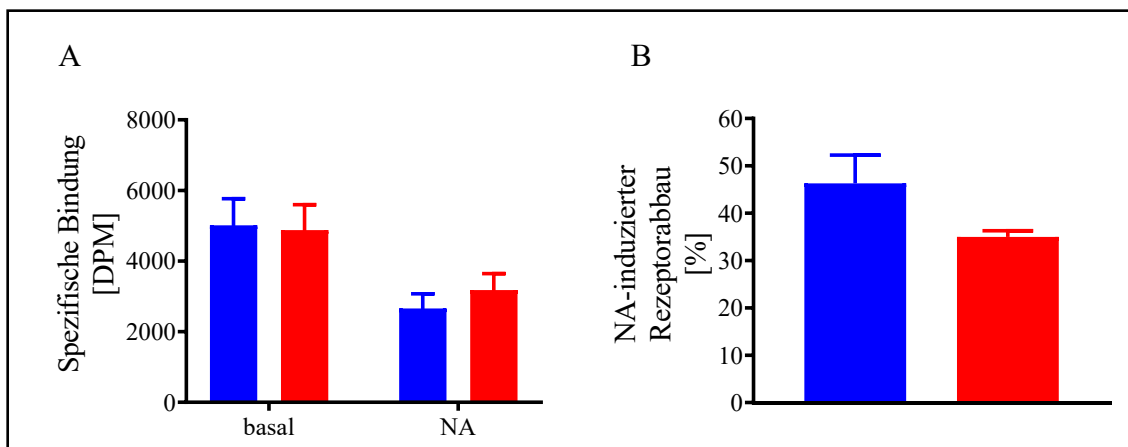


Abb. 44: Spezifische Bindung von ^{125}I -CYP an mHypoA-2/10-Zellen und NA-induzierter Rezeptorabbau

mHypoA-2/10-Zellen wurden entweder 1 h mit NA bei 36 oder 38 °C zur Induktion der Endozytose und des Abbaus stimuliert oder jeweils direkt durch Abschaben geerntet und in SM resuspendiert. Zur Bestimmung der basalen und NA-induzierten Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche, wurden 400 μl der Zellsuspension mit 25 pM ^{125}I -CYP allein oder zusätzlich mit 100 nM CGP1277 oder 10 μM Propranolol bei 4 °C 16 h inkubiert. Anschließend wurde gebundenes von nicht-gebundenem ^{125}I -CYP durch Filtration getrennt und mittels Flüssigszintillationszählung bestimmt. A zeigt die spezifische Bindung von ^{125}I -CYP an den β_2 -AR, in Abhängigkeit von der Temperatur und der einstündigen Vorstimulation mit 10 μM NA in DPM, B den daraus errechneten NA-induzierten Rezeptorabbau in Abhängigkeit von der Temperatur in Prozent. Es sind Daten aus drei unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen 36 und 38 °C erfolgte mittels *two-way* ANOVA (A) bzw. Zweistichproben-t-Test (B). Die Berechnungen können in Kapitel 3.6 nachvollzogen werden.

Zusammenfassend konnte hier gezeigt werden, dass weder die Rezeptorendozytose noch der Rezeptorabbau entscheidend durch Temperaturänderungen reguliert wird. Ebenso ist die Bindung von NA und Sal an den β_2 -AR unter den gewählten Bedingungen nicht abhängig von den untersuchten Temperaturänderungen.

4.4.2 Untersuchung der G-Proteinaktivierung

4.4.2.1 Verwendung von [35 S]-GTP γ S

Zwischen der Bindung von NA oder Sal an den β_2 -AR und nachfolgender cAMP-Akkumulation ist noch die Aktivierung des assoziierten G-Proteins erforderlich. Die G-Proteinaktivität korreliert mit der Hormon-induzierten Rezeptoraktivität, weshalb im Folgenden der Einfluss von Temperatur auf die G-Proteinaktivierung untersucht wurde.

Zunächst wurde die G-Proteinaktivierung, zur Etablierung der Messmethode (Hilf, Gierschik et al. 1989), unter basalen Bedingungen bei 30 °C bestimmt. Die unspezifische Bindung wurde über den Zusatz von Gpp(NH)p ermittelt (siehe Kapitel 3.3.3). In Abb. 45 ist die G-Proteinaktivität in Abhängigkeit von der verwendeten Membranmenge in An- und Abwesenheit von Gpp(NH)p dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass die basale G-Proteinaktivierung von der verwendeten Membranmenge abhängig war und durch den Einsatz von Gpp(NH)p signifikant um bis zu $84,5 \pm 6,5$ % reduziert werden konnte. Unter den gewählten Bedingungen konnte durch Stimulierung mit NA über die basale Aktivität hinaus jedoch keine zusätzliche G-Proteinaktivierung gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Da der verwendete Puffer einen starken Einfluss auf die G-Proteinaktivierung nehmen kann (Bidlack and Parkhill 2004), wurden weitere Puffersysteme getestet, um die Bestimmung einer NA-induzierten G-Proteinaktivierung zu ermöglichen.

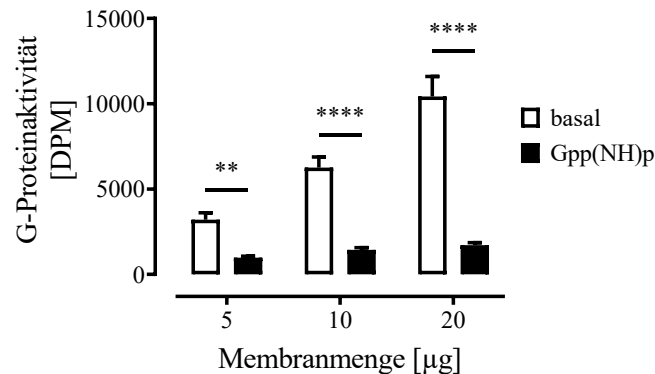


Abb. 45: Basale G-Proteinaktivität in Zellmembranfraktionen von mHypoA-2/10-Zellen in Abhängigkeit von Gpp(NH)p und der Membranmenge

Es wurden Membranen von mHypoA-2/10-Zellen bei 37 °C präpariert. 5, 10, oder 20 µg der Membranfraktion wurden mit 0,1 nM [35 S]-GTPγS bei 30 °C mit oder ohne Gpp(NH)p (100 µM) 30 min inkubiert. Nach Filtration wurde gebundenes [35 S]-GTPγS mittels Flüssigszintillationszählung bestimmt. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels *two-way* ANOVA und anschließendem *post-hoc* Test nach Tukey. Signifikante Unterschiede zwischen der Inkubation mit und ohne Gpp(NH)p wurden mit Sternchen markiert.

Hierfür wurde die G-Proteinaktivierung in dem jeweiligen Puffersystem (siehe S. 85, Tabelle 2) bestimmt. In Abb. 46A ist exemplarisch erkennbar, dass die Wahl des Puffers einen deutlichen Einfluss auf die G-Proteinaktivierung nahm. Die Stimulation mit NA sollte zu einer erhöhten G-Proteinaktivierung führen (Oldham and Hamm 2008). Die Puffersysteme, welche zu einer erhöhten NA-induzierten G-Proteinaktivierung führten, sind zusätzlich exemplarisch in Abb. 46B dargestellt. Abb. 46C zeigt die Summe aus vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Entgegen der Annahme führte keine der getesteten Bedingungen zu einer signifikant induzierten G-Proteinaktivierung in mHypoA-2/10-Zellen. Auch die Verwendung von spezifischen Antikörpern zur Präzipitation des G_s-Proteinsubtyps, um die spezifische Antwort zu erhöhen, lieferte keine verwertbaren Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Die sparsame und rationelle Verwendung von radioaktiven Isotopen führte zu einer Einstellung der Versuchsreihe, weshalb an dieser Stelle keine Aussage zu einer möglichen temperaturabhängigen G-Proteinaktivierung getroffen werden konnte.

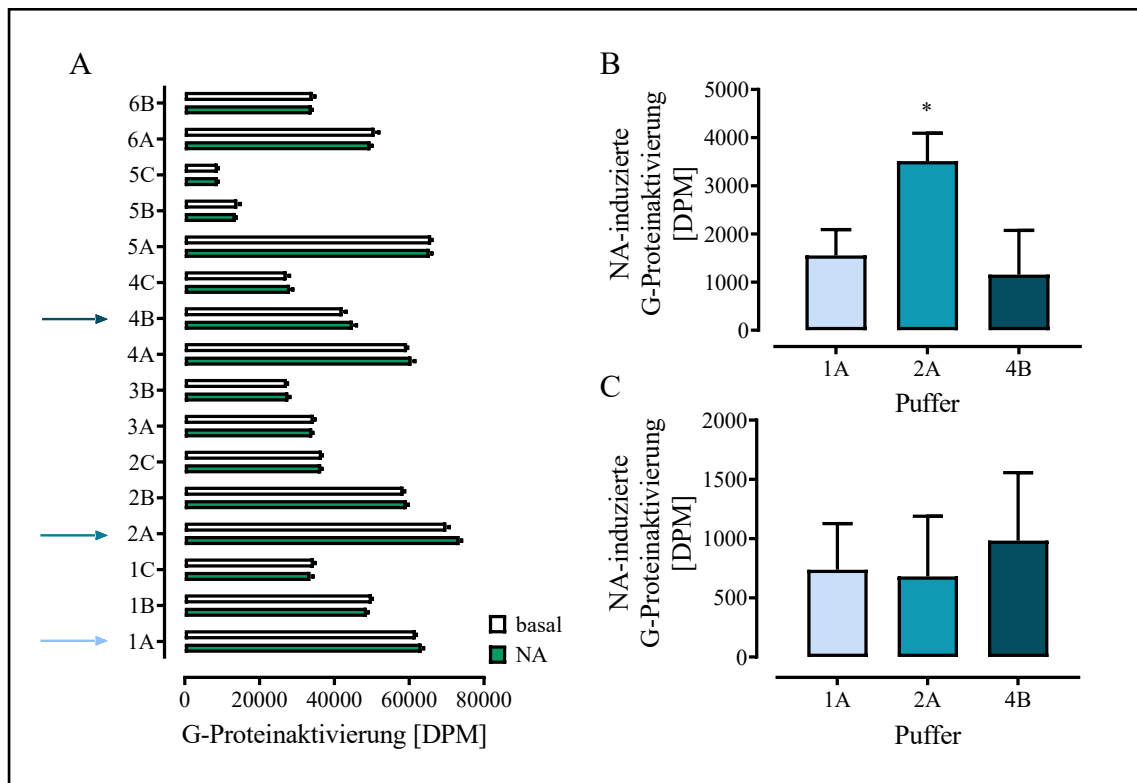


Abb. 46: NA-induzierte G-Proteinaktivierung in Zellmembranfraktionen von mHypoA-2/10-Zellen in Abhängigkeit des verwendeten Puffersystems

5 μ g Zellmembranfraktionen von mHypoA-2/10-Zellen wurden mit 0,1 nM [35 S]-GTP γ S im angegebenen Puffersystem mit oder ohne NA (10 μ M) 30 min bei 30 °C inkubiert und, nach Filtration, gebundenes [35 S]-GTP γ S mittels Szintillationsmessung bestimmt. (A) Exemplarische Darstellung der G-Proteinaktivierung in DPM in Abhängigkeit des verwendeten Puffers unter basalen oder stimulierten Bedingungen. (B) Induzierte G-Proteinaktivierung in DPM für die Puffer 1A, 2A und 2B, berechnet durch Bildung der Differenz aus NA-induzierter- und basaler G-Proteinaktivierung aus A. (C) Darstellung der Summe aus 4 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels Einstichproben-t-Test (Test auf Unterschied zu hypothetischem Wert 0). Signifikante Unterschiede wurden mit Sternchen markiert.

4.4.2.2 Bindung von Sal an intakte mHypoA-2/10-Zellen

Um dennoch einen Hinweis auf mögliche temperatursensitive G-Proteinaktivierung zu erhalten, wurde die Bindung von Sal an ganzen mHypoA-2/10-Zellen bestimmt. Hier besteht nun die Möglichkeit der dynamischen Interaktion zwischen G-Protein und dem Rezeptor, welche die Affinität von Hormonen beeinflussen kann (Liggett 2002).

Hierfür wurden mHypoA-2/10-Zellen im CP bei 36 und 38 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 125 I-CYP und steigenden Sal-Konzentrationen 1 h bei 36 bzw. 38

°C inkubiert. In Abb. 47 ist diese Verdrängung von ^{125}I -CYP mit Sal dargestellt. Auch hier war der, bereits in Abb. 40 beobachtete, biphasische Verlauf erkennbar. Es ließ sich allerdings kein signifikanter Unterschied bezüglich der Sal-Affinität zum β_2 -AR zwischen Zellen, die bei 36 und 38 °C inkubiert worden waren, feststellen.

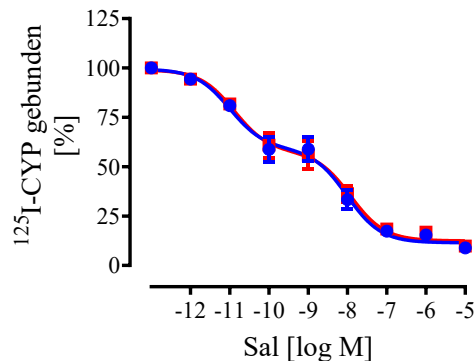


Abb. 47: Verdrängung von ^{125}I -CYP durch Sal in intakten mHypoA-2/10-Zellen (CP)

mHypoA-2/10-Zellen wurden im CP inkubiert und nach Abschaben bei 4 °C in SM resuspendiert (siehe Abb. 3). Anschließend wurden je 1×10^5 Zellen mit ^{125}I -CYP (75 pM) oder ^{125}I -CYP und Sal (0,1 pM – 10 μM) 1 h bei 36 oder 38 °C inkubiert. Gebundenes ^{125}I -CYP wurde mittels Filtration und Flüssigszintillation bestimmt. Das gebundene ^{125}I -CYP ohne Sal wurde zu 100 % gesetzt, die anderen Messwerte dazu in das Verhältnis gesetzt und in Prozent ausgedrückt. Es sind Daten aus drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten dargestellt. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen der Inkubation bei 36 °C und der bei 38 °C erfolgte mittels *two-way* ANOVA und anschließendem *post-hoc* Test nach Tukey. Es wurde eine nichtlineare Regression in GraphPad 9.1 durchgeführt (*Binding - competitive, two sites - fit LogIC₅₀*)

Auch wenn hiermit eine Beteiligung von G-Proteinen an temperatursensitiven Prozessen nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann, wurde dies im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter geprüft. Stattdessen sollte im Folgenden direkt die cAMP-Konzentration in Abhängigkeit von Temperaturänderungen untersucht werden.

4.4.3 Untersuchung der cAMP-Konzentration

4.4.3.1 Untersuchung der basalen cAMP-Akkumulation

Bislang konnte gezeigt werden, dass die Temperatur unter den gewählten Bedingungen keinen Einfluss auf die Bindung von NA oder Sal an den β_2 -AR hatte. Da die Bindung von Hormonen an den Rezeptor zu einer Aktivierung von ACs führt, wurde nachfolgend untersucht, ob die cAMP-Akkumulation abhängig von der Temperatur ist und damit

Ursache für eine veränderte CRE-Aktivierung bei 36 und 38 °C sein könnte. Daher wurde zunächst die basale cAMP-Akkumulation in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur bestimmt (Abb. 48). Für die Bestimmung der cAMP-Konzentration wurde IBMX in einer finalen Konzentration von 1 mM verwendet (siehe Kapitel 3.3.2), um den cAMP-Abbau durch zelluläre PDEs zu inhibieren.

Hierfür wurden Zellen mit ³H-Adenin im AP oder CP inkubiert und die basale cAMP-Akkumulation (siehe Kapitel 3.3.2) bestimmt (Abb. 48). In der ersten Zeile der Abbildung ist das verwendete Temperatur-Programm (CP oder AP) schematisch dargestellt. In der zweiten Zeile sind die erhaltenen Rohwerte und in der letzten die auf 38 °C normierten Messwerte dargestellt, um den möglichen Temperatureffekt auf den Basalwert erkennen zu können. Tatsächlich lässt sich allerdings in Abb. 48E und F erkennen, dass die basale cAMP-Akkumulation unabhängig von Temperaturänderungen war.

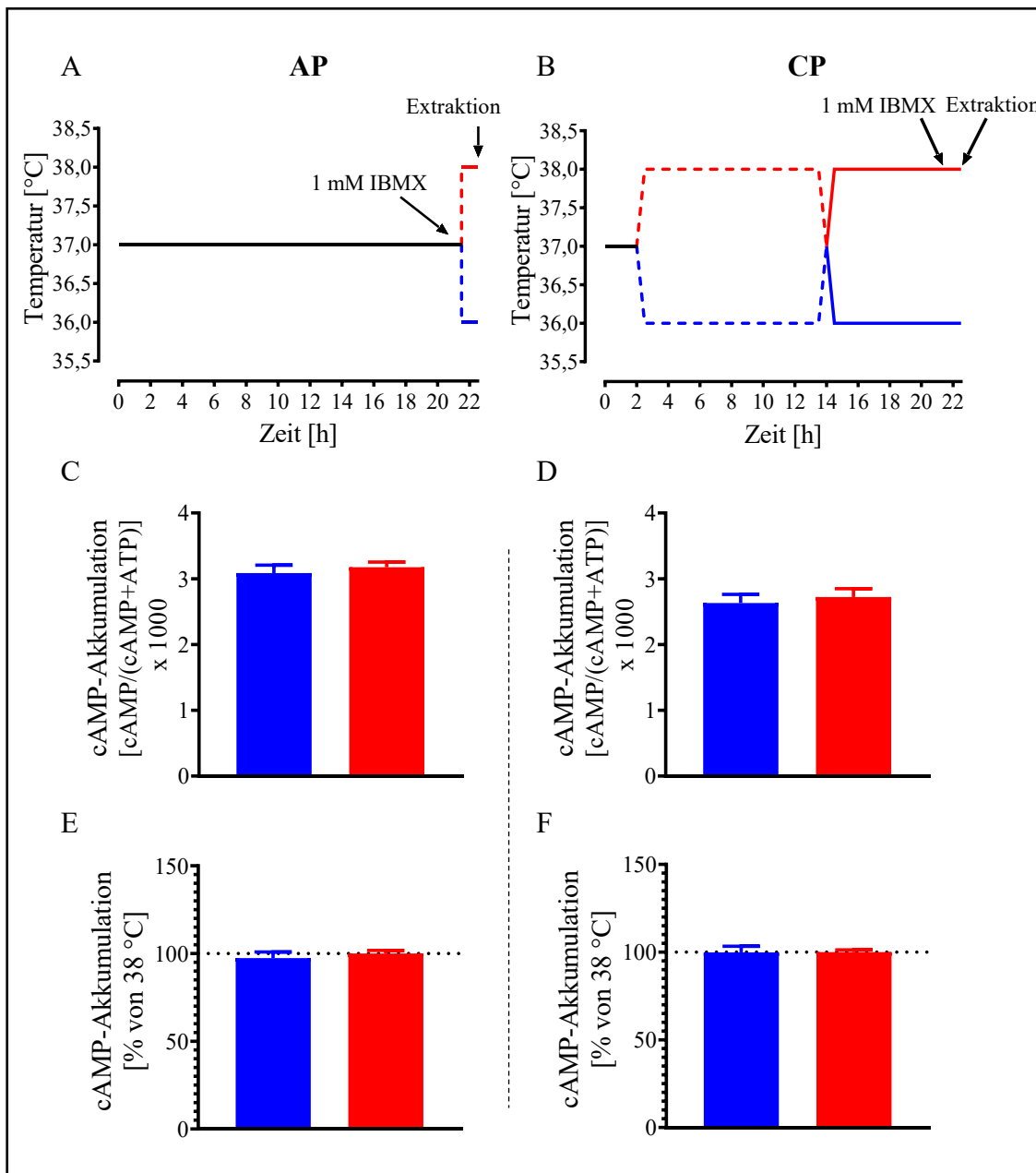


Abb. 48: Basale cAMP-Akkumulation von mHypoA-2/10-Zellen (AP und CP)

mHypoA-2/10-Zellen wurden mit 1 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Adenin in SM im AP oder CP inkubiert. Nach 21,5 h wurde eine 10-fach konzentrierte IBMX-Lösung (Zielkonzentration 1 mM) hinzugegeben und die Zellen eine weitere Stunde bei 36 oder 38 °C inkubiert. Anschließend wurde die cAMP-Akkumulation bestimmt (siehe Kapitel 3.3.2). Schematische Darstellung der Bestimmung der cAMP-Akkumulation im AP (A) und im CP (B). Die basale cAMP-Akkumulation bei 36 und 38 °C im AP (C) und CP (D) ist dargestellt. (E, F) Normierung der Messwerte von C und D auf 38 °C. Hierfür wurden die bei 38 °C erhaltenen Werte zu 100 % gesetzt (Siehe Kapitel 3.6). Es sind Daten aus 15 unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen der cAMP-Akkumulation bei 36 °C und der bei 38 °C erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test.

4.4.3.2 Untersuchung der temperaturabhängigen Liganden-induzierten cAMP-Akkumulation

Als nächstes sollte getestet werden, ob eine Stimulierung der Zellen mit NA, Sal und FSK im AP oder CP zu einer temperaturabhängigen cAMP-Akkumulation führt.

Hierfür wurden die Zellen mit ^3H -Adenin inkubiert und am nächsten Tag mit NA, Sal und FSK 1 h stimuliert. In Abb. 49 ist erkennbar, dass die induzierte cAMP-Akkumulation in beiden Programmen abhängig von der Inkubationstemperatur war. Nach der schematischen Darstellung des Inkubationprogramms in der ersten Zeile sind die erhaltenen Rohwerte der Messung in Zeile zwei dargestellt. Die Daten wurden, wie in Kapitel 3.6 beschrieben, normiert. Die Normierungen führten zu den in Zeile drei bis fünf dargestellten Abbildungen. In Abb. 49I bzw. J. lässt sich schließlich der Liganden-induzierte Temperatureffekt erkennen. Dieser Temperatureffekt über den Basalwert ist in Tabelle 5 zusammengefasst dargestellt.

Bei allen getesteten Liganden war eine erhöhte cAMP-Akkumulation bei 36 °C im Vergleich zu der bei 38 °C feststellbar. NA und Sal führten zu einer vergleichbaren Erhöhung, wohingegen die FSK-induzierte cAMP-Akkumulation bei 36 °C weniger ausgeprägt war. Der Vergleich zwischen dem AP und dem CP ergab keinen signifikanten Unterschied in der temperaturabhängigen NA-, Sal- oder FSK-induzierten cAMP-Akkumulation (siehe Tabelle 5).

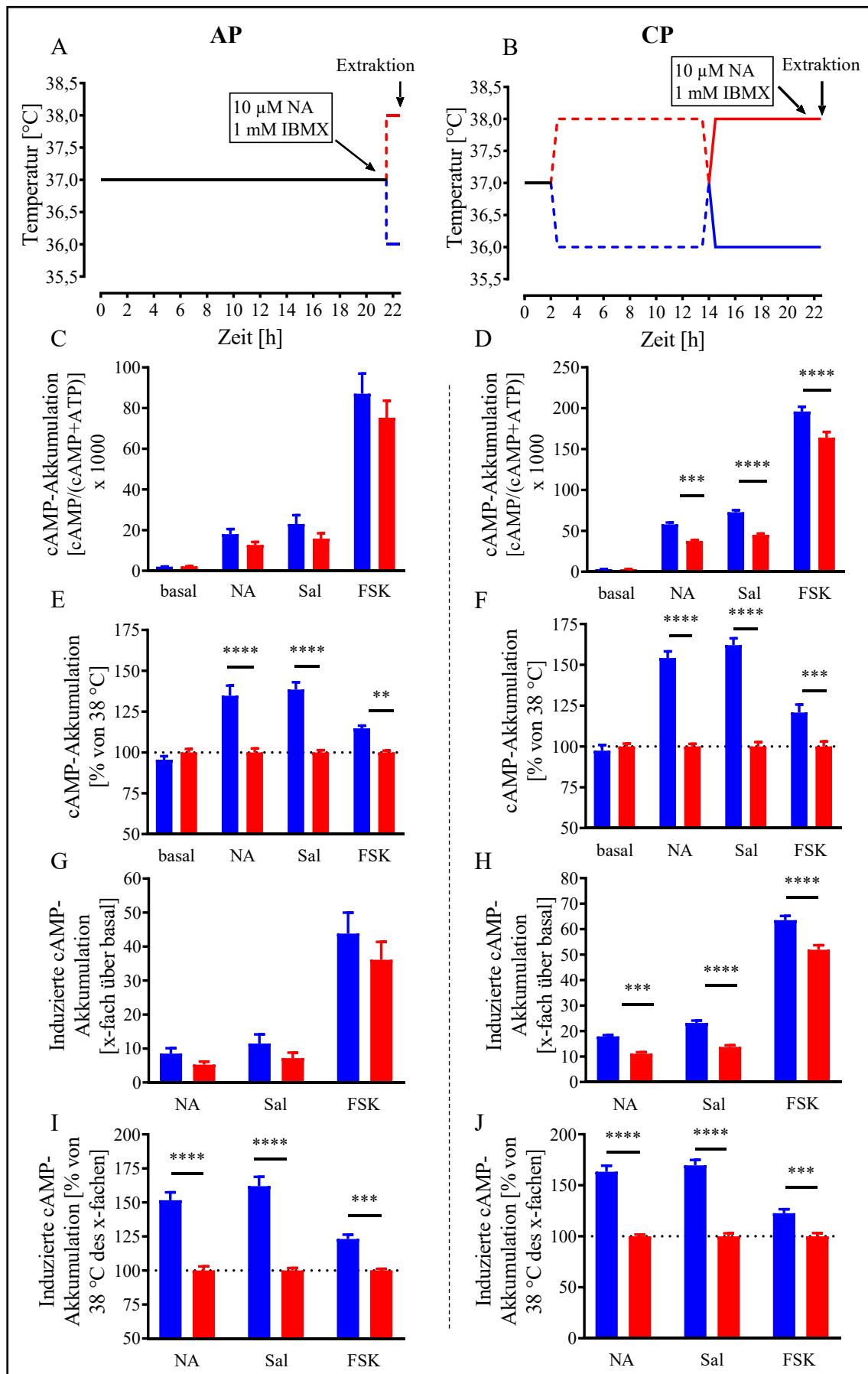


Abb. 49: Induzierte cAMP-Akkumulation in mHypoA-2/10-Zellen (AP und CP)

mHypoA-2/10-Zellen wurden mit 1 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Adenin im AP (C, E, G, I) oder CP (D, F, H, J) inkubiert (siehe Kapitel 3.3.2). Das verwendete Temperaturprogramm (AP) ist in **A** schematisch dargestellt, in **B** das CP. (**C, D**) Die gemessene cAMP-Akkumulation ist in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt **E** und **F** zeigen die Normierung der Messreihen auf 38 °C. Hierfür wurden die bei 38 °C erhaltenen Werte zu 100 % gesetzt. (**G, H**) Die Normierung auf das x-fache über dem Basalwert ist gezeigt. In **I** und **J** ist jeweils die Normierung auf 38 °C des x-fachen über dem Basalwert präsentiert (**I, J**). Die induzierte cAMP-Akkumulation als x-faches über den Basalwert wurde hier auf 38 °C normiert. Es sind Daten aus 5 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels *two-way* ANOVA und anschließendem *post-hoc* Test nach Tukey. Signifikante Unterschiede der NA-, Sal- oder FSK-induzierten cAMP-Akkumulation zwischen 36 und 38 °C wurden mit Sternchen markiert.

Tabelle 5: Temperatureffekt der induzierten cAMP-Akkumulation (AP und CP)

Es sind die in Abb. 49I und J graphisch dargestellten Ergebnisse zusammengefasst. Es wurde mit GraphPad Prism 9.1 überprüft, ob ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Temperatureffekt nach Inkubation im CP und AP festzustellen ist.

| | AP | CP | Zweistichproben-t-Test |
|------------|-------------------|-------------------|------------------------|
| NA | 151,6 \pm 2,5 % | 163,3 \pm 3,0 % | p = 0,2816 |
| Sal | 161,9 \pm 4,3 % | 169,5 \pm 4,2 % | p = 0,3760 |
| FSK | 123,2 \pm 1,9 % | 122,6 \pm 1,5 % | p = 0,7043 |

4.4.3.3 Vergleich der cAMP-Akkumulation zu einer 37 °C-Kontrollinkubation

Es wurde weiter untersucht, wie sich die induzierte cAMP-Akkumulation bei 36 oder 38 °C, im Vergleich zu einer 37 °C-Kontrollinkubation verhält. Hierfür wurden mHypoA-2/10-Zellen im AP inkubiert und die NA-, Sal- bzw. FSK-induzierte cAMP-Akkumulation bei 36, 37 und 38 °C bestimmt. Abb. 50A ist zu entnehmen, dass die basale cAMP-Akkumulation nicht abhängig von der Inkubationstemperatur war, was für 36 und 38 °C bereits in Abb. 48F gezeigt wurde. Die Normierung auf 37 °C macht deutlich, wie sich die Inkubationstemperatur von 36 bzw. 38 °C im Vergleich zu der 37 °C Kontrollinkubation auswirkt. Es lässt sich erkennen, dass eine Verringerung der Temperatur auf 36 °C zu einer relativen Erhöhung, während eine Erhöhung der

Temperatur auf 38 °C zu einer relativen Verringerung der NA-, Sal- und FSK-induzierten cAMP-Akkumulation führte. Damit kann gezeigt werden, dass Temperaturänderungen von 1 °C für 1 h ausreichend sind, um signifikante Unterschiede in der induzierten cAMP-Akkumulation zu messen und dass Erwärmung und Abkühlung gleichermaßen zu der von der 37 °C-Kontrollinkubation unterschiedlichen cAMP-Akkumulation beitragen.

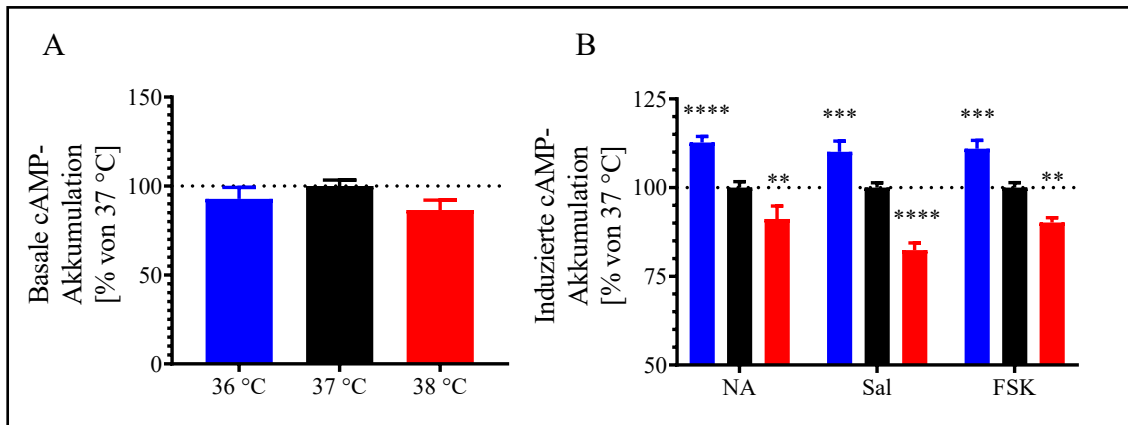


Abb. 50: cAMP-Akkumulation in mHypoA-2/10-Zellen bei 36, 37 und 38 °C (AP)

mHypoA-2/10-Zellen wurden mit 1 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Adenin bei 37 °C in den Temperaturschränken inkubiert (siehe Abb. 49A). Nach 21,5 h wurde mit 10 μM NA, 100 nM Sal oder 10 μM FSK in der Anwesenheit von IBMX (1 mM) stimuliert und die Zellen 1 h bei 36 und 37 °C, oder 37 und 38 °C inkubiert. (A) Die basale cAMP-Akkumulation wurde auf 37 °C normiert (siehe Kapitel 3.6). (B) Die induzierte cAMP-Akkumulation ist in Abhängigkeit der verwendeten Liganden bei 36, 37 und 38 °C gezeigt. Diese Messreihen wurden ebenso auf 37 °C normiert. Es sind Daten aus drei voneinander unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels *one-way* ANOVA (A) oder *two-way* ANOVA (B) mit anschließendem *post-hoc* Test nach Tukey. Signifikante Unterschiede zu der 37 °C-Kontrollinkubation wurden mit Sternchen markiert.

4.4.3.4 Temperaturabhängige Dosis-Wirkungs-Beziehung

Um die temperaturinduzierten Effekte auf die cAMP-Akkumulation näher zu charakterisieren, wurden die Dosis-Wirkungs-Beziehung von NA im AP und CP untersucht. Mit dieser Versuchsreihe sollte herausgefunden werden, ob die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) oder der maximale Effekt (E_{max}) durch die Inkubation der Zellen bei 36 oder 38 °C beeinflusst wird.

Hierfür wurden die Zellen mit verschiedenen NA-Konzentrationen inkubiert und die cAMP-Akkumulation nach einer Stunde bestimmt. In Abb. 51 ist die NA-induzierte

cAMP-Akkumulation in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration dargestellt. Außerdem sind die Ergebnisse noch tabellarisch zusammengefasst (Tabelle 6). Es ist erkennbar, dass die Temperaturänderungen die NA-induzierte cAMP-Akkumulation hinsichtlich des E_{\max} beeinflussten. Bei 36 °C betrug dieser $129 \pm 4 \%$ (AP) bzw. $150 \pm 4 \%$ (CP) im Vergleich zu 38 °C. Dies könnte bedeuten, dass ein oder mehrere Teilschritte, die zu einer cAMP-Akkumulation führen bei einer Inkubation der Zellen bei 36 °C stärker aktiviert werden. Die mittlere effektive Konzentration hingegen war durch die Temperatur oder das verwendete Programm nicht signifikant beeinflussbar. Der Hill-Koeffizient der Dosis-Wirkungs-Kurven hingegen unterschied sich, unabhängig von der Temperatur, zwischen den verwendeten Programmen signifikant. Im AP betrug dieser $1,1 \pm 0,1$, während er im CP $1,5 \pm 0,2$ betrug. Der Hill-Wert gilt als Maß für die Steilheit der Dosis-Wirkungs-Kurve. Bei einer Kooperativität der Bindung unterscheidet er sich von 1 (Hill 1910).

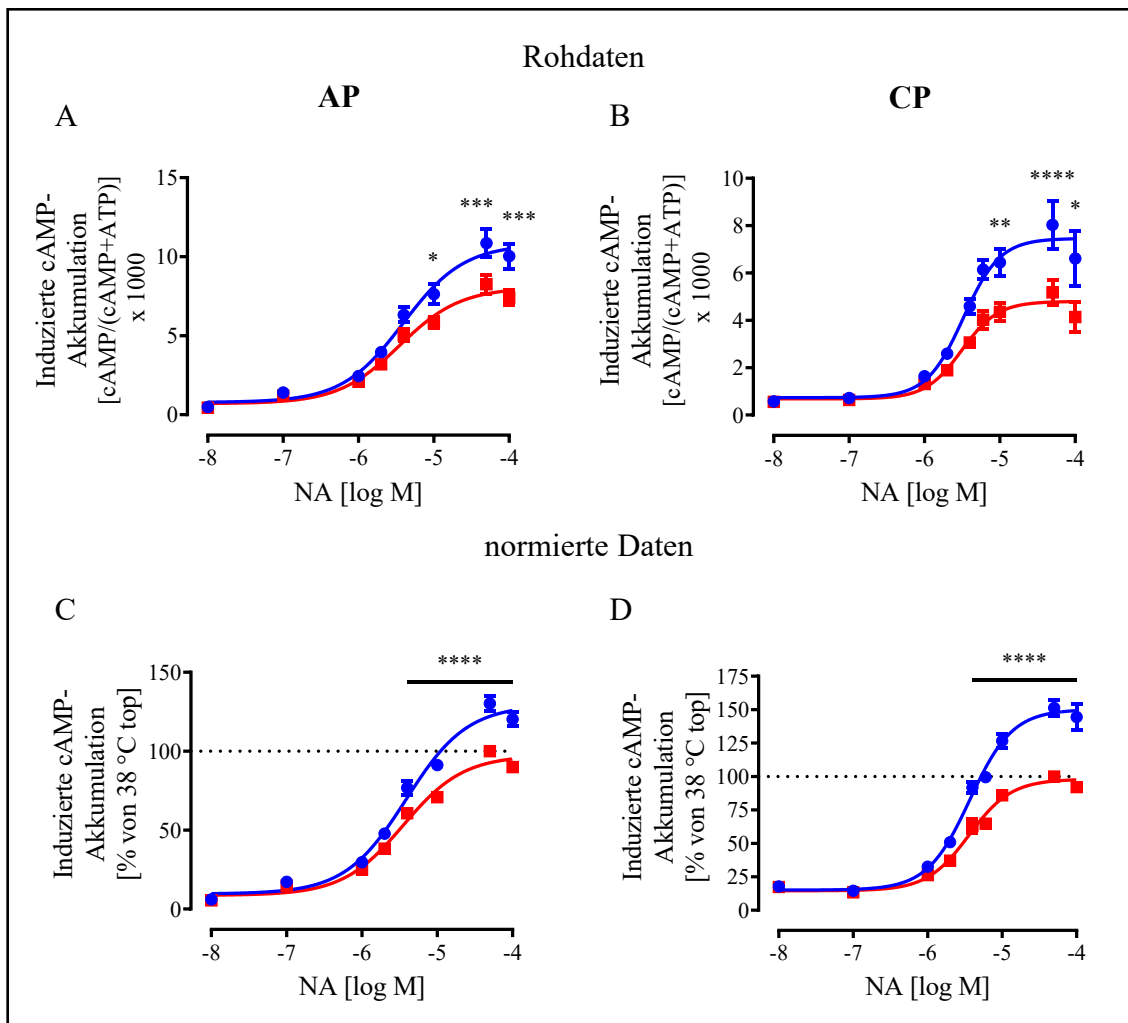


Abb. 51 Dosis-Wirkungskurven der NA-induzierten cAMP-Akkumulation (AP und CP)
 mHypoA-2/10-Zellen wurden mit 1 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Adenin in den Temperaturschränken inkubiert. Nach 21,5 h Inkubation im AP oder CP (siehe Abb. 49A bzw. B) wurden die Zellen mit einer 10-fach Lösung von IBMX (Zielkonzentration 1 mM) und den angegebenen NA-Konzentrationen 1 h bei 36 oder 38 °C inkubiert. Die gemessenen Rohdaten des AP und CP sind in **A** bzw. **B** dargestellt. In **C** und **D** sind die Rohdaten des AP bzw. CP normiert präsentiert. Hierfür wurde der maximale Wert der jeweiligen 38 °C-Inkubation zu 100 % gesetzt (siehe Kapitel 3.6). Es sind Daten aus vier voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels *two-way* ANOVA und anschließendem *post-hoc* Test nach Tukey. Signifikante Unterschiede zwischen der cAMP-Akkumulation bei 36 und 38 °C wurden mit Sternchen markiert. Es wurde eine nichtlineare Regression in GraphPad 9.1 durchgeführt [*log(agonist)* vs. *response - variable slope (four parameters)*].

Tabelle 6: Vergleich der Dosis-Wirkungs-Kurven (AP und CP)

Die beschreibenden Größen E_{\max} , EC_{50} und der Hill-Koeffizient sind in Abhängigkeit des verwendeten Programms und der Inkubationstemperatur dargestellt. Diese Werte entsprechen den in Abb. 51C und D präsentierten. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen der Inkubation bei 36 °C und der bei 38 °C des jeweiligen Programms, bzw. der Unterschied zwischen dem AP und dem CP, erfolgte mit einem Zweistichproben-t-Test der in GraphPad 9.1 berechneten Größen \pm SEM. Signifikante Unterschiede wurden mit Sternchen, nicht signifikante Unterschiede mit ns markiert.

| | AP 36 °C | AP 38 °C | CP 36 °C | CP 38 °C | AP vs CP |
|------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------------------|
| E_{\max} | 129,3 \pm 3,8 % | 97,39 \pm 2,5 % | 150,2 \pm 3,8 % | 98,0 \pm 2,6 % | p = 0,0024 (**) p = 0,7838 (ns) |
| | p = 0,0031 (**) | | p < 0,0001 (****) | | |
| EC_{50} | 3,9 \pm 0,2 μ M | 3,5 \pm 0,1 μ M | 3,7 \pm 0,4 μ M | 3,6 \pm 0,3 μ M | p = 0,5789 (ns) p = 0,7963 (ns) |
| | p = 0,3310 (ns) | | p = 0,7580 (ns) | | |
| Hill-Koeffizient | 1,07 \pm 0,12 | 1,08 \pm 0,11 | 1,51 \pm 0,16 | 1,53 \pm 0,19 | p = 0,0193 (*) p = 0,0242 (*) |
| | p = 0,8901 (ns) | | p = 0,9225 (ns) | | |

4.4.3.5 Kinetik der NA-induzierten cAMP-Akkumulation

Bislang konnte also gezeigt werden, dass die Temperatur nicht die basale, aber die induzierte cAMP-Akkumulation beeinflusst. Ferner konnte geklärt werden, dass bereits Temperaturänderungen von 1 °C für 1 h ausreichend waren, um signifikante Unterschiede in der induzierten cAMP-Akkumulation messen zu können. Schließlich konnte die Frage beantwortet werden, ob der Maximaleffekt oder die Wirkstärke von NA auf die cAMP-Akkumulation verändert waren. Um die temperaturabhängige cAMP-Akkumulation noch weiter zu charakterisieren, wurden im Folgenden die Stimulations- und Inkubationszeiten variiert. mHypoA-2/10-Zellen wurden daher 30 oder 60 min mit NA, Sal oder FSK stimuliert und anschließend die induzierte cAMP-Akkumulation bestimmt.

Überraschenderweise war eine maximale NA- (Abb. 52A) bzw. Sal- (Abb. 52B) induzierte cAMP-Akkumulation bereits nach 30 min erreicht. Nach insgesamt 60 min Inkubation war die intrazelluläre cAMP-Akkumulation signifikant verringert. Die FSK-induzierte cAMP-Akkumulation hingegen nahm im weiteren Zeitverlauf nicht ab (Abb. 52C). In Abb. 52D ist die Liganden-induzierte cAMP-Akkumulation nach 60 min im Verhältnis zu der nach 30 min Stimulation dargestellt. Während die FSK-induzierte

cAMP-Akkumulation zwischen 30 und 60 min annähernd unverändert blieb ($93,6 \pm 2,3$ %), war die NA- und Sal-induzierte cAMP-Antwort bereits wieder stark reduziert. Sie betrug für NA noch $51,4 \pm 2,0$ % und für Sal noch $42,1 \pm 1,9$ % des bei 30 min vorhandenen cAMPs (Abb. 52D). Somit war abhängig von dem Stimulus ein signifikanter ‚cAMP-Verlust‘ nach 60 min feststellbar. Dies war unerwartet, da der verwendete cAMP-Assay, in der Gegenwart von IBMX, als Akkumulationsassay beschrieben wurde, in dem cAMP nicht durch PDEs abgebaut werden sollte (siehe Kapitel 3.3.2).

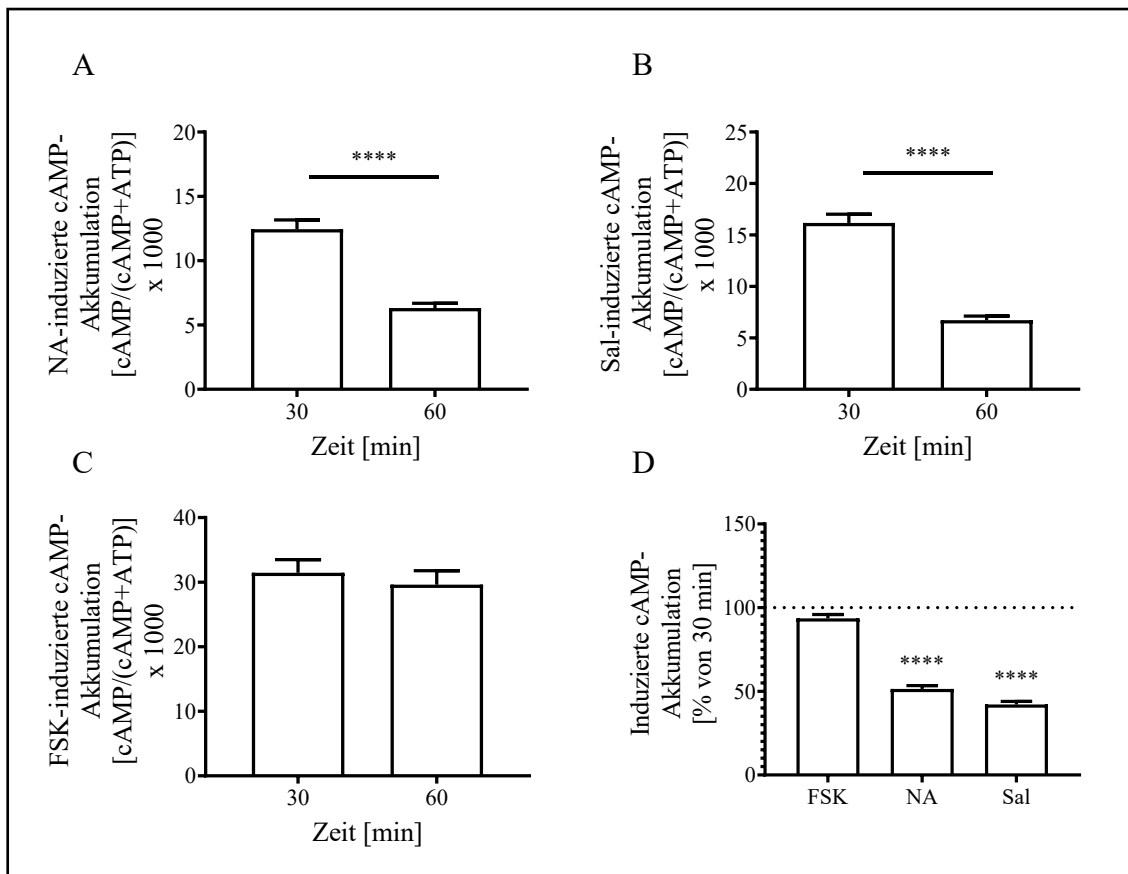


Abb. 52: Induzierte cAMP-Akkumulation nach 30 und 60 min in mHypoA-2/10-Zellen

mHypoA-2/10 Zellen wurden mit $1 \mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Adenin bei 37°C in den Temperaturschränken inkubiert. Nach 21,5 h wurden die Zellen 30 oder 60 min mit IBMX (1 mM) oder IBMX und NA (10 μM), Sal (100 nM) oder FSK (10 μM) stimuliert. Die NA- (A), Sal- (B) oder FSK- (C) induzierte cAMP-Akkumulation ist in Abhängigkeit von der Inkubationszeit dargestellt. (D) Die cAMP-Akkumulation nach 60 min ist im Verhältnis zu der nach 30 min prozentual dargestellt. Hierfür wurden die nach 30 min erhaltenen Messwerte der jeweiligen cAMP-Akkumulation zu 100 % gesetzt und die nach 60 min gemessenen Werte entsprechend normiert. Es sind Daten aus vier voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die

Prüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test (A-C) oder *one-way* ANOVA und anschließendem *post-hoc* Test nach Tukey (D). Signifikante Unterschiede zwischen der cAMP-Akkumulation nach 30 und 60 min wurden mit Sternchen markiert.

4.4.3.6 Extrazelluläre cAMP-Akkumulation bei 37 °C

Um den soeben beschriebenen ‚cAMP-Verlust‘ zu untersuchen, wurde eine genauere Kinetik der NA-induzierten cAMP-Akkumulation angefertigt. Da der ‚cAMP-Verlust‘ zwischen 30 und 60 min über einen Transport des cAMPs aus der Zelle hinaus erklärt werden könnte, wurde neben dem intrazellulären cAMP, zusätzlich noch der Zellüberstand auf cAMP untersucht.

Hierfür wurden mHypoA-2/10-Zellen für 10 bis 60 min mit NA stimuliert. Die NA-induzierte intra- und extrazelluläre cAMP-Akkumulation in Abhängigkeit von der Inkubationszeit ist in Abb. 53 dargestellt. Nach 20 min NA-Stimulation war das intrazelluläre cAMP-Maximum erreicht und nahm im weiteren Stimulationsverlauf auf weniger als die Hälfte ab (Abb. 53A). Der cAMP-Gehalt im Überstand stieg in der gleichen Zeit signifikant an (Abb. 53B). Das totale cAMP ergab sich somit aus der Summe des intrazellulären cAMP-Spiegel (cAMP_i) und des Efflux (cAMP_e) (Abb. 53C).

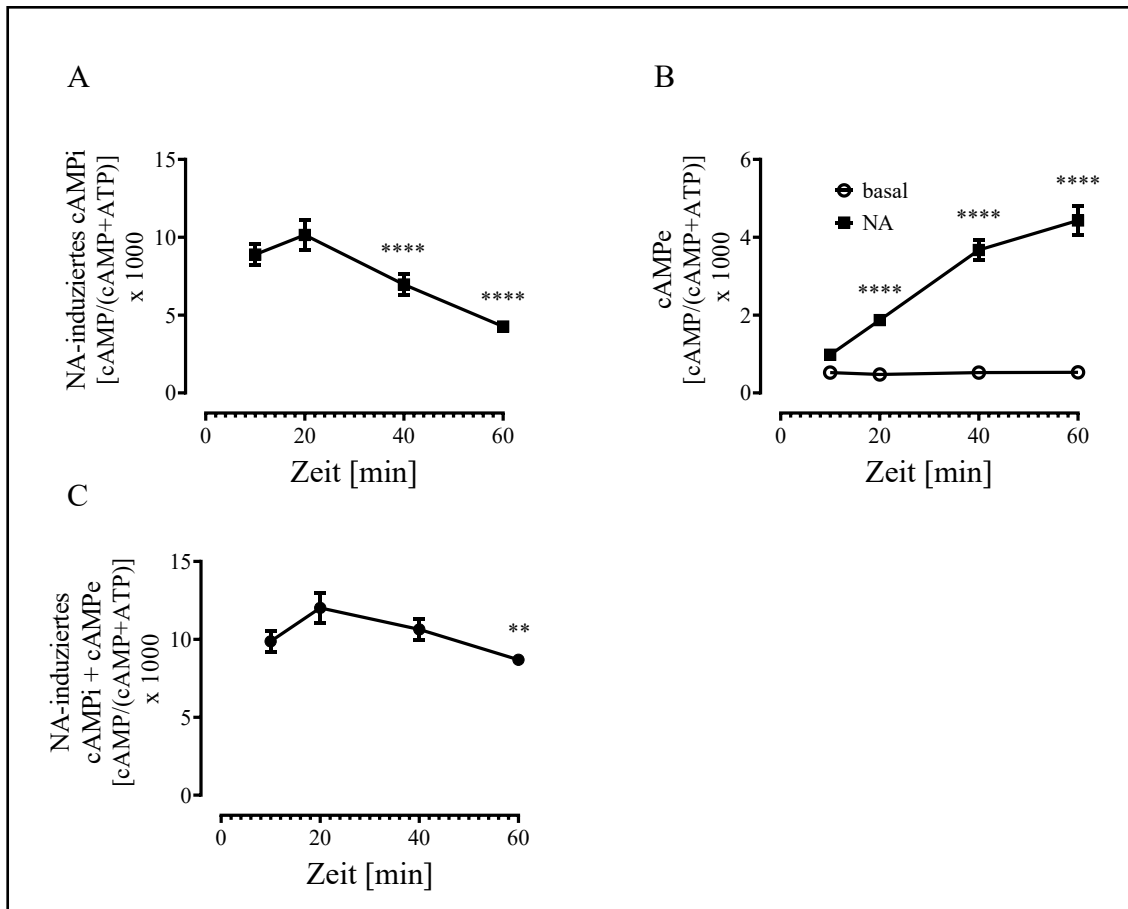


Abb. 53: Kinetik der NA-induzierten intra- und extrazellulären cAMP-Akkumulation in mHypoA-2/10-Zellen

mHypoA-2/10-Zellen wurden bei 37 °C mit 1 µCi/ml ³H-Adenin 21,5 h inkubiert. Anschließend wurde ein Mediumwechsel auf SM durchgeführt. Nach 30 min wurde in der Gegenwart von IBMX (1 mM) mit oder ohne NA (10 µM) 10 – 60 min stimuliert. Extrazelluläres (Zellüberstand) und intrazelluläres cAMP wurde bestimmt (siehe Kapitel 3.3.2). (A) Die intrazelluläre cAMP-Akkumulation ist in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt (cAMPi). (B) Das extrazelluläre cAMP ist unter basalen und NA-stimulierten Bedingungen gezeigt (cAMPe). (C) Es ist die Summe aus NA-induzierten intra- und extrazellulärem cAMP dargestellt (cAMPi + cAMPe). Es sind Daten aus 5 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten als Mittelwert ± SEM gezeigt. Mit Sternchen wurden signifikante Unterschiede zu der cAMP-Akkumulation nach 20 min (A, C) bzw. zum basalen cAMP-Efflux (B) markiert. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels *two-way* ANOVA mit anschließendem *post-hoc* Test nach Tukey.

Anhand dieser Versuchsreihe wurde deutlich, dass cAMP in Abhängigkeit von der Stimulationszeit aus der Zelle in das extrazelluläre Medium transportiert wurde. ABCC-Transporter sind in der Lage, cAMP unter Energieverbrauch aus der Zelle zu pumpen (siehe Kapitel 1.4.2.5). Die RNA-Expression der ABCC-Transportersubtypen in mHypoA-2/10-Zellen ist in Abb. 54A dargestellt. Hier wird ersichtlich, dass die ABCC-

Subtypen 1, 4, 5 und 10 exprimiert werden. Um herauszufinden, ob ABCC-Transporter an dem NA-induzierten cAMP-Efflux beteiligt sind, wurde Indomethacin, ein nicht-selektiver ABCC-Inhibitor (de Groot, van der Deen et al. 2007), eingesetzt.

Hierfür wurden die mHypoA-2/10-Zellen 30 min vor der NA-Stimulation mit Indomethacin behandelt. Die Vorinkubation der Zellen mit 100 μM Indomethacin führte nach 20 min zu einer $61,3 \pm 1,4$ -prozentigen Inhibition und nach 60 min zu einer $67,3 \pm 1,0$ -prozentigen Inhibition des induzierten cAMP-Efflux (Abb. 54C). Zwar konnte der Efflux mit 500 μM Indomethacin noch weiter inhibiert werden (Abb. 54B), jedoch waren unter dieser Bedingung bereits toxische Effekte der Substanz erkennbar, weshalb für weitere Experimente die geringere Konzentration eingesetzt wurde.

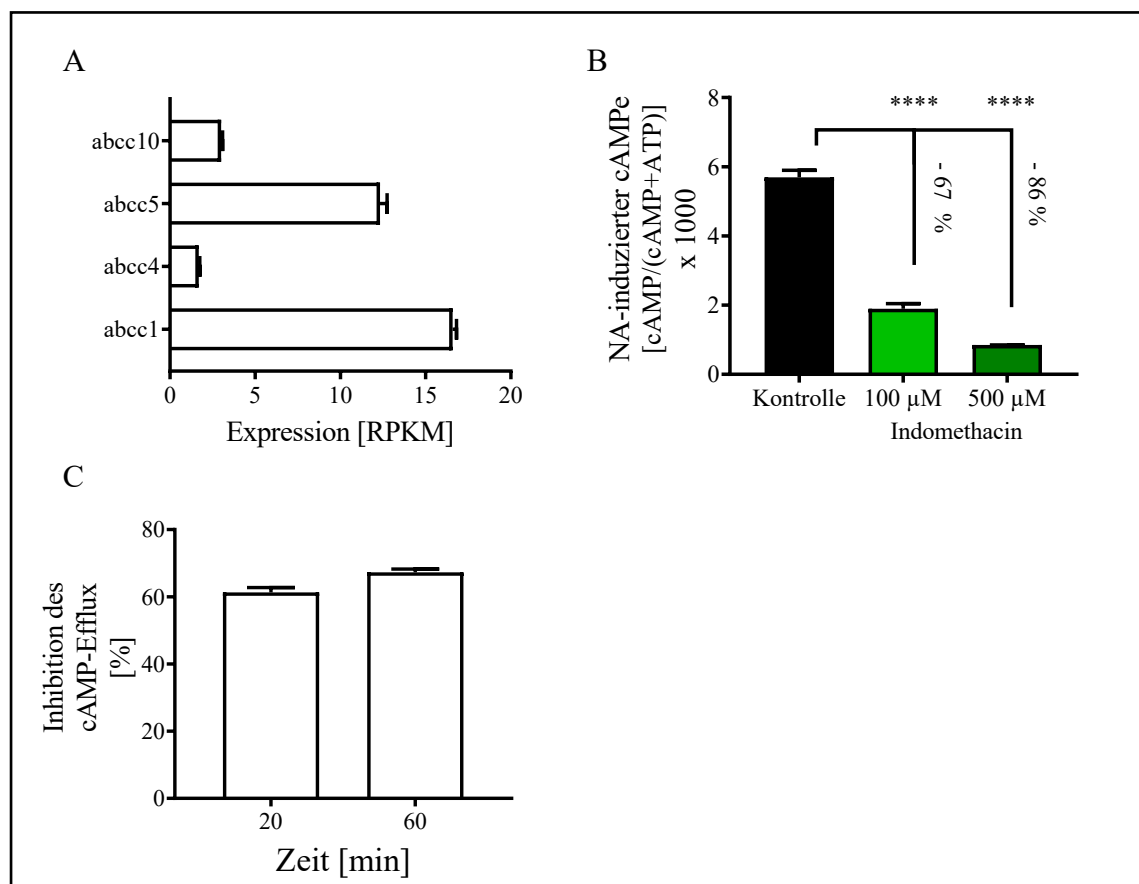


Abb. 54: Expressionsprofil der ABCC-Transporter und die Indomethacin-vermittelte Inhibition des NA-induzierten cAMP-Efflux

(A) RNAseq-Daten der ABCC-Expression (siehe Kapitel 3.2.3). Es sind Daten aus sechs unabhängigen Zellpopulationen als Mittelwert \pm SEM dargestellt. (B) Repräsentative Darstellung des NA-induzierten cAMP-Efflux in Abhängigkeit von der verwendeten Indomethacin-Konzentration. Hierfür wurden mHypoA-2/10-Zellen mit 1 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Adenin bei 37 °C in den

Temperaturschränken inkubiert. Anschließend wurde ein Mediumwechsel auf SM, das den ABCC-Inhibitor in der Zielkonzentration (100 μM oder 500 μM) oder die Lösemittelkontrolle DMSO (100 μM) enthielt. Die Zellen wurden für 30 min inkubiert, bevor mit einer 10-fach konzentrierten Lösung aus NA (Zielkonzentration 10 μM) und IBMX (Zielkonzentration 1 mM) 60 min stimuliert wurde. Anschließend wurde die cAMP-Konzentration bestimmt (siehe Kapitel 3.3.2). (C) Inhibition des induzierten cAMP-Efflux in Prozent in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer. Hierfür wurde wie bei (B) verfahren, allerdings lediglich 100 μM Indomethacin eingesetzt und die Ergebnisse als Prozent Inhibition dargestellt. Darstellung der Summe aus 11 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten als Mittelwert \pm SEM (C). Die Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen der Inkubation mit DMSO und der jeweiligen Indomethacin-Konzentration erfolgte mittels *one-way* ANOVA und anschließendem *post-hoc* Test nach Tukey. Signifikante Unterschiede wurden mit Sternchen markiert.

Zuvor konnte bereits die Temperaturabhängigkeit der NA-induzierten intrazellulären cAMP-Akkumulation gezeigt werden (siehe Abb. 49). ABCC-Transporter, die cAMP temperaturabhängig aus der Zelle befördern, könnten den Unterschied in der intrazellulären cAMP-Konzentration zwischen 36 und 38 °C erklären. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde der NA-induzierte cAMP-Efflux in Abhängigkeit von Temperaturänderungen untersucht.

4.4.3.7 Extrazelluläre cAMP-Akkumulation in Abhängigkeit von der Temperatur

Hierfür wurde die intra- und extrazelluläre cAMP-Akkumulation in mHypoA-2/10-Zellen im AP nach 20 oder 60 min Stimulation bestimmt. Abb. 55A zeigt die NA-induzierte intrazelluläre cAMP-Akkumulation. Der induzierte ‚cAMP-Verlust‘ bei 36 und 38 °C ist in Abb. 55B dargestellt. Dieser betrug nach 60 min für 36 °C $38,0 \pm 2,1$ % und für 38 °C $56,5 \pm 1,2$ % des nach 20 min akkumulierten cAMPs. Abb. 55C zeigt den NA-induzierten cAMP-Efflux in den Extrazellularraum (EZR).

Dieser war nach 60 min bei 36 °C erhöht, obwohl der ‚cAMP-Verlust‘ bei 38 °C höher war. Berücksichtigt man allerdings das, zu dem jeweiligen Zeitpunkt vorliegende, intrazelluläre cAMP, ergibt sich das Verhältnis des Efflux zu dem intrazellulären cAMP [engl. *ratio of efflux over cytosol* (rEC)], welches in Abb. 55D dargestellt ist. Nach 60 min wurde also im Verhältnis zum intrazellulären cAMP bei 38 °C signifikant mehr in den EZR befördert. Dieser Effekt wurde durch die Normierung auf 36 °C noch verdeutlicht (Abb. 55E). Hier ist erkennbar, dass der relative Efflux nach 20 und 60 min bei 38 °C signifikant erhöht war.

Stellt man nun die Summe aus intra- und extrazellulärer NA-induzierter cAMP-Akkumulation dar (Abb. 55F), so lassen sich drei Dinge feststellen: (1) Der zuvor beobachtete Verlust von intrazellulärem cAMP zwischen 20 und 60 min wurde durch den cAMP-Efflux bei 36 °C vollständig ausgeglichen. (2) Im Gegensatz dazu war bei 38 °C nach 60 min immer noch ein signifikanter ‚cAMP-Verlust‘ zu verzeichnen. (3) Der Temperatureffekt der NA-induzierten cAMP-Akkumulation nahm unter Berücksichtigung des extrazellulären cAMPs signifikant von $167,0 \pm 6,1$ % auf $139,4 \pm 5,2$ % ab, aber war noch vorhanden (Abb. 55G). Die Summe dieser Feststellungen legte einen weiteren temperaturabhängigen Mechanismus nahe, der bislang in dieser Arbeit nicht berücksichtigt wurde.

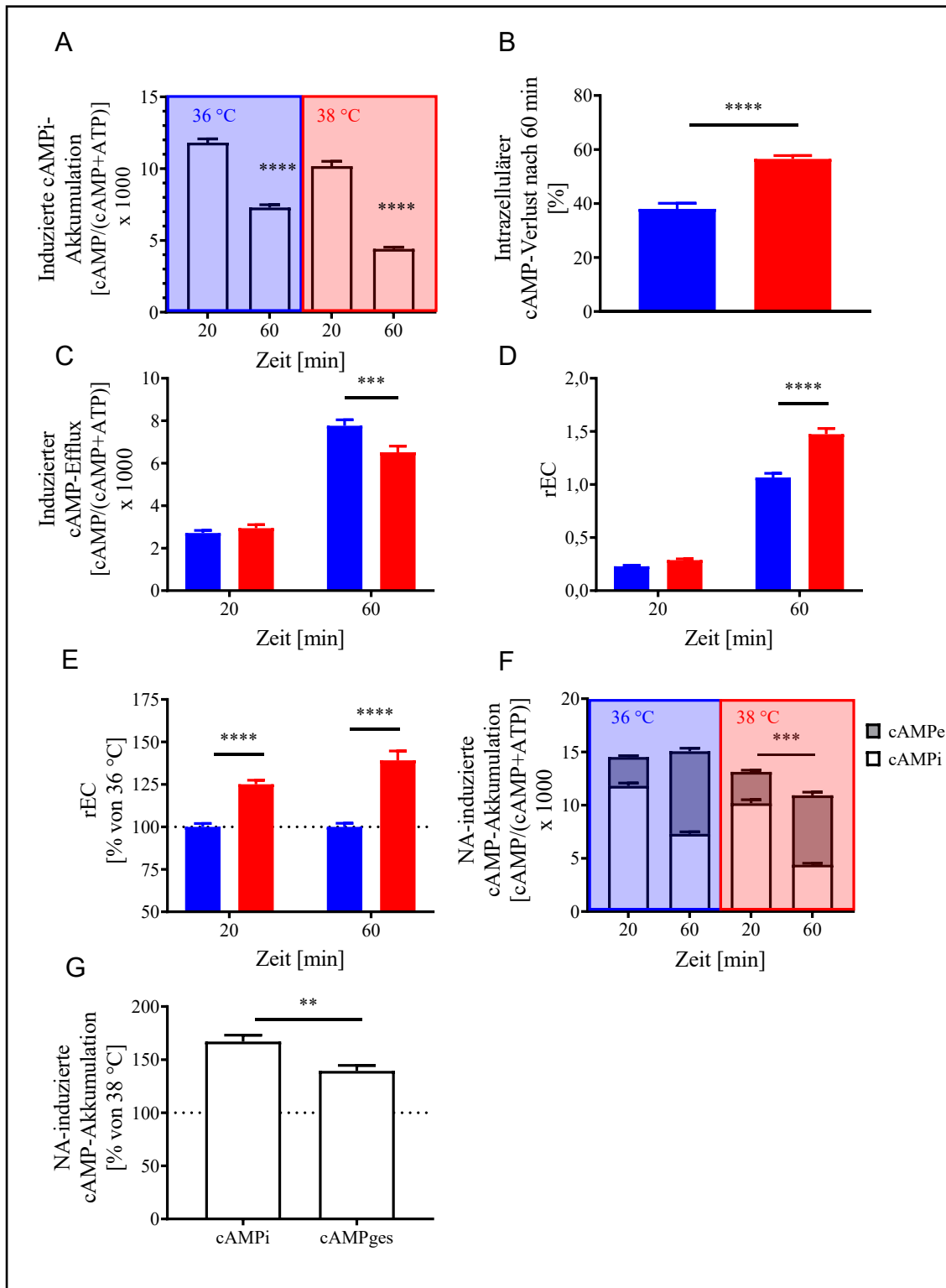


Abb. 55: Induzierte intra- und extrazelluläre cAMP-Akkumulation nach 20 und 60 min NA-Stimulation

mHypoA-2/10-Zellen wurden 21,5 h mit 1 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Adenin bei 37 °C inkubiert. 30 min Nach dem Mediumwechsel auf SM wurde mit einer 10-fach konzentrierten Lösung aus NA (Zielkonzentration 10 μM) in der Anwesenheit von IBMX (Zielkonzentration 1 mM) stimuliert und die Zellen bei 36 oder 38 °C im AP inkubiert. Nach 20 oder 60 min Stimulation bei der

jeweiligen Temperatur, wurde die intra- und extrazelluläre cAMP-Akkumulation bestimmt (siehe Kapitel 3.3.2). (A) Es ist die intrazelluläre cAMP-Akkumulation nach 20 und 60 min bei 36 und 38 °C dargestellt. (B) Der prozentuale Verlust des intrazellulären cAMPs zwischen 20 und 60 min bei 36 und 38 °C ist präsentiert. Hierfür wurden die nach 20 min erhaltenen Messwerte zu 100 % gesetzt und die nach 60 min erhaltenen Messreihen entsprechend normiert. (C) Der NA-induzierte cAMP-Efflux nach 20 und 60 min Stimulation ist in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt. (D) Das Verhältnis von cAMP im Überstand zu intrazellulärem cAMP (rEC) zu dem jeweiligen Zeitpunkt bei 36 und 38 °C ist dargestellt. (E) Hier ist die Normierung des rEC auf 36 °C gezeigt. Hierfür wurden die bei 36 °C erhaltenen Werte des cAMP Efflux nach 20 und 60 min zu 100 % gesetzt (siehe Kapitel 3.6). (F) Darstellung des totalen cAMP, bestehend aus intrazellulärer Fraktion und cAMP-Efflux, bei 36 und 38 °C nach 20 und 60 min Stimulation. (G) Die NA-induzierte cAMP-Akkumulation ist normiert auf 38 °C dargestellt. Hierfür wurden die bei 38 °C erhaltenen Messwerte zu 100 % gesetzt. Es sind Daten aus vier voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen der cAMP-Akkumulation nach 20 und 60 min (A, F) bzw. der cAMP-Akkumulation bei 36 und 38 °C (B-E) wurden mit Sternchen markiert. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels *two-way* ANOVA und anschließendem *post-hoc* Test nach Tukey (A, C-F), bzw. Zweistichproben-t-Test (B, G).

Die oben durchgeführten Experimente ließen vermuten, dass der Einsatz von IBMX, möglicherweise nicht zu einer vollständigen Inhibition der cAMP-abbauenden PDEs führte. Somit könnte sich der ‚cAMP-Verlust‘ zwischen 20 und 60 min einerseits aus einem Transport aus der Zelle hinaus, und andererseits durch einen intrazellulären cAMP-Abbau durch PDEs, ergeben. Um diese These zu überprüfen, wurde im Folgenden der PDE-vermittelte cAMP-Abbau untersucht.

4.4.4 Untersuchung der Phosphodiesteraseaktivität

4.4.4.1 Etablierung der Messmethode

Um direkt den PDE-abhängigen cAMP-Abbau zu bestimmen, wurden mHypoA-2/10-Zellen aufgeschlossen und mit ^3H -cAMP inkubiert. In einem Vorexperiment wurden mHypoA-2/10-Zellen für die Biosynthese von ^3H -cAMP aus ^3H -Adenin verwendet. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit ^3H -Adenin inkubiert und anschließend mit FSK stimuliert, um die ^3H -cAMP-Produktion aus dem verstoffwechselten ^3H -ATP zu bewirken (siehe Kapitel 3.3.4.1). Anschließend wurde das gebildete ^3H -cAMP über Säulenchromatographie aufgereinigt (siehe Kapitel 3.3.2) Danach wurden mittels Triton X® aufgeschlossene Zellen mit dem aufgereinigten ^3H -cAMP 30 min bei 37 °C inkubiert.

Als Kontrolle des PDE-induzierten cAMP-Abbaus wurde zu einem Teil der Proben IBMX (1 mM) zugesetzt. Schließlich wurde der PDE-induzierte Abbau von ^3H -cAMP durch eine erneute Säulenchromatographie bestimmt.

In Abb. 56 ist das verbliebene ^3H -cAMP, in Abhängigkeit von der Inkubation mit IBMX, dargestellt. Es ist erkennbar, dass in mHypoA-2/10-Zellen ohne IBMX die ^3H -cAMP-Menge signifikant verringert war, was für einen Abbau durch PDEs sprach.

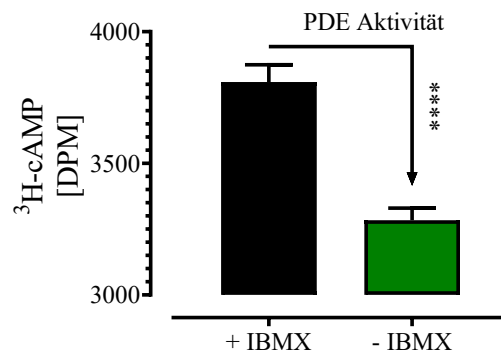


Abb. 56: Messung des PDE-induzierten ^3H -cAMP in mHypoA-2/10-Zellen in Abhängigkeit von der Anwesenheit von IBMX

1) Produktion von ^3H -cAMP: mHypoA-2/10-Zellen wurden mit 1 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Adenin 21,5 h inkubiert. Anschließend wurde bei 37 °C mit 10 μM FSK, in der Anwesenheit von 1 mM IBMX, 30 min stimuliert und die Zellen schließlich mit 5 % TCA extrahiert. Mittels Säulenchromatographie wurden die radioaktiven Bestandteile aufgetrennt und das isolierte ^3H -cAMP konnte weiterverwendet werden (siehe Kapitel 3.3.2).

2) Messung des ^3H -cAMP-Abbaus: mHypoA-2/10-Zellen wurden durch die Zugabe von 2 % Triton-X®-Lösung lysiert (siehe Kapitel 3.3.4). Zusammen mit 4250 ± 650 DPM der in 1 erhaltenen ^3H -cAMP-Lösung ohne und mit IBMX (1 mM), wurde das Lysat 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde mittels erneuter Säulenchromatographie das verbliebene ^3H -cAMP aufgetrennt und durch Flüssigszintillationsmessung bestimmt. Nicht-abgebautes ^3H -cAMP mit und ohne IBMX ist in DPM dargestellt. Es sind Daten aus sechs voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten als Mittelwert \pm SEM präsentiert. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen der Inkubation mit 1 mM IBMX und der Kontrolle erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test. Signifikante Unterschiede wurden mit Sternchen markiert.

Da die oben entwickelte Methode zur Generation von ^3H -cAMP Schwächen hatte (siehe Kapitel 3.3.4.1), wurde für alle weiteren Experimente kommerziell erworbenes ^3H -cAMP verwendet. Außerdem wurden die Zellen nun durch mechanische Disruption aufgeschlossen.

Um die Kinetik des PDE-induzierten ^3H -cAMP-Abbaus zu ermitteln, wurde nicht abgebautes ^3H -cAMP durch Flüssigszintillation nach 10 – 60 min Inkubation bei 37 °C bestimmt (Abb. 57). Im Verlauf der Inkubation fand ein IBMX-abhängiger ^3H -cAMP-Abbau statt. Schon nach 20 min unterschied sich die ^3H -cAMP Menge ohne IBMX signifikant von der Kontrolle. Nach 60 min wurden noch $57,2 \pm 2,0$ % des eingesetzten ^3H -cAMP wiedergefunden (Abb. 57B), bzw. waren $42,8 \pm 2,0$ % des ursprünglich eingesetzten ^3H -cAMPs abgebaut (Abb. 57C). Durch die Inkubation mit IBMX war auch nach 60 min kein signifikanter ^3H -cAMP-Abbau feststellbar. Da der Zellaufschluss die Notwendigkeit der Zellmembranpenetration überwindet, war unter diesen Bedingungen die verwendete IBMX-Konzentration möglicherweise ausreichend, um die PDE-Aktivität vollständig zu inhibieren.

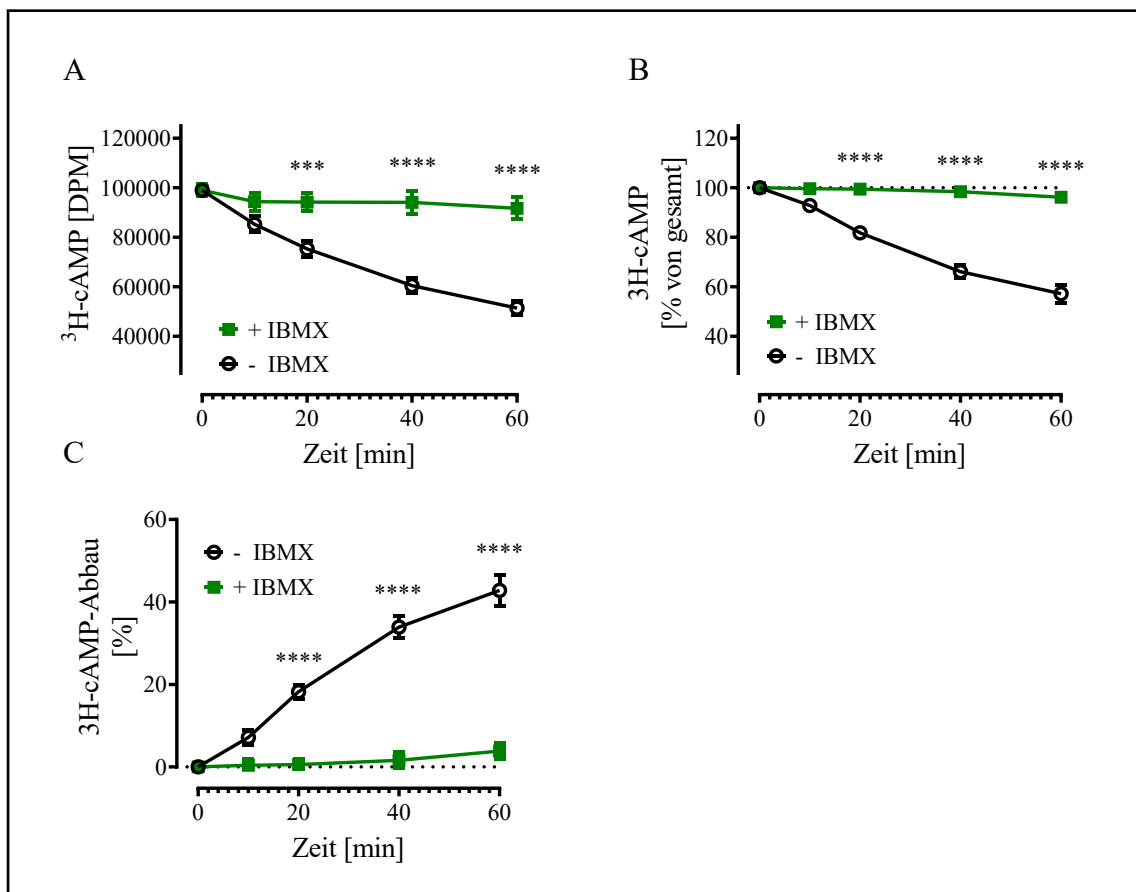


Abb. 57: ^3H -cAMP-Abbau in mHypoA-2/10-Zellfragmenten

mHypoA-2/10-Zellen wurden mittels mechanischer Disruption aufgeschlossen (siehe Kapitel 3.3.4.2). 100 μl der Zellfragmentsuspension (entspricht etwa 1×10^5 Zellen) wurden mit ^3H -cAMP (1×10^5 DPM) 10 bis 60 min bei 37 °C inkubiert. Die ^3H -cAMP-Aktivität wurde mittels Flüssigszintillation nach chromatographischer Auftrennung bestimmt. Zur Kontrolle der PDE-

Aktivität wurde zu jedem Zeitpunkt auch IBMX (1 mM) hinzugefügt. (A) Hier ist die gemessene ^3H -cAMP-Menge in DPM in Abhängigkeit von der Inkubationszeit dargestellt. (B) Die Messwerte wurden auf das wiedergefundene ^3H -cAMP ohne Zugabe der Zellsuspension normiert (100 %) (siehe Kapitel 3.6). (C) Der ^3H -cAMP-Abbau ist in Prozent in Abhängigkeit von der Inkubationszeit dargestellt. Es sind Daten aus fünf voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten als Mittelwert \pm SEM präsentiert. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen der Inkubation mit und ohne IBMX erfolgte mittels *two-way* ANOVA und anschließendem *post-hoc* Test nach Tukey. Signifikante Unterschiede wurden mit Sternchen markiert.

Zur weiteren Charakterisierung des cAMP-Abbaus wurde die eingesetzte Zellzahl variiert. Nachdem zuvor bereits gezeigt wurde, dass die Inkubation von IBMX den ^3H -cAMP-Abbau vollständig inhibierte, wurde in weiteren Versuchen auf diese Kontrolle verzichtet. mHypoA-2/10-Zellen wurden lysiert und die Suspension auf unterschiedliche Zellzahl-Konzentrationen eingestellt. Diese wurden mit ^3H -cAMP inkubiert und die verbliebene ^3H -cAMP-Aktivität bestimmt (Abb. 58). Es ist zu erkennen, dass mit der erhöhten Zellzahl eine Zunahme des Abbaus erfolgte, was höchstwahrscheinlich an der erhöhten Gesamtmenge an aktiven PDEs lag (Abb. 58C).

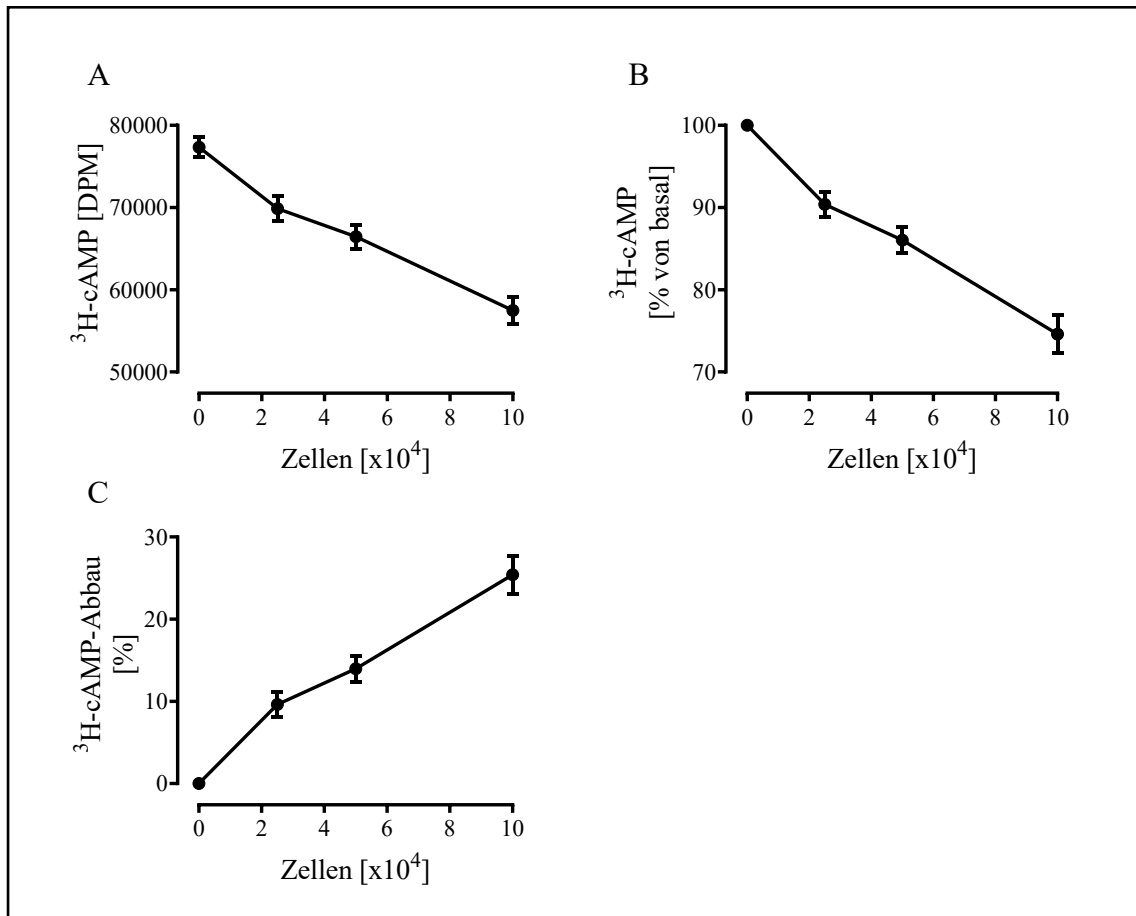


Abb. 58: ^3H -cAMP-Abbau in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellzahl

mHypoA-2/10-Zellen wurden durch mechanische Disruption aufgeschlossen und $2 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ Zellen mit 1×10^5 DPM ^3H -cAMP 20 min bei 37°C inkubiert. Die ^3H -cAMP-Aktivität wurde mittels Flüssigszintillation nach chromatographischer Auftrennung bestimmt. (A) Die ^3H -cAMP-Menge ist in DPM in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellzahl dargestellt. (B) Die Messwerte wurden auf das anfangs eingesetzte ^3H -cAMP normiert. Dafür wurde das zugegebene ^3H -cAMP zu 100 % gesetzt. (C) Der ^3H -cAMP-Abbau ist in Prozent in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellzahl gezeigt. Es sind Daten aus drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

4.4.4.2 Temperaturabhängige Phosphodiesteraseaktivität

Bislang konnte gezeigt werden, dass die NA-induzierte cAMP-Akkumulation und die CREB-abhängige Reporteraktivierung bei 36°C deutlich erhöht, gegenüber der bei 38°C , waren. Ferner war der induzierte cAMP-Efflux temperaturabhängig. Dies könnte zumindest teilweise die temperaturabhängige cAMP-Akkumulation erklären. Es wurde auch ein PDE-Assay entwickelt, der eine Messung des PDE-induzierten cAMP-Abbaus

ermöglichte. Damit sollte nun die Frage beantwortet werden, ob der PDE-induzierte cAMP-Abbau prinzipiell von der Temperatur abhängig ist.

Dafür wurden mechanisch aufgeschlossene mHypoA-2/10-Zellen 20 min bei 36 oder 38 °C inkubiert und die danach verbleibende ^3H -cAMP Aktivität bestimmt (Abb. 59). Die eingesetzte Radioaktivität (100 %) wurde durch Inkubation mit der mHypoA-2/10-Zellsuspension bei 36 und 38 °C signifikant verringert. Außerdem ist zu erkennen, dass die Inkubation bei 38 °C zu einer signifikant reduzierten ^3H -cAMP-Menge gegenüber der bei 36 °C (Abb. 59A) führte. Der ^3H -cAMP Abbau betrug bei 36 °C $12,7 \pm 2,1$ % und $21,2 \pm 1,8$ % bei 38 °C (Abb. 59C). Durch Normierung des ^3H -cAMP-Abbaus auf 36 °C (siehe Kapitel 3.6) wird deutlich, dass die Inkubation der Suspension bei 38 °C zu einem $93,4 \pm 15,9$ % erhöhten ^3H -cAMP-Abbau gegenüber der 36 °C-Inkubation führte (vgl. Abb. 59D).

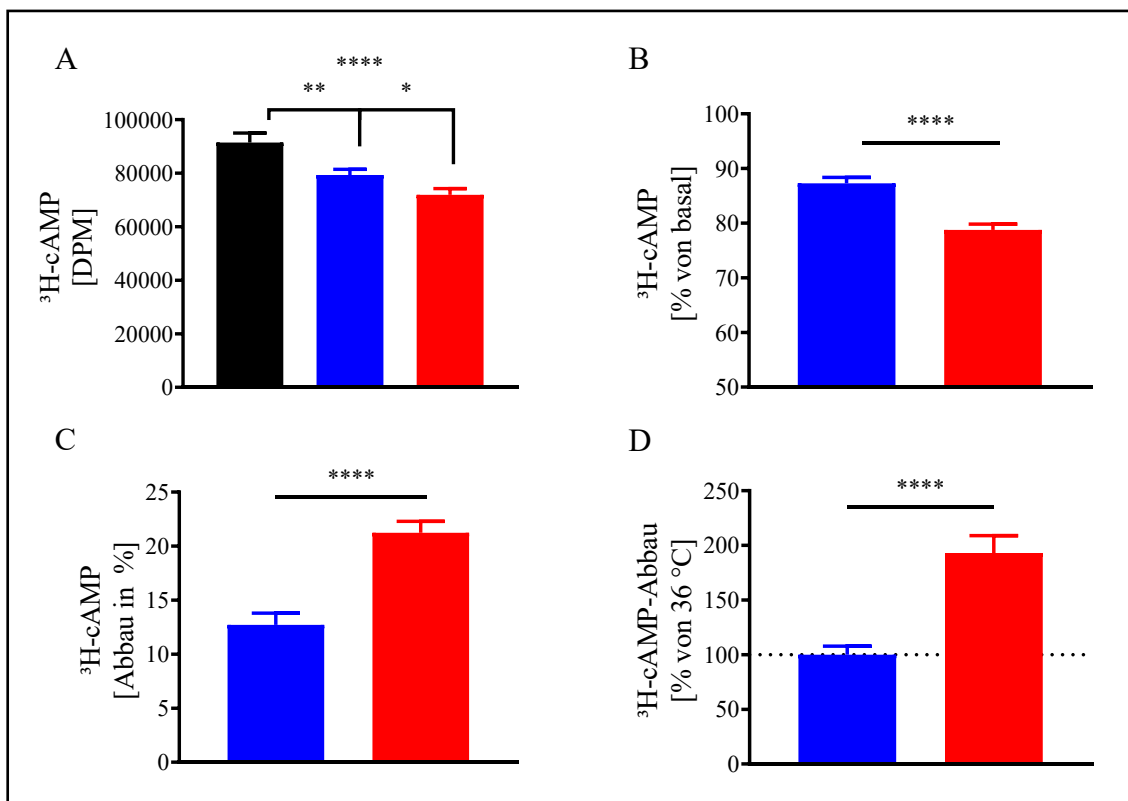


Abb. 59: ^3H -cAMP-Abbau in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur

mHypoA-2/10-Zellen wurden durch mechanische Disruption aufgeschlossen und mit 1×10^5 DPM ^3H -cAMP für 20 min bei 36 und 38 °C inkubiert. (A) Darstellung der gemessenen ^3H -Aktivität in DPM in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur. Von den 1×10^5 DPM wurden durchschnittlich 91461 ± 3544 DPM nach der Chromatographie wiedergefunden und als Basalwert (schwarzer Balken) definiert. (B) Darstellung der Messwerte normiert auf den

Basalwert, welcher zu 100 % gesetzt wurde. (C) Prozentualer ^3H -cAMP Abbau bei 36 und 38 °C. Hierfür wurden die in B erhaltenen Werte von 100 % subtrahiert. (D) Normierung des ^3H -cAMP-Abbaus auf 38 °C. Hierfür wurden die bei 38 °C erhaltenen Messwerte zu 100 % gesetzt. Es sind Daten aus sieben voneinander unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels *one-way* ANOVA und anschließendem *post-hoc* Test nach Tukey (A) bzw. Zweistichproben-t-Test (B-D).

In Zusammenspiel mit dem cAMP-Efflux kommt es hierdurch möglicherweise zu einer veränderten temperaturabhängigen cAMP-Akkumulation in intakten mHypoA-2/10-Zellen. Die bei 36 °C erhöhte und bei 38 °C verringerte NA-induzierte cAMP-Akkumulation könnte dann schließlich auch zu der in Abb. 32 gezeigten temperaturabhängigen CREB-Aktivierung in mHypoA-2/10-Zellen führen. Letztlich könnte dies die in Abb. 33 gezeigte temperaturabhängige prepro-TRH-Reporteraktivität bedingen.

4.5 Übertragbarkeit der Befunde auf weitere Zellsysteme

Bislang wurden alle Befunde an mHypoA-2/10-Zellen als Zellmodell erhoben. Dieses erwies sich als ausgezeichnet geeignet, um den Einfluss simulierter Körpertemperatur auf Signalweiterleitung und Genexpression zu untersuchen. Die Vielzahl exprimierter Rezeptoren (siehe Abb. 29) erlaubte auch die Untersuchung des Liganden-abhängigen Temperatureffekts.

4.5.1 Überprüfung der induzierbaren cAMP-Akkumulation bei 37 °C

Um zu überprüfen, ob die beschriebenen Effekte auf die Liganden-induzierte cAMP-Akkumulation allgemeine Gültigkeit haben, wurden weitere Zelllinien, primäre Zellen und Überexpressionssysteme untersucht. Hierfür wurde die NA-, Sal- und FSK-induzierte cAMP Akkumulation bei 37 °C in verschiedenen Zelllinien untersucht.

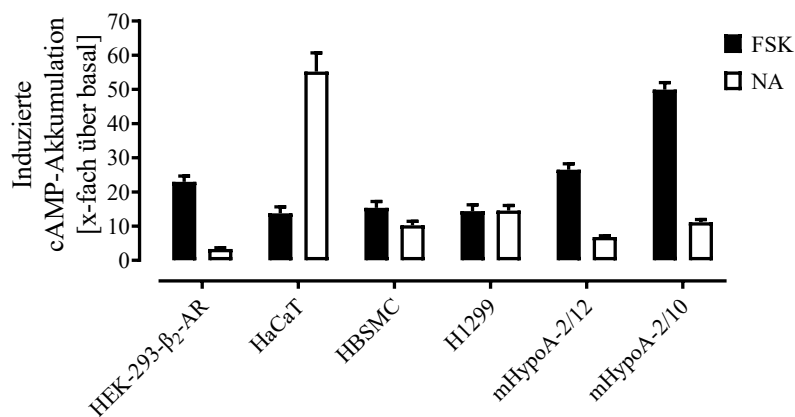
In Tabelle 7 ist die Sensitivität dieser Zelllinien auf NA, Sal oder FSK zusammengefasst dargestellt. Unter den verwendeten Bedingungen erwiesen sich neben den bislang verwendeten mHypoA-2/10-Zellen auch mHypoA-2/12, H1299, ‚primäre humane bronchiale glatte Muskelzellen‘ [engl. *human bronchial smooth muscle cells* (HBSMC)], HaCaT-Zellen und HEK-293-Zellen mit überexprimierten β_2 -AR (HEK- β_2 -AR) als durch NA, Sal und FSK stimulierbar.

Tabelle 7: NA-, Sal-, bzw. FSK-induzierte cAMP-Akkumulation in verschiedenen Zelllinien

Haken zeigen eine signifikante cAMP-Akkumulation nach der Stimulierung. Kreuze geben an, dass keine signifikante cAMP-Antwort durch Inkubation mit den jeweiligen Liganden induziert werden konnte.

| | mHypoA-2/10 | mHypoA-2/12 | GT1-7 | NG108-15 | H1299 | A549 | A427 | L929 | HBSC | HaCaT | Huh-7 | HepG2 | HEK-293- β_2 -AR |
|-----|-------------|-------------|-------|----------|-------|------|------|------|------|-------|-------|-------|------------------------|
| NA | ✓ | ✓ | × | × | ✓ | × | × | × | ✓ | ✓ | × | × | ✓ |
| Sal | ✓ | ✓ | × | × | ✓ | × | × | × | ✓ | ✓ | × | × | ✓ |
| FSK | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | × | ✓ |

In Abb. 60 ist die NA- und FSK-induzierte cAMP-Akkumulation der positiv getesteten Zelllinien als x-faches über der basalen Aktivität dargestellt. Die untersuchten Zellen zeigen deutliche Unterschiede hinsichtlich der Signalstärke.

**Abb. 60: Induzierte cAMP-Akkumulation nach Stimulation mit NA oder FSK in weiteren Zellsystemen**

1×10^5 Zellen des jeweiligen Zellsystems wurden mit $1 \mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Adenin 21,5 h bei 37°C inkubiert und anschließend mit NA oder FSK (je $10 \mu\text{M}$) in der Anwesenheit von IBMX (1 mM) 1 h stimuliert. Die intrazelluläre cAMP-Akkumulation wurde bestimmt (siehe Kapitel 3.3.2). Dargestellt ist die NA- (weiß) oder FSK- (schwarz) induzierte cAMP-Akkumulation als x-faches

über dem Basalwert. Es sind Daten aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

4.5.2 Untersuchung der temperaturabhängigen induzierten cAMP-Akkumulation

Als nächstes wurde die induzierte cAMP-Akkumulation der positiv getesteten Zellsystem im AP untersucht. Hierfür wurden die Zellen mit NA, Sal oder FSK 1 h bei 36 oder 38 °C stimuliert und anschließend die cAMP-Akkumulation bestimmt (Abb. 61). Es lässt sich erkennen, dass neben den bereits ausführlich beschriebenen mHypoA-2/10-Zellen auch mHypoA-2/12- und H1299-Zellen eine temperaturabhängige induzierte cAMP-Akkumulation zeigten. Bei mHypoA-2/12-Zellen handelt es sich um eine den mHypoA-2/10-Zellen verwandte Zelllinie (Belsham, Fick et al. 2009). Sie zeigten ebenso eine ausgeprägte Temperaturabhängigkeit der induzierten cAMP-Akkumulation (A, B). Diese konnte auch bei H1299-Zellen, einer humanen, nichtkleinzelligen Lungenkarzinomzelllinie, gezeigt werden (C, G). Bei HBSMC-Zellen konnte lediglich eine leicht ausgeprägte Temperatursensitivität hinsichtlich der cAMP-Akkumulation nach FSK-Stimulierung festgestellt werden. Bei HEK-293- β_2 -AR-Zellen konnten unter den getesteten Bedingungen hingegen keine temperaturabhängigen Unterschiede in der induzierten cAMP-Akkumulation festgestellt werden.

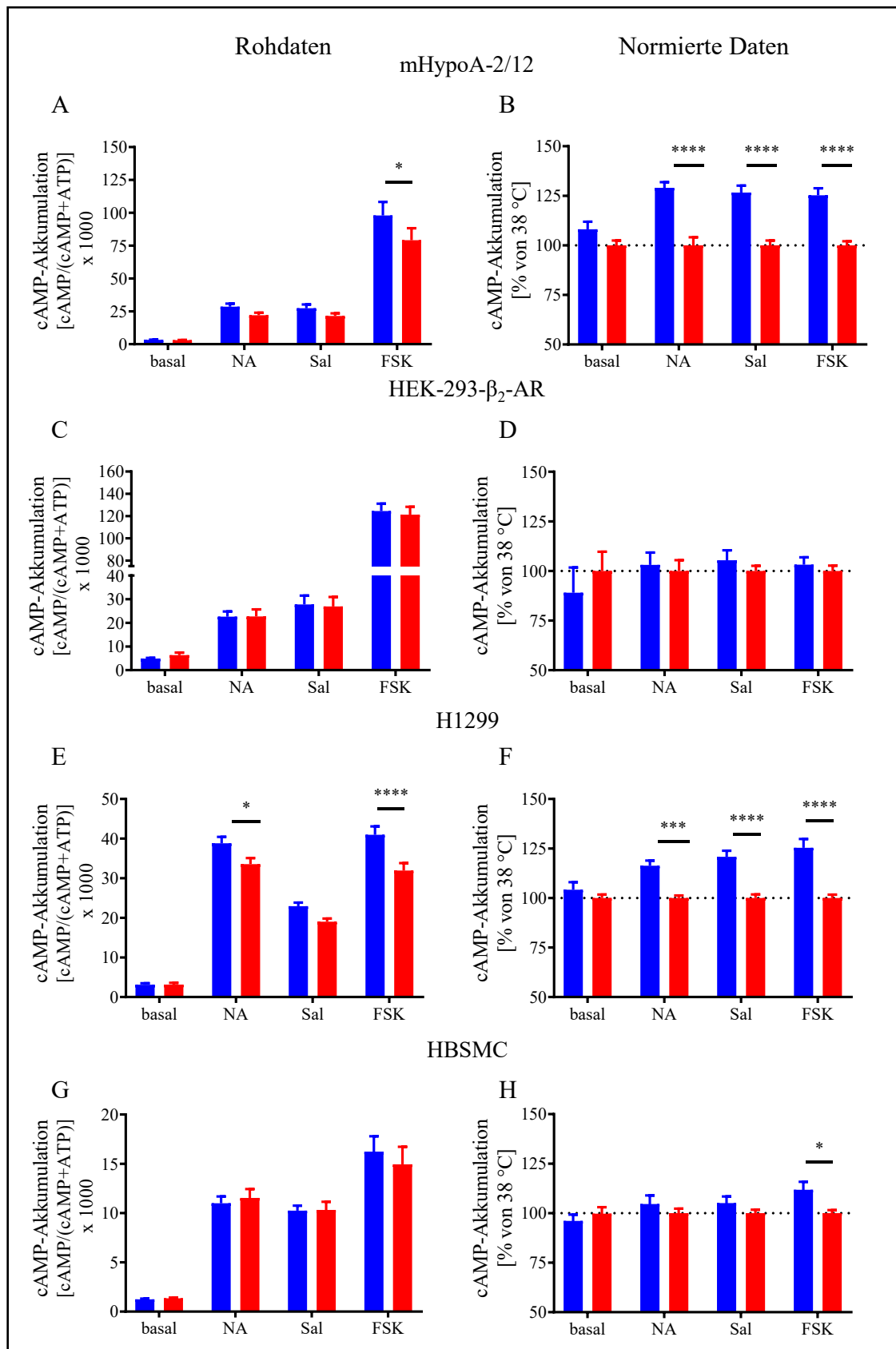


Abb. 61: Liganden-induzierte cAMP-Akkumulation anderer Zellsysteme (AP)

Die Zellen wurden mit 1 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Adenin 21,5 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde mit 10 μM NA, 100 nM Sal oder 10 μM FSK in der Anwesenheit von IBMX (1 mM) 1 h bei 36 oder 38 °C stimuliert. Danach wurde die cAMP-Akkumulation mittels Säulenchromatographie und anschließender Flüssigszintillation bestimmt. **A**, **C**, **E** und **G** zeigen die gemessenen Rohwerte, **B**, **D**, **F**, und **H** die Normierung auf 38 °C. Dafür wurden die bei 38 °C erhaltenen Werte zu 100 % gesetzt (siehe Kapitel 3.6). Es sind Daten aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels *two-way* ANOVA und anschließendem *post-hoc* Test nach Tukey. Signifikante Unterschiede zwischen der induzierten cAMP-Akkumulation bei 36 und 38 °C wurden mit Sternchen markiert.

Von fünf im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Zellsystemen, konnte bei drei eine temperaturabhängige Aktivierung des β_2 -AR-abhängigen Signalwegs nach Stimulierung mit NA und Sal festgestellt werden. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich erkennen, dass die temperaturabhängige induzierte cAMP-Akkumulation nicht auf das hypothalamische Zellsystem mHypoA-2/10 beschränkt ist, sondern dass die Befunde auch in weiteren Zellsystemen bestätigt werden konnten.

5. Diskussion

Die Auswirkungen der Temperatur auf Prozesse des Lebens sind von großer Bedeutung, da Lebewesen sich seit jeher in strikter Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur befinden. Im Laufe der Evolution haben sich homoiotherme Lebensformen entwickelt, die ihre eigene Körpertemperatur trotz wechselhaften Umgebungstemperaturen autonom regulieren können. Dadurch kann selbst bei deutlichen, umweltbedingten Temperaturunterschieden eine gleichbleibende Funktionalität des Organismus gewährleistet werden (Tanaka, Yanase et al. 1988). Für den Menschen (und auch für die Maus) hat sich so eine Körpertemperatur von etwa 37 °C etabliert.

Temperatursensoren in der Haut ermöglichen, die Umgebungstemperatur laufend wahrzunehmen und versetzen den Organismus dadurch in die Lage, auf Veränderungen zu reagieren. Anpassungsmaßnahmen des Organismus führen somit zu einer gleichbleibenden Körpertemperatur. Seit etwa 150 Jahren ist bekannt, dass die Körpertemperatur homoiothermer Lebewesen in einem circadianen Rhythmus fluktuiert (Refinetti 2010). Im menschlichen Organismus steigt die Temperatur in Phasen erhöhter Aktivität: Die Temperatur steigt, meist tagsüber bis zu einem Maximum um etwa 17:00 Uhr, und fällt in der inaktiven Phase bis auf ein Minimum um etwa 02:00 Uhr morgens. Diese circadianen Temperaturänderungen (ca. zwischen 0,7 und 1,2 °C) haben sich im Laufe der Evolution entwickelt, damit sich der Körper ideal auf zyklische Umweltbedingungen vorbereiten und anpassen kann (Refinetti 2010).

Ursächlich für die sich anpassende Körpertemperatur ist die rhythmische Expression von Transkriptionsfaktoren der zentralen inneren Uhr, die sich im SCN des Hypothalamus befindet und mit dem thermoregulatorischen Zentrum in engem Kontakt steht (Waterhouse, Drust et al. 2005). Die Temperaturfluktuationen führen an allen Körperzellen außerhalb des SCN, wie Leber, Niere, Fettgewebe oder weiteren Gehirnnarealen, zu einer Synchronisierung von Transkriptionsfaktoren, die ihrerseits wichtige physiologische Parameter kontrollieren können und so zu einem für die Tageszeit passenden Aktivitätsmuster des jeweiligen Organs führen. Es sind bereits zahlreiche Studien veröffentlicht, die den Einfluss der circadianen Expression dieser Clockgene auf vielfältige physiologische und pathologische Prozesse untersucht haben. In einer Reihe von Publikationen konnte beispielsweise der Einfluss des circadianen Rhythmus auf den Energiestoffwechsel (Serin and Acar Tek 2019), Hunger (Wehrens,

Christou et al. 2017), Sättigung (Oliveira Ldos, da Silva et al. 2011) oder aber auch Herzaktivität (Black, D'Souza et al. 2019, Zhang, Chatham et al. 2020), Lungendurchblutung (Spengler and Shea 2000, Sundar, Yao et al. 2015), Filtrationsrate der Niere (Koopman, Koomen et al. 1989, Kimura 2008) und beinahe jeden anderen physiologischen Prozess gezeigt werden.

Ebenso wurde vielfach bereits der generelle Einfluss von Temperatur auf zelluläre Prozesse diskutiert (Quinn 1988, Somero 1995, Perozzo, Folkers et al. 2004, Bischof 2005, de Mendoza 2014). Die molekularen Werkzeuge des Lebens, Proteine, sind auf prototypische Weise von der Temperatur der Umgebung abhängig. Proteine sind komplex aufgebaute Aminosäureketten, die durch intramolekulare Wechselwirkungen relativ stabile Konformationen, Tertiär- sowie Quartärstrukturen einnehmen können (Makhatadze and Privalov 1995). Diese Struktur ist Grundlage für ihre physiologische Aktivität und kann durch Veränderung der Temperatur stark beeinflusst werden (Arcus, Prentice et al. 2016). Bislang gibt es erstaunlich wenige Studien, die den direkten Einfluss von physiologischen Temperaturänderungen auf zelluläre Prozesse untersuchten.

Überraschend ist auch, dass der überwiegende Teil der Rezeptorforschung ausschließlich bei 37 °C durchgeführt wird, wodurch der Einfluss physiologischer Körpertemperaturänderungen außer Acht gelassen wird. Es wäre denkbar, dass die Änderung der Körpertemperatur direkte Auswirkungen auf die Stabilität und Aktivität von Proteinen und Transkriptionsfaktoren oder auf die Interaktion zwischen Transmembranrezeptoren und Liganden hat. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, inwiefern Änderungen der Temperatur im physiologischen Bereich zelluläre Prozesse beeinflussen können. Um den direkten Einfluss von Temperaturänderungen von solchen, die durch Aktivierung circadianer Prozesse zustande kommen unterscheiden zu können, wurden zwei distinkte Temperaturprogramme entwickelt, die in der vorliegenden Arbeit miteinander verglichen werden sollten.

Es konnte herausgefunden werden, dass die Aktivität des CRE-Promotors in mHypoA-2/10-Zellen abhängig von der Inkubationstemperatur reguliert wurde. Bei verringerter Temperatur wurde die transkriptionelle Aktivität des Promotors gesteigert und umgekehrt. Dies wurde auch für den BMAL1-, STAT- und den TRH-, aber nicht für den FOXO-abhängigen Promotor beobachtet. Des Weiteren konnte nach Stimulierung der Zellen mit NA, Sal oder FSK, aber nicht mit BK, gezeigt werden, dass auch die Liganden-

induzierte CRE-Aktivierung abhängig von simulierter Körpertemperatur war. Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass die NA-induzierte preopro-TRH-Aktivität temperaturabhängig war, während die NA-induzierte STAT-Reporteraktivität unabhängig von Temperaturänderungen war. Die Bestimmung der intrazellulären cAMP-Konzentration zeigte einen deutlich erhöhten NA- und Sal-induzierten E_{\max} bei 36 °C gegenüber dem bei 38 °C, während die FSK-induzierte cAMP Akkumulation in deutlich geringerem Ausmaß von der Temperatur abhängig war. Die Analyse des NA-induzierten cAMP-Efflux offenbarte einen bei 38 °C signifikant erhöhten Transport in den extrazellulären Raum, im Verhältnis zu der intrazellulär vorliegenden cAMP-Konzentration. Die Untersuchung des PDE-induzierten cAMP-Abbaus zeigte, dass dieser ebenso bei 38 °C signifikant gegenüber dem bei 36 °C erhöht war. Der temperaturabhängige Efflux und die bei 38 °C erhöhte PDE-Aktivität führten somit zu einer intrazellulären cAMP-Akkumulation, die möglicherweise die temperaturabhängige Aktivität des CRE-Reporters bedingte.

5.1 Temperaturabhängigkeit des CRE-Promotors

Die Konsensus-Sequenz des CRE-Promotors findet sich in einer Vielzahl von Genabschnitten. Unmethylierte CRE-Sequenzen können durch CREB gebunden werden und sind damit aktivierbar. Es sind etwa 4000 dieser Abschnitte bekannt, die sich meist etwa 250 Basenpaare oberhalb des jeweiligen Gens befinden (Zhang, Odom et al. 2005). Die Phosphorylierung von CREB an Ser133 ist eine wichtige Grundlage, die zur Initiierung der Transkription notwendig, aber häufig nicht ausreichend ist. So ist bekannt, dass die Phosphorylierung von CREB nicht automatisch in einer gesteigerten Transkriptionsaktivität resultiert, sondern dass die Rekrutierung und Aktivierung von Cofaktoren wie CRTC, p300 oder CBP notwendig ist (siehe Kapitel 1.3.2.2). Die hohe Expression von CRE-Sequenzen im humanen und murinen Genom und damit einhergehender Beteiligung der CREB-abhängigen Genexpression an vielfältigen physiologischen Prozessen, legte daher die Untersuchung der CRE-Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur nahe. Durch Messung der Luciferaseaktivität konnte die Aktivität des CREB-abhängigen Promotors bestimmt werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Inkubationstemperatur einen starken Einfluss auf die CREB-abhängige Genexpression nahm: An mHypoA-2/10-Zellen wurde beobachtet, dass eine

Verringerung der Temperatur von 37 auf 36 °C zu einer Aktivierung führte. Umgekehrt führte eine Erwärmung der Zellen zu einer signifikanten Verringerung der CREB-abhängigen Reporteraktivität. Dies war insofern auf den ersten Blick erstaunlich, da thermodynamische Überlegungen eine erhöhte Aktivität bei erhöhter Temperatur nahelegten (siehe Kapitel 1.2.4). Feeney und Kollegen weisen in ihrer Publikation auf eine thermale Instabilität der Leuchtkäferluciferase (fLuc) hin (Feeney, Putker et al. 2016). Die Gruppe konnte zeigen, dass die enzymatische Aktivität von fLuc *in vitro* von der Inkubationstemperatur abhängig war. Hierfür testeten sie rekombinant hergestellte fLuc in gepufferter Lösung und konnten bei 37 °C eine erhöhte thermische Inaktivierung, verglichen mit der bei 27 °C, messen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Temperaturänderungen zwischen 35,5 und 38,5 °C vorgenommen und die Zellen bis zu 12 h bei diesen Temperaturen inkubiert. Es wäre daher theoretisch denkbar, dass der Temperaturunterschied zu einer geringfügig veränderten thermischen Stabilität des Luciferaseenzym führt, was in einer veränderten enzymatischen Umsetzung des Substrats mit ebenso veränderter Lichtintensität resultieren würde. Die Gruppe um Feeney wies allerdings auch darauf hin, dass diese thermische Instabilität in der Zelle nicht, bzw. deutlich geringer, auftritt. Intrazellulär gebildete Luciferase wird von HSPs stabilisiert und daher vor thermischem Abbau geschützt (Nguyen and Bensaude 1994). Um dennoch mögliche Effekte der Temperaturänderungen auf die Luciferasestabilität weitestgehend ausschließen zu können, wurden weitere mHypoA-2/10-Reportergenkonstrukte in beiden Temperaturprogrammen getestet. Sollte die thermische Instabilität die Ursache für die temperaturabhängige CREB-Reporteraktivität gewesen sein, hätte dies bei allen getesteten Konstrukten auftreten müssen. Auch nach 8-stündiger Änderung der Temperatur auf 36 oder 38 °C konnte kein signifikanter Unterschied in der FOXO-abhängigen Luciferaseaktivität bestimmt werden. Durch diesen Befund konnte gezeigt werden, dass die gebildete fLuc unter den betrachteten Temperaturänderungen thermisch stabil war.

Die Aktivierung von CREB kann über Bindung an CRE-Elemente des prepro-TRH-Promotors Thyreoliberin-positiver Neurone des PVN zu einer verstärkten TRH-Produktion führen (Xia, Zhang et al. 2015). Das untersuchte hypothalamische Zellsystem zeigte einige für diese Neurone charakteristischen Eigenschaften (siehe Kapitel 1.3.4), wie beispielsweise die Produktion von TRH (Glas, Mückter et al. 2016). Es wurde eine Reporterzelllinie generiert, die das Luciferasegen unter der Kontrolle des vollständigen

prepro-TRH-Promotors stabil exprimierte (mHypoA-2/10-TRH). Messungen der Reporteraktivität zeigten eine temperaturabhängige, basale Regulierung des prepro-TRH-Promotors. Bei 36 °C fand im Vergleich zu 38 °C eine signifikant höhere Luciferaseexpression statt, was mit einer verstärkten Promotoraktivität und prepro-TRH Expression korreliert. Möglicherweise war die temperaturabhängige CREB-Aktivität die Ursache für die ebenso temperaturabhängige Aktivierung des prepro-TRH-Promotors. In diesem Zusammenhang könnte die temperaturabhängige TRH-Promotoraktivität auch zu den bereits bekannten circadianen TRH-Spiegeln führen, die wiederum die circadianen TSH- und T3-Spiegel bedingen (Covarrubias, Uribe et al. 1988, Rose and Nisula 1989, Pekary, Stevens et al. 2006, Kalsbeek and Fliers 2013, Philippe and Dibner 2015, Pekary and Sattin 2017). Daher wäre es denkbar, dass die tageszeitabhängigen Temperaturfluktuationen, neben dem bereits erwähnten rhythmischen Glukokortikoidplasmaspiegel sowie der direkten Stimulation des PVN durch den SCN (Buijs, van Eden et al. 2003), zu einer circadianen TRH-Ausschüttung führen und somit letztendlich die Konzentration zirkulierender Schilddrüsenhormone mit beeinflussen können. In weiteren Studien wäre es daher interessant, die direkte TRH-Expression mittels qRT-PCR zu bestimmen und durch Verwendung spezifischer Inhibitoren den Beitrag von CREB oder STAT an der basalen prepro-TRH-Aktivität zu klären.

5.2 Beteiligung temperatursensitiver Proteine an der CRE-Aktivität

Eine Änderung der Inkubationstemperatur führte nach etwa 4 h zu einer Modulierung der CREB-abhängigen Genexpression. Wie kann eine Temperaturänderung zu einer veränderten transkriptionellen Aktivität führen? Die CREB-Aktivität kann beispielsweise indirekt über die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration reguliert werden (Sheng, Thompson et al. 1991). Durch die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung von CaMK kann CREB an Ser133 phosphoryliert und daher durch erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel aktiviert werden. Thermosensitive TRP-Kanäle können temperaturabhängig zu einer solchen Erhöhung von Ca^{2+} führen (Castillo, Diaz-Franulic et al. 2018).

Durch Verwendung klassischer TRP-Kanalmodulatoren wie 2-APB und RuR wurde der Beitrag von möglichen thermosensitiven TRP-Kanälen an der temperaturvermittelten Aktivität von CREB untersucht. Die Vorinkubation von mHypoA-2/10-CREB-Zellen mit 2-APB führte zu einer annähernd vollständigen Aufhebung des Unterschieds in der CRE-

Aktivität zwischen 35,5 und 38,5 °C, während die Inkubation von RuR zu keiner Veränderung führte. Genauere Betrachtungen ergaben, dass 2-APB den CRE-Reporter temperaturabhängig aktivierte (siehe Abb. 26). Die durch 38,5 °C verringerte CRE-Aktivität wurde durch die Inkubation mit 2-APB stark erhöht, während bei 35,5 °C keine 2-APB induzierte CRE-Aktivierung messbar war. 2-APB zeigt nicht nur unselektive Wirkungen an diversen TRP-Kanälen [TRPV1-3 werden sogar durch 2-APB aktiviert (Colton and Zhu)], sondern auch unspezifische Wirkung an weiteren Zielstrukturen, wie z. B. IP₃-Rezeptoren (Missiaen, Callewaert et al. 2001). Daher sollte die Verwendung weiterer TRP-Kanalmodulatoren helfen, die Frage nach dem Mechanismus der temperaturabhängigen CREB-Aktivierung zu beantworten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben Mefenaminsäure (MefAc) auch Flufenaminsäure (FluAc) verwendet. Beide Reagenzien werden hauptsächlich eingesetzt, um TRPM-Kanäle zu inhibieren. Zum Zeitpunkt der Versuchsplanung war kein spezifischer Inhibitor für TRPM2 zugänglich. Für FluAc ergibt sich eine Reihenfolge der Inhibition von TRPM4 > TRPM3 > TRPM2; für MefAc TRPM3 >> TRPM2 (Harteneck 2005, Chen, Zeng et al. 2012, Held, Voets et al. 2015). Die Vorinkubation von mHypoA-2/10-CREB Zellen mit MefAc und FluAc führte in beiden Fällen zu einer signifikanten Reduktion des temperaturbedingten Unterschieds in der CRE-Aktivität. Nachdem beide Inhibitoren bei höheren Konzentrationen unselektiv die TRPM-Kanalsubtypen 2-4 inhibieren, war eine genauere Aussage, welcher Kanal oder welche Kanäle an der temperaturabhängigen CRE-Aktivierung beteiligt waren, schwer zu treffen. Anzumerken sei auch, dass die Expression von den genannten TRP-Kanälen teilweise sehr schwach war. Eine geringe mRNA-Expression korreliert allerdings nicht zwangsläufig mit einer geringen Proteinexpression (Greenbaum, Colangelo et al. 2003, de Sousa Abreu, Penalva et al. 2009, Maier, Güell et al. 2009, Fortelny, Overall et al. 2017), weshalb einzelne TRP-Kanal-Subtypen auch nicht aufgrund ihrer Expressionsrate ausgeschlossen werden konnten. Generell würde die Aktivierung von wärmesensitiven TRP-Kanälen über den zuvor beschriebenen Mechanismus zu einer erhöhten Ca²⁺-Konzentration führen, was theoretisch letztlich zu einer verstärkten CRE-Aktivierung führen sollte. Die Aktivierung von kältesensitiven TRP-Kanälen würde daher, zumindest theoretisch, besser zu den experimentellen Befunden passen. Möglicherweise ist der Zusammenhang zwischen TRP-Kanal- und CRE-Aktivierung aber durch Aktivierung einer Ca²⁺-abhängigen Phosphatase, wie beispielsweise Calcineurin, bedingt. Kecskés und Kollegen konnten

zeigen, dass die Aktivierung von TRP-Kanälen zu einer erhöhten Calcineurin-Aktivität führte (Kecskés, Jacobs et al. 2015). In einer weiteren Studie konnte auch der Zusammenhang zwischen Calcineurin und CREB gezeigt werden. Die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung von Calcineurin führte zu einer Inhibition der CREB-abhängigen Genexpression (Grossmann, Wuttke et al. 2010).

Überraschenderweise bewirkte die Inkubation mit BAPTA-AM keine Reduktion des temperaturbedingten Unterschieds der CRE-Aktivität. Als Ca^{2+} -Chelator mit hoher Affinität ($K_d \sim 200 \text{ nM}$) und rapider Bindungsrate ($\sim 4 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) wäre zu erwarten gewesen, dass ein temperaturbedingter, TRP-vermittelter Ca^{2+} -Einstrom sofort komplexiert würde und daher für Ca^{2+} -abhängige Prozesse, die zu einer CRE-Aktivierung führen, nicht zur Verfügung stünde. Dies könnte daher für eine Beteiligung Ca^{2+} -unabhängiger Prozesse an der temperaturabhängigen CRE-Aktivierung sprechen. Allerdings ist für TRPM2 und 3, anders als für TRPM6 und 7, keine Ca^{2+} -unabhängige Aktivierung intrazellulärer Signalwege bekannt. Die gewählte BAPTA-AM-Konzentration von $10 \mu\text{M}$ befand sich unterhalb der in wissenschaftlichen Publikationen sonst üblichen Konzentration von 50 bis $100 \mu\text{M}$ (Macdonald, Zhang et al. 1999, Waters, Padula et al. 2020). Da allerdings ein signifikanter Effekt auf die basale CRE-Aktivität gemessen werden konnte, wurde davon ausgegangen, dass die Konzentration ausreichend war, um intrazelluläres Ca^{2+} zu komplexieren. Es ist bekannt, dass die Stimulierung von Ca^{2+} -leitenden Kanälen zu einer starken Konzentrierung des sekundären Botenstoffs am Eintrittsort der Zelle führt (Berridge 2006, von Wegner, Wieder et al. 2012, Kohlhaas and Maack 2013, Shigetomi, Bushong et al. 2013). Aufgrund von Diffusionsbarrieren kommt es somit zu räumlich getrennten Ca^{2+} -Spitzen, die in unmittelbarer Nähe befindliche Effektoren aktivieren können. Aufgrund der hohen Bindungsrate von BAPTA-AM ist die Diffusionsstrecke der einströmenden Ca^{2+} -Ionen allerdings auf lediglich etwa 20 nm beschränkt (Parekh 2008). Es konnte dennoch bereits gezeigt werden, dass die Interaktion von TRPC7 und der Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums [engl. *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase* (SERCA)] selbst bei hohen BAPTA-Konzentrationen aufrechterhalten wurde, was an einem engen Kontakt der beiden Proteine lag (Lemonnier, Trebak et al. 2006). Es könnte daher sein, dass BAPTA-AM in mHypoA-2/10-Zellen zwar zu einer Reduktion des intrazellulären Ca^{2+} führt, aber aufgrund der räumlichen Nähe von Ca^{2+} -bindenden Proteinen und dem mutmaßlichen TRP-Kanal der temperaturabhängige Ca^{2+} -Einstrom nicht durch BAPTA-

AM komplexiert werden konnte. Daher wäre es möglich, dass thermosensitive TRP-Kanäle über Beeinflussung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels zu einer temperaturabhängigen CREB-Aktivität führten, die durch BAPTA-AM nicht verändert wurden. Hier sind allerdings weitere Studien notwendig, um diese Hypothese zu stützen. Um den Beitrag von TRP-Kanälen wie TRPM2, 3 oder 4 an dem durch Temperatur induzierten Effekt auf die CREB-abhängige Genexpression zu klären, wäre es zukünftig von großem Interesse, durch RNA-Interferenz gezielt die Expression der TRP-Kanäle zu verringern und erneut Temperaturexperimente durchzuführen. In dieser Arbeit kann daher vorerst keine endgültige Aussage über die Beteiligung von TRP-Kanalsubtypen an der temperaturabhängigen CREB-Aktivität getroffen werden.

Mit CIRP ist ein Protein beschrieben, dessen Expression bei moderater Kälte erhöht wird. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die CIRP-mRNA-Expression abhängig von der Inkubationstemperatur kontrolliert wurde. Innerhalb von 30 min nach Verringerung der Temperatur auf 36 °C, konnte ein signifikanter Anstieg mittels qRT-PCR im Vergleich zu 38 °C festgestellt werden (siehe Abb. 22). Da CIRP ein RNA-bindendes und -stabilisierendes Protein ist, könnte die thermosensitive Expression des Proteins zu einer temperaturabhängigen Stabilisierung von mRNAs führen, die an der CREB-abhängigen Genexpression beteiligt sind, wie beispielsweise CREB, CRTCs und PKA. Um herauszufinden, ob CIRP einen Einfluss auf die CRE-Aktivität nehmen kann, wurde das Protein in HEK-293-CREB und mHypoA-2/10-CREB-Zellen überexprimiert. Die Überexpression von CIRP führte in HEK-293-, aber nicht in mHypoA-2/10-Zellen, zu einer erhöhten CRE-Aktivität, die allerdings statistisch nicht signifikant war. Es wurde daher mittels RNA-Interferenz die endogene Expression von CIRP in mHypoA-2/10-Zellen verringert. Dies führte zu keiner signifikanten Veränderung der CREB-abhängigen Reporteraktivität. In NIH3T3-Fibroblasten führte die Inkubation bei leicht verringerter Temperatur (32 °C) zur Erhöhung von einer einzigen CIRP-mRNA Isoform ohne jedoch die totalen CIRP-mRNA-Spiegel zu verändern (Gotic, Omid et al. 2016). Es wäre daher theoretisch möglich, dass die relevante Isoform von CIRP durch die verwendete siRNA nicht herunterreguliert wurde. Um den Einfluss von CIRP auf die temperaturabhängige CREB-Reporteraktivität eingehender zu studieren, sollten in zukünftigen Experimenten isoformspezifische siRNA-Varianten verwendet werden.

Neben CIRP wurde auch die Beteiligung von hsf1 untersucht. Bei hsf1 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der zentral an der Produktion von HSPs beteiligt ist. Einerseits wird hsf1 temperaturabhängig aus dem inaktiven Komplex mit HSPs freigesetzt und kann daher in Abhängigkeit von der Temperatur an HSEs im Zellkern binden und die Expression von Zielgenen modulieren. Andererseits konnte nachgewiesen werden, dass hsf1 direkt abhängig von der Temperatur homotrimerisiert und aktiviert wird, was ebenso zu einer gesteigerten Genexpression führt. Die Trimerisierung von hsf1 wurde als thermodynamischer Prozess beschrieben, der auch im Bereich der physiologischen Körpertemperatur reguliert wird (siehe Kapitel 1.2.1). Daher könnte durch eine temperaturabhängige Aktivierung von hsf1 eine thermosensitive Genexpression von Zielgenen initiiert werden, die direkt oder indirekt zu einer veränderten CREB-Aktivierung führt. HSPs sind des Weiteren für ihre Wirkung als Chaperone bekannt. Durch Stabilisierung von Proteinen können diese vor dem Abbau geschützt werden, so beispielsweise theoretisch auch CREB. Daher wurde einerseits mittels qRT-PCR im CP überprüft, ob durch Simulierung circadianer Körpertemperaturänderungen die hsf1-Expression reguliert wird. Andererseits wurde getestet, ob die Inhibition der hsf1- und HSP-Induktion durch KNK437 zu einer veränderten, temperaturabhängigen CRE-Aktivierung führt. Beide Experimente zeigten ein negatives Ergebnis (siehe Abb. 21), weshalb in dieser Arbeit eine Beteiligung von hsf1 an der temperaturabhängigen CRE-Aktivierung ausgeschlossen wurde. Dieser Schluss stellte eine Vereinfachung dar, da aus Zeit- und Kostengründen nur die vielversprechendsten Befunde weiterverfolgt werden konnten. Um eine Beteiligung von hsf1 mit größerer Sicherheit ausschließen zu können, sollte die hsf1-Expression mittels siRNA verringert werden, um anschließend einen etwaigen Beitrag am CREB-abhängigen Reportersignal zu überprüfen. Nachdem *in vitro* bereits nachgewiesen wurde, dass Luciferase mit HSPs grundsätzlich interagiert (Nimmegern and Hartl 1993, Nguyen and Bensaude 1994), wäre es für zukünftige Experimente von Interesse, ob diese Interaktion auch bei geringen Temperaturunterschieden funktionell relevant ist.

Die Untersuchung von temperatursensitiven Proteinen mit einer Signalwirkung konnte zeigen, dass die basale, temperaturabhängige Aktivierung des CRE-Reporters durch die Verwendung von TRPM-Kanalmodulatoren, signifikant verringert wurde. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Expression von CIRP, nicht aber von hsf1, abhängig von physiologischen Temperaturänderungen war. Um den genauen Beitrag dieser

Thermosensoren an der CREB-abhängigen Genexpression zu bestimmen, sind allerdings weitere Experimente notwendig. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss potenzieller Temperatursensoren lediglich auf die basale Aktivität des CREB-abhängigen Reporters untersucht. Dennoch ist ein Einfluss dieser auf die Liganden-induzierte CREB-Aktivierung, zusätzlich zu den im folgenden Abschnitt präsentierten Mechanismen, möglich und keinesfalls auszuschließen.

5.3 Temperaturabhängige cAMP-Akkumulation

Um weiter zu untersuchen, ob die Körpertemperatur an der Signalweiterleitung und Genexpression regulativ beteiligt ist, wurden mHypoA-2/10-Zellen mit verschiedenen Liganden und Hormonen stimuliert. Die Stimulierung von mHypoA-2/10-Zellen mit NA, Sal und FSK, jedoch nicht mit BK, führte zu einer temperaturabhängigen induzierten Aktivierung des CREB-abhängigen Reporters. Eine Aktivierung von CREB wurde häufig nach Phosphorylierung an Ser133 durch PKA gezeigt (Lundblad, Kwok et al. 1995, Bannister and Kouzarides 1996, Parker, Ferreri et al. 1996, Goodman and Smolik 2000, Asahara, Santoso et al. 2001). PKA kann direkt durch steigende cAMP-Spiegel aktiviert werden (Corbin and Krebs 1969, Castellucci, Kandel et al. 1980). Es wurde folglich überprüft, ob die Stimulierung von mHypoA-2/10-CREB-Zellen zu einer cAMP-Akkumulation führte, die abhängig von der Inkubationstemperatur war.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass die basale cAMP-Akkumulation zwischen 36 und 38 °C nicht signifikant beeinflusst wurde (siehe Abb. 48). Dies war unerwartet, da eine hohe Korrelation von cAMP-Akkumulation und CRE-Aktivierung angenommen wurde und der CREB-Reporter, wie zuvor beschrieben, abhängig von der Inkubationstemperatur reguliert wurde. Tatsächlich wurde allerdings bereits vielfach publiziert, dass intrazellulär steigende cAMP-Spiegel nicht zwangsläufig mit einer Aktivierung des CRE-Promotors einhergehen müssen (Bonni, Ginty et al. 1995, Thompson, Ginty et al. 1995, Glas, Mückter et al. 2016). Außerdem war die basale cAMP-Akkumulation nicht besonders stark ausgeprägt, weshalb auch in Betracht gezogen wurde, dass statistisch signifikante, temperaturbedingte Unterschiede der intrazellulären cAMP-Spiegel aufgrund mangelnder Sensitivität der Messmethode nicht gemessen werden konnten. Allerdings konnten in weiteren getesteten Zelllinien, beispielsweise in HEK-293-Zellen, deutlich geringere basale cAMP-Spiegel bestimmt werden, was gegen ein Sensitivitätsproblem

spricht und den Befund stärkt, dass die basale cAMP-Akkumulation nicht temperaturabhängig moduliert wird. Die Stimulierung von mHypoA-2/10-Zellen mit NA, Sal oder FSK offenbarte eine temperaturabhängige induzierte cAMP-Akkumulation. Nach 60 min war die induzierte cAMP-Akkumulation sowohl im AP als auch im CP bei 36 °C signifikant gegenüber der bei 38 °C erhöht. Zur näheren Beschreibung des Phänomens wurden Dosis-Wirkungs-Kurven der NA-Stimulation in beiden Temperaturprogrammen angefertigt, woraus hervorging, dass nicht der EC_{50} , sondern der E_{max} durch Temperatur beeinflusst wurde. Ein erhöhter E_{max} kann neben einer vergrößerten Rezeptorzahl auch bei einer gesteigerten Effizienz einer oder mehrerer an der cAMP-Akkumulation beteiligten Einzelschritte auftreten (Kenakin 2004). Die Bindung von Agonisten an den β_2 -AR startet eine Signalkaskade, die mit der G-Proteinaktivierung beginnt und über eine AC-Aktivierung letztlich zu einer erhöhten intrazellulären cAMP-Akkumulation führt. Daher können prinzipiell alle Prozesse, die an der Aktivierung des Signalwegs direkt oder indirekt beteiligt sind, in Abhängigkeit von der Temperatur reguliert werden und somit den intrazellulären cAMP-Spiegel modulieren. So kann beispielsweise die Aktivität von G-Proteinen durch Interaktion von Proteinen mit *regulator of g-protein signaling*-Domäne beeinflusst werden. Auch die Rezeptoraktivität kann nach Phosphorylierung durch GRKs oder durch Interaktion mit β -Arrestinen moduliert werden, was zu einer gesteigerten Endozytoserate oder Herunterregulierung des Rezeptors führen könnte. In diesem Zusammenhang wäre auch ein Zusammenspiel mit Komponenten der inneren Uhr denkbar, da bereits publiziert wurde, dass die Glukagon-induzierte cAMP-Produktion und nachfolgende CREB-Aktivierung durch CRY1 und CRY2 inhibiert wurde (Zhang, Liu et al. 2010). Die Arbeitsgruppe konnte dort zeigen, dass die circadiane Expression von CRY1 und CRY2 zu einer direkten Interaktion mit der α_s -Untereinheit des rezeptorassoziierten G-Proteins führte, woraufhin die Signalkaskade beendet wurde. Daher erschien es höchst interessant, die Prozesse, die zu einer temperaturabhängigen Liganden-induzierten cAMP-Akkumulation führten, ausführlicher zu untersuchen.

Zunächst wurde die Bindung von NA und Sal an den β_2 -AR im AP und CP bestimmt. Hierfür wurde ^{125}I -CYP, ein inverser Agonist an β_2 - und β_3 -AR, eingesetzt. Die Affinität von ^{125}I -CYP an den β_3 -AR ist gegenüber dem β_2 -AR um den Faktor 10 verringert [K_D (β_2) 45 ± 14 pM; K_D (β_3) 512 ± 135 pM] (Niclauß, Michel-Reher et al. 2006). Bei der Anfertigung der Sättigungskurve muss davon ausgegangen werden, dass auch

signifikante Mengen des radioaktiven Liganden an den β_3 -AR gebunden wurden, weshalb die tatsächliche Expression des β_2 -AR höchstwahrscheinlich etwas geringer ausfällt. Man hätte allerdings deutlich höhere ^{125}I -CYP-Konzentrationen einsetzen müssen, um eine quantitative Bindung an den β_3 -AR zu erreichen. Dies hätte eine hohe radioaktive Belastung dargestellt, weshalb im Rahmen der vorliegenden Arbeit darauf verzichtet werden musste. Bei der Verwendung von 75 pM ^{125}I -CYP beträgt die theoretische β_3 -Rezeptorbelegung lediglich 12 %, weshalb ^{125}I -CYP zum überwiegenden Teil an β_2 -AR und nur untergeordnet an den β_3 -AR gebunden vorlag. Die Verdrängung von ^{125}I -CYP durch NA und Sal offenbarte keine temperaturabhängige Affinität der Liganden zum β_2 -AR im CP und im AP. Es wurde erkennbar, dass Sal aber nicht NA zu einer biphasischen Verdrängung von ^{125}I -CYP vom β_2 -AR führte.

Nach dem *ternary complex model* kommt ein GPCR in (mindestens) zwei Konformationen vor, die auf die intrazelluläre Bindung des G-Proteins zurückzuführen sind (siehe Kapitel 1.4.2.1). Die Bindung des G-Proteins führt zu einer Konformationsänderung, die eine hochaffine Bindung von Liganden an den Rezeptor ermöglicht. Die Verdrängung von ^{125}I -CYP vom β_2 -AR erfolgt also zunächst von der hochaffinen Bindestelle, da die Affinität des Agonisten zu dieser besonders hoch ist. Ist diese Bindestelle schließlich besetzt, erfolgt bei weiter steigender Konzentration des Agonisten auch eine Konkurrenz an der niederaffinen Bindestelle. Aus dieser biphasischen Reaktion ergibt sich konsequenterweise ein biphasischer Verlauf der Bindungskurve. Erstaunlicherweise war die kompetitive Bindung von ^{125}I -CYP und NA nicht, wie zu erwarten gewesen wäre, biphasisch. Möglicherweise konnte die Kurve durch die unvollständige Verdrängung von ^{125}I -CYP nicht korrekt berechnet werden und eine weitere Erhöhung der NA-Konzentrationen hätte zu einer Offenbarung einer zweiten Bindestelle geführt. In einigen Studien wurde NA in deutlich höheren Konzentrationen eingesetzt, um eine vollständige Verdrängung zu erreichen (Sugasawa, Matsuzaki-Fujita et al. 1997). Bei ausführlicher Literaturrecherche wurde darüber hinaus allerdings offensichtlich, dass für die Konkurrenz zwischen ^{125}I -CYP und NA häufig kein biphasischer Verlauf bestimmt werden konnte oder dieser sehr schwach ausgeprägt war (Madison, Basbaum et al. 1989, Roberts, Molenaar et al. 1993). Die Konkurrenz von ^{125}I -CYP mit Propranolol, einem nicht-selektiven β -AR-Antagonisten, verlief monophasisch. Außerdem konnte durch die Verwendung von Gpp(NH)p, einem nicht-hydrolysierbaren GTP-Analogen, eine signifikante Abschwächung des biphasischen

Verlaufs erreicht werden. Anhand dieser Befunde konnte hiermit einerseits gezeigt werden, dass der biphasische Verlauf tatsächlich den Konformationen des β_2 -AR geschuldet war und der β_3 -AR, wie vermutet, nicht relevant an der ^{125}I -CYP-Bindung beteiligt war. Andererseits konnte durch die Konkurrenzexperimente gezeigt werden, dass weder die Bindung von NA oder Sal noch die exprimierte β_2 -AR-Menge unter den beschriebenen Bedingungen von der Inkubationstemperatur abhängig war.

Um die temperaturabhängige induzierte cAMP-Akkumulation zu erklären, wurde auch versucht, die NA-induzierte G-Proteinaktivierung direkt zu bestimmen, was entgegen den Erwartungen nicht glückte. Es konnte über die basale G-Proteinaktivität hinaus keine weitere induzierte G-Proteinaktivierung gemessen werden (siehe Abb. 46). Hierfür wurde eine Vielzahl von Puffersystemen getestet, da bereits gezeigt werden konnte, dass die Wahl des Puffers einen großen Einfluss auf die G-Proteinaktivierung nimmt (Bidlack and Parkhill 2004). Auch die Verwendung von frisch präparierten Membranen, die nicht zur späteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurden, brachte nicht das gewünschte Ergebnis. Ein Grund für die ausbleibende G-Proteinaktivierung lag möglicherweise an der verwendeten NA-Konzentration von $10\text{ }\mu\text{M}$. Diese wurde so gewählt, um die gleiche Konzentration zu benutzen, die zu einer CREB-abhängigen Reporteraktivität führte. Eventuell war diese Konzentration nicht ausreichend, um eine maximale G-Proteinaktivierung zu provozieren (Venugopalan, Ghali et al. 2006). Ein weiterer Grund könnte in den Eigenschaften der G-Proteinsubtypen zu finden sein. Da die Verwendung von $[\text{}^{35}\text{S}]\text{-GTP}\gamma\text{S}$ zu einem Austausch von GDP an allen G_α -Proteinsubtypen führt (Milligan 2003) und die Aktivierung von $\text{G}_{\alpha\text{i}}$ -Proteinen typischerweise stark überwiegt (Strange 2010), könnte die NA-induzierte Aktivierung von $\text{G}_{\alpha\text{s}}$ -Proteinen durch den hohen basalen Austausch an $\text{G}_{\alpha\text{i}}$ -Proteinen überdeckt gewesen sein. Bislang konnte eine NA-induzierte und β_2 -AR-vermittelte G_s -Proteinaktivierung in endogenen Zellsystemen noch nicht gezeigt werden. Möglicherweise ist die Signalstärke ohne weitere Amplifikationsschritte zu gering. Um diese These zu überprüfen, wurde der G_s -Proteinsubtyp gezielt präzipitiert, was allerdings auch zu keiner messbaren Aktivierung führte. Vielleicht könnte in zukünftigen Experimenten durch eine Überexpression des G_s -Subtyps eine ausreichende NA-induzierte G_s -Proteinaktivierung gemessen werden. Die Verdrängung von ^{125}I -CYP wurde schließlich noch an intakten mHypoA-2/10-Zellen durchgeführt, um eine dynamische Beteiligung von G-Proteinen an der Ligandenbindung zu untersuchen. Die Durchführung der Bindung bei 36 oder $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ führte nicht zu einer

veränderten Bindung von Sal an den Rezeptor. Eine Beteiligung von G-Proteinen an der temperaturabhängigen cAMP-Akkumulation kann damit allerdings nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Eine weitere denkbare Möglichkeit, über die der intrazelluläre cAMP-Spiegel temperaturabhängig moduliert werden könnte, ist über Rezeptordesensibilisierung. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch die NA-induzierte β_2 -AR-Endozytose und -Herunterregulierung bestimmt. Es wurde eine Endozytoserate von $9,3 \pm 1,8$ % bei 36 °C und $15,3 \pm 3,2$ % bei 38 °C errechnet (siehe Abb. 43). Nach einstündiger Stimulierung mit 10 μ M NA wurde an dieser Stelle eine höhere Endozytoserate für den β_2 -AR erwartet. So wurde eine Endozytoserate von etwa 20 % nach nur 5-minütiger Stimulation mit 10 μ M Isoproterenol (Iso) und nach 30-minütiger Stimulation von 30 % beschrieben (Nantel, Bonin et al. 1993, Jockers, Da Silva et al. 1996). Eine mögliche Ursache für die geringe Endozytoserate könnte in der Ausbildung von Heterodimeren liegen. Es wurde gezeigt, dass der β_3 -AR nach kurzzeitiger Stimulation mit Iso nicht sequestriert wird (Jockers, Da Silva et al. 1996, Vicario, Candelore et al. 1998). Die Bildung von Rezeptor-Oligomeren ist für eine Vielzahl von Rezeptoren beschrieben worden (Milligan 2009). Auch die Ausbildung von β_2 -AR- und β_3 -AR-Hetero-Oligomeren wurde bereits gezeigt (Breit, Lagacé et al. 2004). Diese Arbeitsgruppe konnte in dem Zusammenhang auch nachweisen, dass die Bindung einiger β_2 -AR-Liganden durch die Ausbildung von β_2 -/ β_3 -AR-Hetero-Oligomeren nicht beeinflusst wurde, weshalb deren Anwesenheit häufig übersehen wird. Interessanterweise konnte in der Publikation gezeigt werden, dass die Agonisten-induzierte Rezeptorsequestrierung des β_2 -AR nach Ausbildung von β_2 -/ β_3 -AR-Hetero-Oligomeren vollständig verhindert wurde. Diese Befunde eröffnen theoretisch die Möglichkeit, dass auch in mHypoA-2/10-Zellen Hetero-Oligomere aus β_2 - und β_3 -AR ausgebildet werden. Allerdings konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass es nach einstündiger Stimulation der Zellen mit NA zu einer starken Rezeptor-Herunterregulierung kam (bei 36 °C $46,3 \pm 6,0$ % und bei 38 °C $35,0 \pm 1,3$ %). Normalerweise führt eine Rezeptorphosphorylierung durch beispielsweise GRKs und anschließender Bindung von Arrestinen zu einer Clathrin-vermittelten Rezeptorendozytose. Anschließend kann der Rezeptor intrazellulär im Endosom abgebaut werden. Eine Möglichkeit für das Missverhältnis zwischen Endozytoserate und Herunterregulierung könnte in der Kinetik der Stimulation gelegen haben. Eine einstündige Inkubation der Zellen mit 10 μ M NA führte womöglich innerhalb

von wenigen Minuten bereits zu einer Rezeptorendozytose. Die fortdauernde Stimulierung mit NA resultierte dann schließlich in einem Rezeptorabbau, der deshalb nach einer Stunde stark ausgeprägt war. So würde in diesem Fall die Endozytoserate stark unterschätzt werden. Um dieser Problematik gerecht zu werden, sollte eine kürzere Stimulierung der Zellen in Betracht gezogen werden und erneut die Endozytoserate bestimmt werden.

5.4 cAMP-Efflux und PDE-Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur

Der intrazelluläre cAMP-Spiegel ist die Konsequenz aus cAMP-Produktion und -Abbau. Der durch Salomon und Kollegen publizierte (Salomon, Londos et al. 1974) und für diese Arbeit modifizierte cAMP-Assay ist ein Akkumulationsassay, der auf der Verwendung von 1 mM IBMX beruht. IBMX ist ein nicht-selektiver PDE-Inhibitor, weshalb der cAMP-Abbau verhindert oder zumindest stark reduziert werden sollte (Lugnier, Schoeffter et al. 1986). Überraschenderweise wurde nach 60-minütiger NA-Stimulation im Vergleich zu einer 20-minütigen Inkubation ein deutlicher ‚cAMP-Verlust‘ festgestellt. Die fortdauernde Stimulierung über 20 min hinaus führte zu einer um 58 ± 4 -prozentigen Verringerung des intrazellulären cAMPs (siehe Abb. 53). Es wurde gezeigt, dass ein Großteil des ‚fehlenden‘ cAMPs in der extrazellulären Fraktion wiedergefunden werden konnte. Die Inkubation von mHypoA-2/10-Zellen mit NA führte also zu einem ausgeprägten zeitabhängigen cAMP-Efflux, der durch die Inkubation mit Indomethacin, einem nicht-selektiven ABCC-Transporter-Inhibitor, deutlich reduziert werden konnte. ABCC-Pumpen können unter Energieaufwand unterschiedlichste Stoffe und Xenobiotika aus der Zelle in den EZR befördern und damit die Zelle vor möglichen Schäden durch toxische Substanzen bewahren. Für den Subtyp ABCC4 konnte bereits gezeigt werden, dass Nukleotide wie cAMP ein geeignetes Substrat darstellen und daher transportiert werden können (Jedlitschky, Burchell et al. 2000, Wielinga, Van Der Heijden et al. 2003, Sassi, Lipskaia et al. 2008, Sassi, Abi-Gerges et al. 2012, Godinho, Duarte et al. 2015). Es wäre daher denkbar, dass die Verwendung von IBMX und die daraus resultierende Inhibition von PDEs zu unnatürlich hohen intrazellulären cAMP-Spiegeln führen könnte, die aufgrund ihres toxischen Potenzials durch einen Transport in den EZR von der Zelle beseitigt werden. Der Verzicht von IBMX führte aber dennoch zu einem ausgeprägten

Efflux, der nach 60 min etwa 75 % des gesamten, noch vorhandenen cAMPs ausmachte (Daten nicht gezeigt). Daher könnte eine physiologische Bedeutung des cAMP-Efflux in dem extrazellulären cAMP-Adenosin-Signalweg begründet sein. Extrazelluläres cAMP kann durch (extrazelluläre) Ecto-PDEs in 5'-AMP und durch Ecto-5'-Nukleotidasen (beispielsweise CD73) weiter in Adenosin umgewandelt werden, was nachfolgend an AdR der Zellmembran binden kann und somit seinerseits über die Kopplung an G_i - oder G_s -Proteinen den intrazellulären cAMP-Spiegel komplex regulieren könnte (Sassi, Abi-Gerges et al. 2012, Godinho, Duarte et al. 2015). Somit könnte eine NA-induzierte Aktivierung des β_2 -AR über cAMP-Efflux zu einer Aktivierung von AdRs führen, die über G_i -Kopplung das Signal verringern oder über G_s -Kopplung zu einer verzögerten erneuten Aktivierung von ACs führen. An murinen Skelettmuskelpräparationen konnte bereits eine solche Beteiligung des extrazellulären cAMP-Adenosin-Signalwegs gezeigt werden (Duarte, Menezes-Rodrigues et al. 2012). Hier führte die Stimulation von G_i -gekoppelten AdRs zu einer negativen Rückkopplung und damit zu einer Limitierung positiv inotroper Effekte. Die Analyse der Daten aus der totalen RNAseq konnte eine starke Expression von AdR-2b in mHypoA-2/10-Zellen zeigen. Der Rezeptor wird auch funktionell exprimiert, da eine Stimulierung mit BAY60-6583, einem selektiven AdR-2b-Agonisten, zu einer signifikanten Induktion des CREB-abhängigen Reporters führte (Daten nicht gezeigt). Daher wäre es von Interesse, den Beitrag extrazellulären cAMPs an der AdR-Stimulierung in mHypoA-2/10-Zellen in weiteren Versuchen zu erörtern.

Der beschriebene cAMP-Efflux nach Stimulierung der Zellen mit NA war auch abhängig von akuten Temperaturänderungen. Es konnte gezeigt werden, dass der absolute cAMP-Efflux bei 36 °C etwas höher als bei 38 °C war. Nach Berücksichtigung des zu dem Zeitpunkt intrazellulär vorhandenen cAMPs war allerdings der relative Efflux bei 38 °C signifikant erhöht. Das Verhältnis aus Efflux zu intrazellulärem cAMP (rEC) betrug bei 36 °C $1,1 \pm 0,1$ und bei 38 °C $1,5 \pm 0,1$ (siehe Abb. 55). Der cAMP-Efflux allein konnte allerdings den ‚cAMP-Verlust‘ nicht vollständig erklären. Die Summe aus intra- und extrazellulärem cAMP war nach 20 min immer noch größer als nach 60 min. Dies konnte lediglich bei einer Inkubation der Zellen bei 38 °C beobachtet werden. Die Inkubation der Zellen bei 36 °C führte zu keinem ‚cAMP-Verlust‘ zwischen 20 und 60 min, wenn das extrazelluläre cAMP berücksichtigt wurde. Nachdem technische Fehler ausgeschlossen werden konnten, wurde überprüft, ob eine Erhöhung der IBMX-Konzentration von 1 mM auf 2 mM den ‚cAMP-Verlust‘ reduzieren konnte. Tatsächlich

führte die Inkubation der Zellen mit 2 mM IBMX zu einer signifikanten Verringerung (Daten nicht gezeigt). Überraschenderweise konnte auch ein Rückgang des temperaturbedingten Unterschieds in der cAMP-Akkumulation beobachtet werden. So war mit 2 mM IBMX nach 20 min Stimulation kein temperaturbedingter Unterschied des totalen cAMP mehr festzustellen. Nach 60 min konnte der Unterschied immerhin noch signifikant reduziert werden (Daten nicht gezeigt). Diese Befunde deuten darauf hin, dass PDEs trotz vermeintlicher Inhibition noch aktiv waren. Mit PDE8 wurde ein Subtyp beschrieben, dessen Aktivität nicht durch IBMX beeinflusst wird (Bender and Beavo 2006, Lerner and Epstein 2006, Hill, Li et al. 2016). Im verwendeten Zellmodell werden signifikante Mengen an PDE8a exprimiert, weshalb PF-04957325, ein spezifischer PDE8-Inhibitor, eingesetzt wurde, um zu überprüfen, ob dieser zu einer signifikanten NA-induzierten cAMP-Akkumulation führt. Nachdem dies allerdings nicht der Fall war (Daten nicht gezeigt), konnten darauf basierend eine Beteiligung des PDE8-Subtyps an der beobachteten cAMP-Degradation ausgeschlossen werden. Daher wurde im Folgenden die Möglichkeit einer unvollständigen PDE-Inhibition weiter untersucht. Hierfür wurde direkt die PDE-Aktivität durch Inkubation von mHypoA-2/10-Zellfragmenten mit exogenen ^3H -cAMP untersucht. Nachdem das Experiment bei 37 °C etabliert worden war, konnte schließlich eine temperaturabhängige PDE-Aktivität gemessen werden. Nach 20 min bei 38 °C wurde signifikant mehr ^3H -cAMP abgebaut als bei 36 °C. Der prozentuale Abbau betrug bei 36 °C $12,7 \pm 2,1 \%$ und $21,2 \pm 1,8 \%$ bei 38 °C (siehe Abb. 59). Diese Daten legen nahe, dass die PDE-Aktivität in mHypoA-2/10-Zellen maßgeblich durch Temperaturänderungen im physiologischen Bereich reguliert wird. Es sollte allerdings berücksichtigt werden, dass durch die mechanische Disruption der Zellen die intrazellulären Bestandteile aus ihrer nativen Umgebung extrahiert wurden und deshalb möglicherweise eine abweichende Funktionalität gemessen wurde. Idealerweise sollte ein zellmembrangängiges, radioaktiv markiertes Substrat für PDEs eingesetzt werden, dessen Abbau in intakten Zellen, während einem Temperaturstimulus gemessen werden könnte.

5.5 Modell der NA-induzierten Regulation des intrazellulären cAMP-Spiegels

Im Rahmen dieser Arbeit wurde aus den zuvor getätigten Beobachtungen ein Modell für den induzierten zellulären cAMP-Haushalt entwickelt, welches in Abb. 62 schematisch dargestellt ist.

Nach Bindung von NA an den β_2 -AR mit nachfolgender Aktivierung von membranständigen ACs, kommt es in der Gegenwart von 1 mM IBMX zu einer Akkumulation von cAMP, welches in der Abbildung zu 100 % gesetzt wurde. Nachdem gezeigt werden konnte, dass der temperaturbedingte Unterschied in der NA-induzierten cAMP-Akkumulation zwischen 20 und 60 min größer wurde, wurde im Rahmen dieser Arbeit angenommen, dass die cAMP-Produktion unabhängig von der Inkubationstemperatur reguliert wurde. Diese Annahme wurde durch den Versuchsaufbau gestützt, nachdem die Zellen bei der gleichen Temperatur stimuliert wurden und erst danach in die Inkubatoren bei verschiedenen Temperaturen gebracht wurden. Es konnte gezeigt werden, dass die PDE-Aktivität durch IBMX nicht vollständig gehemmt werden konnte. Bei einer Inkubationstemperatur von 38 °C wurden bereits 27 % des ursprünglich vorhandenen cAMPs durch eine Restaktivität der PDEs innerhalb einer Stunde abgebaut. Weitere 44 % des ursprünglichen cAMPs wurden über ABCC-Transporter in den EZR befördert, während also nur noch 29 % des ursprünglich produzierten cAMPs intrazellulär nach 60 min bestimmt werden konnten. Bei einer Inkubationstemperatur von 36 °C wurde kein ‚cAMP-Verlust‘ beobachtet und 52 % des anfangs vorhandenen cAMPs wurden über ABCC-Pumpen in den EZR befördert, weshalb nach 60 min noch 48 % intrazellulär gemessen werden konnten. Die Berechnung des rEC offenbarte einen signifikant höheren Efflux bei 38 °C im Vergleich zu 36 °C. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche und Literaturrecherchen eröffnen daher die Möglichkeit, dass der NA-induzierte intrazelluläre cAMP-Spiegel nach Stimulierung des β_2 -AR abhängig von der physiologischen Körpertemperatur durch eine konzertierte Aktion zwischen temperaturabhängiger PDEs und temperaturabhängigen Efflux reguliert wird.

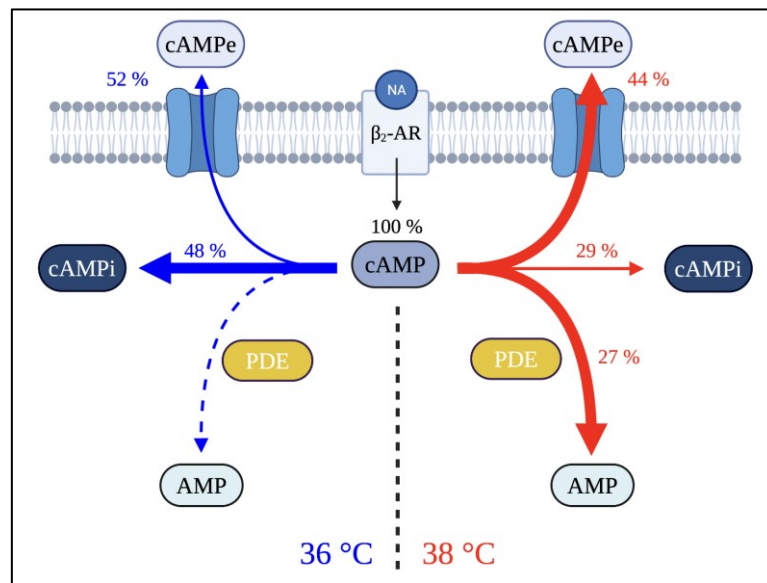


Abb. 62: Postuliertes Modell für den NA-induzierten cAMP-Haushalt in mHypoA-2/10-Zellen

Die Bindung von NA an den β_2 -AR mit nachfolgender Aktivierung membranständiger ACs führt zu einer temperaturunabhängigen Akkumulation von cAMP, die hier zu 100 % gesetzt wurde. Die Inkubation der Zellen für die Experimentdauer von 1 h bei 38 °C führte trotz IBMX (1 mM) zu einem PDE-bedingten Abbau von 27 % des ursprünglich eingesetzten cAMPs. Bei 36 °C hingegen fand kein cAMP-Abbau innerhalb von 60 min statt. Während der Inkubation wurde außerdem ein Teil des generierten cAMPs durch ABCC-Transporter in den EZR transportiert. Bei 36 °C wurden 52 %, bei 38 °C 44 % des ursprünglich produzierten cAMPs aus der Zelle befördert. Berücksichtigt man den intrazellulären cAMP-Spiegel bei der jeweiligen Temperatur, ergibt sich das Verhältnis aus extrazellulärem zu intrazellulärem cAMP (rEC). Dieses betrug 1,08 (36 °C) bzw. 1,52 (38 °C). Hier ist erkennbar, dass bei 38 °C im Verhältnis mehr cAMP aus der Zelle transportiert wurde.

Zuvor konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivierung des prepro-TRH-Promotors abhängig von der Inkubationstemperatur reguliert wurde. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass die NA-induzierte prepro-TRH-Aktivität in mHypoA-2/10-TRH-Zellen über den Basalwert hinaus bei 36 °C höher als bei 38 °C war. Aufbauend auf dem in Abb. 62 dargestellten postuliertem Mechanismus der Regulation des NA-induzierten intrazellulären cAMP-Spiegels, könnte die CREB-abhängige Aktivierung des prepro-TRH-Promotors nach Stimulierung mit NA das Ergebnis der temperaturabhängigen PDE-Aktivität und des temperaturabhängigen cAMP-Efflux darstellen. Die Freisetzung von NA an Thyreoliberin-positive Neurone des PVNs geschieht auf einen Kältestimulus hin, um ein Absinken der Körpertemperatur zu verhindern. Wie in Abb. 1 (S. 40) beschrieben, führt die nachfolgende Aktivierung von

β -AR über Aktivierung von CREB und Induktion des prepro-TRH-Promotors zu einer erhöhten TRH-Expression, was letztlich erhöhte T3- und T4-Plasmaspiegel bedingt. Durch T3 vermittelte Aktivierung des TR α -Rezeptors kommt es schließlich unter anderem zu einer Induktion von UCP1, was in einer Entkopplung der Atmungskette mit gesteigerter Wärmebildung resultiert. Nachdem es bei einer Verringerung der Temperatur zu einer erhöhten NA-induzierten prepro-TRH-Aktivierung in mHypoA-2/10-Zellen kam, kommt es hier möglicherweise zu einem synergistischen Effekt im Hinblick auf die fakultative Wärmeproduktion. Die Freisetzung von NA an PVN-Neurone bei Kälte einerseits und die erhöhte Maximalwirkung von NA bei verringerter Temperatur andererseits, könnten in Zusammenarbeit zu einer erhöhten TRH-Expression führen.

5.6 Diskussion der verwendeten Temperaturprogramme

Wie zuvor beschrieben, oszilliert die Körpertemperatur im Tagesverlauf. Zu Zeiten erhöhter Aktivität, wie sie bei Menschen üblicherweise tagsüber vorkommt, steigt die Temperatur und erreicht durchschnittlich etwa gegen 17:00 Uhr das Maximum. Im weiteren Tagesverlauf sinkt die Körpertemperatur, um in den frühen Morgenstunden, zwischen 02:00 und 04:00 Uhr, einen Tiefpunkt zu erreichen. An dieser Stelle soll betont werden, dass das für die Arbeit verwendete Zellsystem mHypoA-2/10 ein murines Zellsystem darstellt. Bei nachtaktiven Wesen sind erhöhte Temperaturen dementsprechend in der Nacht zu finden, während sie tagsüber auf ein Minimum absinken (Connolly and Lynch 1981). Im Durchschnitt bewegen sich die circadianen Temperaturoszillationen in Mäusen zwischen 35,5 und 38,5 °C (siehe Kapitel 1.1.1), weshalb diese Grenzen im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht überschritten wurden. Um diesem physiologischen Temperaturwechsel gerecht zu werden, wurde das CP entwickelt (siehe Kapitel 4.1.2). Im CP konnte somit am Zellmodell untersucht werden, ob die Simulierung eines vollständigen 24-h-Rhythmus zu einer veränderten Signalweiterleitung in der Zelle führt. Hierbei sollte beachtet werden, dass im Rahmen dieser Arbeit keine Aussage zu einer möglichen Synchronisierung von Clockgenen getroffen wurde. Zellen in Zellkultur können durch äußere Einflüsse wie Glukokortikoid- oder Serumbehandlung synchronisiert werden (Albrecht and Eichele 2003). Übernimmt in Lebewesen normalerweise der SCN, der selbst durch Lichtimpulse synchronisiert wird (Reppert and Weaver 2001), als zentraler Schrittmacher der inneren Uhr die

Synchronisation der peripheren Zellen, so können durch oben aufgeführte Methoden auch Zellen in der Zellkultur hinsichtlich ihrer zellulären Uhr synchronisiert werden. Hierbei wird die rhythmische Genexpression der Clock-Transkriptionsfaktoren wie BMAL1, PER und CRY in der Zellpopulation gleichgeschaltet. Besonders interessant in diesem Zusammenhang ist, dass auch simulierte Körpertemperaturrhythmen zu einer Synchronisation der inneren Uhr führen können (Brown, Zumbrunn et al. 2002, Glaser and Stanewsky 2005, Kidd, Young et al. 2015, Roessingh, Rosing et al. 2019). Allerdings waren entweder die verwendeten Amplituden der Temperaturrhythmen zu hoch, und damit außerhalb der physiologischen Körpertemperatur, oder es wurden mehrere Tage bis Wochen simuliert. Bislang konnte noch nicht gezeigt werden, dass die Simulierung eines einzigen 24-h-Rhythmus ausreichend war, um eine vollständige Synchronisierung der Clockgene zu provozieren. Es ist dennoch nicht mit Sicherheit auszuschließen, dass die Simulierung eines 24-h-Temperaturverlaufs für eine teilweise Synchronisation der Clockgene ausreichend war.

Um darüber hinaus den direkten Einfluss von Temperatur auf zelluläre Prozesse zu studieren, wurde noch das AP entwickelt (siehe Kapitel 4.1.1). Hierfür wurden die zu untersuchenden Zellen lediglich einer Temperaturänderung unterzogen, ohne dass zuvor bereits eine solche erfolgt war. Durch das AP konnte daher untersucht werden, ob durch einen Temperaturunterschied von lediglich 2 °C direkt temperaturabhängige Prozesse in der Zelle angestoßen werden können. Der Vergleich beider Temperaturprogramme sollte beleuchten, ob über die direkten Temperaturwirkungen hinaus, bereits zuvor abgeschlossene Temperaturänderungen eine verzögerte Wirkung haben und damit die circadianen Temperaturosillation zu relevanten zellulären Unterschieden führen. Um diese Frage mit der größtmöglichen Sorgfalt zu beantworten, wurde penibel darauf geachtet, dass die Bedingungen zwischen den Programmen so einheitlich wie möglich waren. So erfolgte der Wechsel auf serumfreies Medium und die Inkubation in den Temperaturschränken zur gleichen Zeit und für die gleiche Dauer. Die Anzahl ausgesäter Zellen und der Ablauf des Experiments war identisch. Einzig der erste Temperaturstimulus im CP entschied folglich über den Unterschied zwischen den beiden Programmen. Während im CP diese Temperaturänderung stattfand, verblieben die Zellen im AP konstant bei 37 °C. Die zweite Temperaturänderung erfolgte in beiden Programmen wieder zur gleichen Zeit. Ließen sich nun Unterschiede zwischen den Programmen hinsichtlich der untersuchten Messgröße feststellen, konnte dies daher mit

hoher Sicherheit dem im CP zuvor geschehenen, ersten Temperaturwechsel zugeordnet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die CREB-, STAT-, FOXO- und BMAL1-abhängige Luciferaseaktivität, die mit einer Aktivierung des jeweiligen Transkriptionsfaktors korreliert, im AP und CP untersucht. Interessanterweise konnte hier bei der Inkubation der Zellen eine Invertierung des Temperatureffekts bis zu 2 h (CRE) bzw. sogar 4 h (FOXO) nach dem zweiten Temperaturwechsel festgestellt werden. War im AP stets bei der geringeren Temperatur eine erhöhte Reporteraktivität messbar, konnte im CP eine erhöhte Reporteraktivität bei 38 °C gemessen werden (siehe Abb. 15). Dies war zumindest für die CRE-Aktivität wahrscheinlich kinetischer Natur, da die vorangegangene Temperaturänderung zu einer erhöhten Luciferaseakkumulation führte, die nach 2 h bei 38 °C noch teilweise gemessen werden konnte. In mHypoA-2/10-FOXO-Zellen hingegen war eine Inkubation im AP nicht ausreichend, um eine temperaturabhängige FOXO-Induktion nachweisen zu können. Erst die Inkubation im CP offenbarte eine signifikant verschiedene Aktivierung des Reporters bei 36 und 38 °C. Es wäre denkbar, dass der erste Temperaturstimulus die Initiierung einer Genexpression bedingte, die erst nach einigen Stunden zu einer Wirkung führte. Möglicherweise wurde die PKB-Expression temperaturabhängig induziert, was bei funktioneller Expressierung schließlich zu einer verzögerten Verringerung der FOXO-Aktivität während des zweiten Temperaturstimulus führte. Es wäre daher interessant in zukünftigen Experimenten die Expression von Genen, die an der Aktivierung von FOXO beteiligt sind, in Abhängigkeit von der Temperatur zu erforschen.

Die Untersuchung der Dosis-Wirkungs-Beziehung der NA-induzierten cAMP-Akkumulation in mHypoA-2/10-Zellen offenbarte einen erhöhten E_{\max} sowohl im CP als auch im AP. Es war allerdings erkennbar, dass der E_{\max} im CP signifikant höher war als im AP. Darüber hinaus konnte auch gezeigt werden, dass der Hill-Koeffizient interessanterweise zwischen den Programmen signifikante Abweichungen aufzeigte. Der Hill-Koeffizient stellt ein Mittel dar, um Kooperativität einer Bindung zu beschreiben und korreliert mit der Steilheit einer Dosis-Wirkungs-Kurve. Als erstes wurde die Kooperativität bei der Bindung von Sauerstoff an Hämoglobin gezeigt (Hill 1910). Dort führte die Bindung eines Sauerstoffatoms zu einer erleichterten Bindung eines weiteren Sauerstoffatoms. An mesenterischen Zellen der Ratte konnte eine Kooperativität

zwischen α_1 -AR und AdR-A1 gezeigt werden (Jackson, Cheng et al. 2020). Hier führte die Stimulierung mit NA zu einem Hill-Koeffizienten von etwa 1,8 der Dosis-Wirkungs-Beziehung (vgl. Inkubation im CP, Abb. 51). Es wäre interessant näher zu untersuchen, ob durch Simulierung eines circadianen Temperaturrehythmus, auch in mHypoA-2/10-Zellen andere Rezeptoren neben dem β_2 -AR an der NA-vermittelten cAMP-Akkumulation beteiligt sind. Möglicherweise führt die circadiane Temperaturänderung zu einer veränderten Interaktion zwischen β_2 - und β_3 -AR, was zu diesem Zeitpunkt allerdings rein spekulativer Natur ist und in zukünftigen Experimenten weiter untersucht werden sollte.

5.7 Spezifität der Befunde

Die Stimulierung von mHypoA-2/10-Zellen mit NA, Sal, BK oder FSK führte zu einer deutlichen CRE-Aktivierung. Während für NA, Sal und FSK diese bei 36 °C signifikant gegenüber der bei 38 °C erhöht war, konnte für die BK-induzierte CRE-Aktivierung keine Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur gezeigt werden. Unpublizierte Versuche innerhalb der Arbeitsgruppe demonstrierten, dass die BK-induzierte CRE-Aktivierung durch die Aktivierung von PKC vermittelt wurde (Breit et al.). Zusätzlich konnte auch gezeigt werden, dass die Inkubation von BK nicht zu einer cAMP-Akkumulation führte, was für eine BK-vermittelte CRE-Induktion durch Aktivierung von $G_{q/11}$ - und nicht G_s -Proteinen spricht (Breit et al., nicht publiziert).

Daher wäre es denkbar, dass es G_s - oder β_2 -AR-vermittelt zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration kommt, die durch temperaturabhängigen Efflux und PDE-Aktivität zu bei 36 und 38 °C verschiedenen cAMP-Spiegeln führt, welche schließlich zu einer erhöhten Aktivität des CRE-Reporters bei 36 °C führen. Die FSK-induzierte cAMP-Akkumulation war deutlich geringer abhängig von der Inkubationstemperatur. Nachdem gezeigt werden konnte, dass zwischen 30 und 60 min Stimulation der für NA beschriebene ‚cAMP-Verlust‘ hier kaum auftrat, ist es denkbar, dass darin eine mögliche Erklärung zu finden ist. Eventuell ist der cAMP-Efflux spezifisch für β_2 -AR- oder G_s -induziertes cAMP und könnte damit die signifikant reduzierte Temperaturabhängigkeit der FSK-induzierten cAMP-Akkumulation und CRE-Aktivität, im Vergleich zu der durch NA- oder Sal-induzierten, erklären.

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Befunde wurden in mHypoA-2/10-Zellen, einem Zellmodell mit hoher Ähnlichkeit für Thyreoliberin-positive Neurone des PVN, erhoben. Um zu überprüfen, ob die zuvor gezeigten Ergebnisse auf andere Zellen übertragbar sind, wurde zunächst die cAMP-Akkumulation diverser Zelllinien nach Stimulierung mit NA, Sal und FSK untersucht. Konnte eine signifikante Induktion von cAMP nachgewiesen werden, wurde in diesen Zelllinien darüber hinaus noch die NA-, Sal- und FSK-induzierte cAMP-Akkumulation in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur untersucht. Während in HEK-293- β_2 -AR-Zellen keine temperaturabhängige cAMP-Akkumulation nachweisbar war, konnte diese in allen weiteren getesteten Zellsystemen in unterschiedlicher Ausprägung gezeigt werden. In mHypoA-2/12-Zellen war die Temperaturabhängigkeit vergleichbar mit der in mHypoA-2/10-Zellen gezeigten. H1299-Zellen reagierten auf alle drei getesteten Agonisten mit einer ähnlichen temperaturabhängigen cAMP-Akkumulation, während HBSMC nur eine moderat temperaturabhängige FSK-induzierte cAMP-Antwort zeigten (siehe Abb. 61). Diese Daten legen nahe, dass nicht alle Zellen und Stimuli in der gleichen Art und Weise zu einer Modulation des intrazellulären cAMP-Spiegels führten, sondern dass spezifische Signalwege in Abhängigkeit von der Temperatur reguliert wurden. Nachdem im Rahmen dieser Arbeit die Temperaturabhängigkeit des intrazellulären cAMP-Spiegels auf eine gemeinsame Aktion von ABCC-Pumpen und PDEs zurückgeführt werden konnte, ist es möglich, dass die Expression dieser Proteine oder die Kombination spezifischer Subtypen für die temperaturvermittelten Effekte erforderlich ist.

5.8 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden temperaturabhängige Signalwege in einem hypothalamischen Zellmodell identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass die CREB-, STAT- und prepro-TRH-Promotoraktivierung abhängig von Temperaturänderungen, wie sie physiologisch auftreten, waren. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die NA-, Sal-, FSK-, aber nicht die BK-induzierte CREB-Aktivität, sowie die NA-, Sal- und FSK-induzierte cAMP-Akkumulation bei 36 °C erhöht und bei 38 °C verringert war. Als Erklärung für die Temperaturabhängigkeit wurde eine Regulation des cAMP-Spiegels durch ABCC-Pumpen und PDEs in Abhängigkeit von der physiologischen Körpertemperatur angeboten. Schließlich konnte gezeigt werden, dass einerseits Temperaturänderungen direkt, andererseits teilweise circadiane Temperaturänderungen an den erwähnten Befunden beteiligt waren. Diese Arbeit bietet damit eine Grundlage für die weitere Erforschung von Signalwegen in Abhängigkeit von der Körpertemperatur. Es wäre sehr interessant, die Befunde in einem geeigneten Mausmodell zu überprüfen. Da naturgemäß eine Änderung der Körpertemperatur in einem lebenden Organismus nicht sinnvoll zu bewerkstelligen ist, sollte das Augenmerk daher auf eine tageszeitabhängige Aktivierbarkeit von Rezeptoren gelegt werden. Es wäre aufschlussreich, die klassische Rezeptorpharmakologie in Abhängigkeit des Tagesverlaufs zu studieren, was im Sinne einer Chronotherapie auch von klinischem Interesse sein könnte.

Literaturverzeichnis

- Abraham, U., J. K. Schlichting, A. Kramer and H. Herzel (2018). "Quantitative analysis of circadian single cell oscillations in response to temperature." PLoS One **13**(1): e0190004.
- Agarwal, S. R., P. C. Yang, M. Rice, C. A. Singer, V. O. Nikolaev, M. J. Lohse, C. E. Clancy and R. D. Harvey (2014). "Role of membrane microdomains in compartmentation of cAMP signaling." PLoS One **9**(4): e95835.
- Ahmad, F., E. Degerman and V. C. Manganiello (2012). "Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3 signaling complexes." Horm Metab Res **44**(10): 776-785.
- Ahmad, R. and J. E. Dalziel (2020). "G Protein-Coupled Receptors in Taste Physiology and Pharmacology." Front Pharmacol **11**: 587664.
- Albrecht, U. and G. Eichele (2003). "The mammalian circadian clock." Current opinion in genetics & development **13**(3): 271-277.
- Alexandrov, V. Y. (1969). "Conformational flexibility of proteins, their resistance to proteinases and temperature conditions of life." Biosystems **3**(1): 9-19.
- Alvarez-Salas, E., F. Gama, G. Matamoros-Trejo, M. I. Amaya and P. de Gortari (2020). "TRH in the nucleus accumbens acts downstream to α -MSH to decrease food intake in rats." Neurosci Lett **739**: 135403.
- Annunziato, L., G. D. Renzo, G. Lombardi, F. Scopacasa, G. Schettini, P. Preziosi and U. Scapagnini (1977). "The Role of Central Noradrenergic Neurons in the Control of Thyrotropin Secretion in the Rat." Endocrinology **100**(3): 738-744.
- Antunes, G. and F. M. Simoes de Souza (2016). "Olfactory receptor signaling." Methods Cell Biol **132**: 127-145.
- Arcus, V. L. and A. J. Mulholland (2020). "Temperature, Dynamics, and Enzyme-Catalyzed Reaction Rates." Annu Rev Biophys **49**: 163-180.
- Arcus, V. L., E. J. Prentice, J. K. Hobbs, A. J. Mulholland, M. W. Van der Kamp, C. R. Pudney, E. J. Parker and L. A. Schipper (2016). "On the Temperature Dependence of Enzyme-Catalyzed Rates." Biochemistry **55**(12): 1681-1688.
- Arcus, V. L., E. J. Prentice, J. K. Hobbs, A. J. Mulholland, M. W. Van der Kamp, C. R. Pudney, E. J. Parker and L. A. Schipper (2016). "On the Temperature Dependence of Enzyme-Catalyzed Rates." Biochemistry **55**(12): 1681-1688.
- Arora, M. (2013). "Cell Culture Media: A Review." Materials and Methods **3**.
- Arsenault, J., M. P. Renaud, M. Clément, D. Fillion, G. Guillemette, R. Leduc, P. Lavigne and E. Escher (2007). "Temperature-dependent variations of ligand-receptor contact points in hAT(1)." J Pept Sci **13**(9): 575-580.
- Asahara, H., B. Santoso, E. Guzman, K. Du, P. A. Cole, I. Davidson and M. Montminy (2001). "Chromatin-dependent cooperativity between constitutive and inducible activation domains in CREB." Molecular and cellular biology **21**(23): 7892-7900.
- Aschoff, J. and R. Wever (1958). "Kern und Schale im Wärmehaushalt des Menschen." Die Naturwissenschaften **45**(20): 477-485.

- Baillie, G. S. (2009). "Compartmentalized signalling: spatial regulation of cAMP by the action of compartmentalized phosphodiesterases." *Febs j* **276**(7): 1790-1799.
- Baker, J. G. (2005). "The selectivity of beta-adrenoceptor antagonists at the human beta1, beta2 and beta3 adrenoceptors." *Br J Pharmacol* **144**(3): 317-322.
- Baldini, G. and K. D. Phelan (2019). "The melanocortin pathway and control of appetite-progress and therapeutic implications." *J Endocrinol* **241**(1): R1-r33.
- Balkan, W., M. A. Tavianini, P. J. Gkonos and B. A. Roos (1998). "Expression of Rat Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) Gene in TRH-Producing Tissues of Transgenic Mice Requires Sequences Located in Exon 1*." *Endocrinology* **139**(1): 252-259.
- Banerjee, S., A. Biehl, M. Gadina, S. Hasni and D. M. Schwartz (2017). "JAK-STAT Signaling as a Target for Inflammatory and Autoimmune Diseases: Current and Future Prospects." *Drugs* **77**(5): 521-546.
- Bannister, A. J. and T. Kouzarides (1996). "The CBP co-activator is a histone acetyltransferase." *Nature* **384**(6610): 641-643.
- Bartfai, T. and B. Conti (2010). "Fever." *ScientificWorldJournal* **10**: 490-503.
- Basso, A., G. Del Bello, F. Piacenza, R. Giacconi, L. Costarelli and M. Malavolta (2016). "Circadian rhythms of body temperature and locomotor activity in aging BALB/c mice: early and late life span predictors." *Biogerontology* **17**(4): 703-714.
- Baubet, V., H. Le Mouellic, A. K. Campbell, E. Lucas-Meunier, P. Fossier and P. Brûlet (2000). "Chimeric green fluorescent protein-aequorin as bioluminescent Ca²⁺ reporters at the single-cell level." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**(13): 7260-7265.
- Bauer, K. (1988). "Degradation and biological inactivation of thyrotropin releasing hormone (TRH): regulation of the membrane-bound TRH-degrading enzyme from rat anterior pituitary by estrogens and thyroid hormones." *Biochimie* **70**(1): 69-74.
- Beavo, J. A. and L. L. Brunton (2002). "Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(9): 710-718.
- Begemann, K., A. M. Neumann and H. Oster (2020). "Regulation and function of extra-SCN circadian oscillators in the brain." *Acta Physiol (Oxf)* **229**(1): e13446.
- Belkacemi, L. and N. A. Darmani (2020). "Dopamine receptors in emesis: molecular mechanisms and potential therapeutic function." *Pharmacological Research*: 105124.
- Belsham, D. D., L. J. Fick, P. S. Dalvi, M.-L. Centeno, J. A. Chalmers, P. K. P. Lee, Y. Wang, D. J. Drucker and M. M. Koletar (2009). "Ciliary neurotrophic factor recruitment of glucagon-like peptide-1 mediates neurogenesis, allowing immortalization of adult murine hypothalamic neurons." *The FASEB Journal* **23**(12): 4256-4265.
- Bender, A. T. and J. A. Beavo (2006). "Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use." *Pharmacol Rev* **58**(3): 488-520.
- Berdeaux, R., N. Goebel, L. Banaszynski, H. Takemori, T. Wandless, G. D. Shelton and M. Montminy (2007). "SIK1 is a class II HDAC kinase that promotes survival of skeletal myocytes." *Nat Med* **13**(5): 597-603.
- Berridge, M. J. (2006). "Calcium microdomains: organization and function." *Cell Calcium* **40**(5-6): 405-412.

- Bhadra, U., N. Thakkar, P. Das and M. Pal Bhadra (2017). "Evolution of circadian rhythms: from bacteria to human." Sleep Med **35**: 49-61.
- Bhogal, N. K., A. Hasan and J. Gorelik (2018). "The Development of Compartmentation of cAMP Signaling in Cardiomyocytes: The Role of T-Tubules and Caveolae Microdomains." J Cardiovasc Dev Dis **5**(2).
- Bidlack, J. M. and A. L. Parkhill (2004). "Assay of G protein-coupled receptor activation of G proteins in native cell membranes using [35S]GTP gamma S binding." Methods Mol Biol **237**: 135-143.
- Bischof, J. C. (2005). "Thermal Stability of Proteins." Annals of the New York Academy of Sciences **1066**(1): 12-33.
- Bischof, J. C. and X. He (2005). "Thermal stability of proteins." Ann N Y Acad Sci **1066**: 12-33.
- Black, N., A. D'Souza, Y. Wang, H. Piggins, H. Dobrzynski, G. Morris and M. R. Boyett (2019). "Circadian rhythm of cardiac electrophysiology, arrhythmogenesis, and the underlying mechanisms." Heart Rhythm **16**(2): 298-307.
- Blair, C. M. and G. S. Baillie (2019). "Reshaping cAMP nanodomains through targeted disruption of compartmentalised phosphodiesterase signalosomes." Biochemical Society Transactions **47**(5): 1405-1414.
- Blondin, D. P. and F. Haman (2018). "Shivering and nonshivering thermogenesis in skeletal muscles." Handb Clin Neurol **156**: 153-173.
- Bonni, A., D. D. Ginty, H. Dudek and M. E. Greenberg (1995). "Serine 133-phosphorylated CREB induces transcription via a cooperative mechanism that may confer specificity to neurotrophin signals." Molecular and Cellular Neuroscience **6**(2): 168-183.
- Bonni, A., D. D. Ginty, H. Dudek and M. E. Greenberg (1995). "Serine 133-phosphorylated CREB induces transcription via a cooperative mechanism that may confer specificity to neurotrophin signals." Mol Cell Neurosci **6**(2): 168-183.
- Boundy, V. A. and A. H. Cincotta (2000). "Hypothalamic adrenergic receptor changes in the metabolic syndrome of genetically obese (ob/ob) mice." American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology **279**(2): R505-R514.
- Boyles, J. G. (2019). "A Brief Introduction to Methods for Describing Body Temperature in Endotherms." Physiol Biochem Zool **92**(4): 365-372.
- Breen, D. P., R. Vuono, U. Nawarathna, K. Fisher, J. M. Shneerson, A. B. Reddy and R. A. Barker (2014). "Sleep and circadian rhythm regulation in early Parkinson disease." JAMA Neurol **71**(5): 589-595.
- Breit, A., V. Besik, H. J. Solinski, S. Muehlich, E. Glas, S. J. Yarwood and T. Gudermann (2015). "Serine-727 Phosphorylation Activates Hypothalamic STAT-3 Independently From Tyrosine-705 Phosphorylation." Molecular Endocrinology **29**(3): 445-459.
- Breit, A., M. Lagacé and M. Bouvier (2004). "Hetero-oligomerization between beta2- and beta3-adrenergic receptors generates a beta-adrenergic signaling unit with distinct functional properties." J Biol Chem **279**(27): 28756-28765.
- Breit, A., L. Miek, J. Schredelseker, M. Geibel, M. Merrow and T. Gudermann (2018). "Insulin-like growth factor-1 acts as a zeitgeber on hypothalamic circadian clock gene

expression via glycogen synthase kinase-3 β signaling." Journal of Biological Chemistry **293**(44): 17278-17290.

Brown, S. A., F. Fleury-Olela, E. Nagoshi, C. Hauser, C. Juge, C. A. Meier, R. Chicheportiche, J. M. Dayer, U. Albrecht and U. Schibler (2005). "The period length of fibroblast circadian gene expression varies widely among human individuals." PLoS Biol **3**(10): e338.

Brown, S. A., G. Zumbrunn, F. Fleury-Olela, N. Preitner and U. Schibler (2002). "Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks." Curr Biol **12**(18): 1574-1583.

Brown, S. A., G. Zumbrunn, F. Fleury-Olela, N. Preitner and U. Schibler (2002). "Rhythms of Mammalian Body Temperature Can Sustain Peripheral Circadian Clocks." Current Biology **12**(18): 1574-1583.

Bruce, V. G. (1960). "Environmental Entrainment of Circadian Rhythms." Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology **25**: 29-48.

Brunelle, J. L. and R. Green (2014). "One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE)." Methods Enzymol **541**: 151-159.

Buck, L. and R. Axel (1991). "A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition." Cell **65**(1): 175-187.

Buhr, E. D., S.-H. Yoo and J. S. Takahashi (2010). "Temperature as a Universal Resetting Cue for Mammalian Circadian Oscillators." Science **330**(6002): 379-385.

Buijs, R. M., C. G. van Eden, V. D. Goncharuk and A. Kalsbeek (2003). "The biological clock tunes the organs of the body: timing by hormones and the autonomic nervous system." J Endocrinol **177**(1): 17-26.

Buijs, R. M., J. Wortel, J. J. Van Heerikhuize, M. G. Feenstra, G. J. Ter Horst, H. J. Romijn and A. Kalsbeek (1999). "Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway." Eur J Neurosci **11**(5): 1535-1544.

Burgoon, P. W. and J. A. Boulant (1998). "Synaptic inhibition: its role in suprachiasmatic nucleus neuronal thermosensitivity and temperature compensation in the rat." J Physiol **512** (Pt 3)(Pt 3): 793-807.

Burgoon, P. W. and J. A. Boulant (2001). "Temperature-sensitive properties of rat suprachiasmatic nucleus neurons." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **281**(3): R706-715.

Cabral, A., S. Valdivia, M. Reynaldo, N. E. Cyr, E. A. Nillni and M. Perello (2012). "Short-term cold exposure activates TRH neurons exclusively in the hypothalamic paraventricular nucleus and raphe pallidus." Neurosci Lett **518**(2): 86-91.

Calebiro, D. and I. Maiellaro (2014). "cAMP signaling microdomains and their observation by optical methods." Front Cell Neurosci **8**: 350.

Cannon, B. and J. Nedergaard (2010). "Metabolic consequences of the presence or absence of the thermogenic capacity of brown adipose tissue in mice (and probably in humans)." International Journal of Obesity **34**(1): S7-S16.

Cardinaux, J. R., J. C. Notis, Q. Zhang, N. Vo, J. C. Craig, D. M. Fass, R. G. Brennan and R. H. Goodman (2000). "Recruitment of CREB binding protein is sufficient for CREB-mediated gene activation." Molecular and cellular biology **20**(5): 1546-1552.

Castellani, J. W. and A. J. Young (2016). "Human physiological responses to cold exposure: Acute responses and acclimatization to prolonged exposure." Auton Neurosci **196**: 63-74.

Castellucci, V. F., E. R. Kandel, J. H. Schwartz, F. D. Wilson, A. C. Nairn and P. Greengard (1980). "Intracellular injection of the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase simulates facilitation of transmitter release underlying behavioral sensitization in Aplysia." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(12): 7492-7496.

Castillo, K., I. Diaz-Franulic, J. Canan, F. Gonzalez-Nilo and R. Latorre (2018). "Thermally activated TRP channels: molecular sensors for temperature detection." Physical Biology **15**(2): 021001.

Caterina, M. J., T. A. Rosen, M. Tominaga, A. J. Brake and D. Julius (1999). "A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat." Nature **398**(6726): 436-441.

Caterina, M. J., M. A. Schumacher, M. Tominaga, T. A. Rosen, J. D. Levine and D. Julius (1997). "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway." Nature **389**(6653): 816-824.

Chao, Y.-C., C.-C. Chen, Y.-C. Lin, H. Breer, J. Fleischer and R.-B. Yang (2015). "Receptor guanylyl cyclase-G is a novel thermosensory protein activated by cool temperatures." The EMBO Journal **34**(3): 294-306.

Chao, Y. C., J. Fleischer and R. B. Yang (2018). "Guanylyl cyclase-G is an alarm pheromone receptor in mice." Embo j **37**(1): 39-49.

Chaudhri, O., C. Small and S. Bloom (2006). "Gastrointestinal hormones regulating appetite." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **361**(1471): 1187-1209.

Cheepala, S., J.-S. Hulot, J. A. Morgan, Y. Sassi, W. Zhang, A. P. Naren and J. D. Schuetz (2013). "Cyclic Nucleotide Compartmentalization: Contributions of Phosphodiesterases and ATP-Binding Cassette Transporters." Annual Review of Pharmacology and Toxicology **53**(1): 231-253.

Chen-Goodspeed, M., A. N. Lukan and C. W. Dessauer (2005). "Modeling of Galpha(s) and Galpha(i) regulation of human type V and VI adenylyl cyclase." J Biol Chem **280**(3): 1808-1816.

Chen, G.-L., B. Zeng, S. Eastmond, S. E. Elsenussi, A. N. Boa and S.-Z. Xu (2012). "Pharmacological comparison of novel synthetic fenamate analogues with econazole and 2-APB on the inhibition of TRPM2 channels." British Journal of Pharmacology **167**(6): 1232-1243.

Chen, G. L., B. Zeng, S. Eastmond, S. E. Elsenussi, A. N. Boa and S. Z. Xu (2012). "Pharmacological comparison of novel synthetic fenamate analogues with econazole and 2-APB on the inhibition of TRPM2 channels." Br J Pharmacol **167**(6): 1232-1243.

Chen, W. (2019). "Thermometry and interpretation of body temperature." Biomed Eng Lett **9**(1): 3-17.

- Chen, Z. S., K. Lee and G. D. Kruh (2001). "Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17-beta-D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. Resistance to 6-mercaptopurine and 6-thioguanine." J Biol Chem **276**(36): 33747-33754.
- Cheung, W. Y. (1967). "Properties of Cyclic 3',5'-Nucleotide Phosphodiesterase from Rat Brain*." Biochemistry **6**(4): 1079-1087.
- Chi, M. L. and M. T. Lin (1983). "Involvement of adrenergic receptor mechanisms within hypothalamus in the fever induced by amphetamine and thyrotropin-releasing hormone in the rat." Journal of Neural Transmission **58**(3): 213-222.
- Chiamolera, M. I. and F. E. Wondisford (2009). "Thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism." Endocrinology **150**(3): 1091-1096.
- Chidakel, A., D. Mentuccia and F. S. Celi (2005). "Peripheral metabolism of thyroid hormone and glucose homeostasis." Thyroid **15**(8): 899-903.
- Choi, E. J., Z. Xia and D. R. Storm (1992). "Stimulation of the type III olfactory adenylyl cyclase by calcium and calmodulin." Biochemistry **31**(28): 6492-6498.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Analytical Biochemistry **162**(1): 156-159.
- Chouchani, E. T., L. Kazak and B. M. Spiegelman (2019). "New Advances in Adaptive Thermogenesis: UCP1 and Beyond." Cell Metab **29**(1): 27-37.
- Christoffolete, M. A., C. C. Linardi, L. de Jesus, K. N. Ebina, S. D. Carvalho, M. O. Ribeiro, R. Rabelo, C. Curcio, L. Martins, E. T. Kimura and A. C. Bianco (2004). "Mice with targeted disruption of the Dio2 gene have cold-induced overexpression of the uncoupling protein 1 gene but fail to increase brown adipose tissue lipogenesis and adaptive thermogenesis." Diabetes **53**(3): 577-584.
- Chu, P., S. Murray, D. Lissin and M. von Zastrow (1997). "Delta and kappa opioid receptors are differentially regulated by dynamin-dependent endocytosis when activated by the same alkaloid agonist." J Biol Chem **272**(43): 27124-27130.
- Clapham, D. E. (2003). "TRP channels as cellular sensors." Nature **426**(6966): 517-524.
- Clarke, I. J. (2015). "Hypothalamus as an endocrine organ." Compr Physiol **5**(1): 217-253.
- Colquhoun, W. P. and R. S. Edwards (1970). "Circadian rhythms of body temperature in shift-workers at a coalface." British journal of industrial medicine **27**(3): 266-272.
- Colton, C. K. and M. X. Zhu 2-Aminoethoxydiphenyl Borate as a Common Activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3 Channels. Transient Receptor Potential (TRP) Channels, Springer Berlin Heidelberg: 173-187.
- Conn, C. A., B. Franklin, R. Freter and M. J. Kluger (1991). "Role of gram-negative and gram-positive gastrointestinal flora in temperature regulation of mice." Am J Physiol **261**(6 Pt 2): R1358-1363.
- Connolly, M. S. and C. B. Lynch (1981). "Circadian variation of strain differences in body temperature and activity in mice." Physiology & Behavior **27**(6): 1045-1049.
- Conti, M., D. Mika and W. Richter (2014). "Cyclic AMP compartments and signaling specificity: role of cyclic nucleotide phosphodiesterases." J Gen Physiol **143**(1): 29-38.

- Cooper, D. M. F. (2003). "Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP." Biochemical Journal **375**(3): 517-529.
- Corbin, J. D. and E. G. Krebs (1969). "A cyclic AMP--stimulated protein kinase in adipose tissue." Biochem Biophys Res Commun **36**(2): 328-336.
- Cote-Vélez, A., L. Pérez-Martínez, M. Y. Díaz-Gallardo, C. Pérez-Monter, A. Carreón-Rodríguez, J. L. Charli and P. Joseph-Bravo (2005). "Dexamethasone represses cAMP rapid upregulation of TRH gene transcription: identification of a composite glucocorticoid response element and a cAMP response element in TRH promoter." J Mol Endocrinol **34**(1): 177-197.
- Counis, R. and M. Jutisz (1977). "Temperature dependence of adenylate cyclase activity from rat white adipocytes." Molecular and Cellular Endocrinology **7**(4): 313-324.
- Covarrubias, L., R. M. Uribe, M. Méndez, J. L. Charli and P. Joseph-Bravo (1988). "Neuronal TRH synthesis: developmental and circadian TRH mRNA levels." Biochem Biophys Res Commun **151**(1): 615-622.
- Cowley, M. A., J. L. Smart, M. Rubinstein, M. G. Cerdán, S. Diano, T. L. Horvath, R. D. Cone and M. J. Low (2001). "Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus." Nature **411**(6836): 480-484.
- Cox, K. H. and J. S. Takahashi (2019). "Circadian clock genes and the transcriptional architecture of the clock mechanism." J Mol Endocrinol **63**(4): R93-r102.
- Cui, X., S. J. Lee, S. Z. Kim, S. H. Kim and K. W. Cho (2000). "Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide27 on cyclic AMP efflux and atrial dynamics in perfused beating atria." Eur J Pharmacol **402**(1-2): 129-137.
- Cyr, N. E., A. M. Toorie, J. S. Steger, M. M. Sochat, S. Hyner, M. Perello, R. Stuart and E. A. Nillni (2013). "Mechanisms by which the orexigen NPY regulates anorexigenic α -MSH and TRH." Am J Physiol Endocrinol Metab **304**(6): E640-650.
- Dakappa, P. H. and C. Mahabala (2015). "Analysis of Long-Term Temperature Variations in the Human Body." Crit Rev Biomed Eng **43**(5-6): 385-399.
- Dalesio, N. M., S. F. Barreto Ortiz, J. L. Pluznick and D. E. Berkowitz (2018). "Olfactory, Taste, and Photo Sensory Receptors in Non-sensory Organs: It Just Makes Sense." Front Physiol **9**: 1673.
- Dalvi, P. S. and D. D. Belsham (2012). "Glucagon-like peptide-2 directly regulates hypothalamic neurons expressing neuropeptides linked to appetite control in vivo and in vitro." Endocrinology **153**(5): 2385-2397.
- Dalvi, P. S., F. D. Erbicéanu, D. M. Irwin and D. D. Belsham (2012). "Direct regulation of the proglucagon gene by insulin, leptin, and cAMP in embryonic versus adult hypothalamic neurons." Mol Endocrinol **26**(8): 1339-1355.
- de Groot, D. J. A., M. van der Deen, T. K. P. Le, A. Regeling, S. de Jong and E. G. E. de Vries (2007). "Indomethacin induces apoptosis via a MRP1-dependent mechanism in doxorubicin-resistant small-cell lung cancer cells overexpressing MRP1." British Journal of Cancer **97**(8): 1077-1083.
- de Koning, H. P., B. G. Jenks, B. Huchedé and E. W. Roubos (1992). "Dynamics of cyclic-AMP efflux in relation to α -MSH secretion from melanotrope cells of *Xenopus laevis*." Life Sciences **51**(21): 1667-1673.

- De Lean, A., J. M. Stadel and R. J. Lefkowitz (1980). "A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylyl cyclase-coupled beta-adrenergic receptor." J Biol Chem **255**(15): 7108-7117.
- de Mendoza, D. (2014). "Temperature sensing by membranes." Annu Rev Microbiol **68**: 101-116.
- de Sousa Abreu, R., L. O. Penalva, E. M. Marcotte and C. Vogel (2009). "Global signatures of protein and mRNA expression levels." Mol Biosyst **5**(12): 1512-1526.
- Deason-Towne, F., A. L. Perraud and C. Schmitz (2012). "Identification of Ser/Thr phosphorylation sites in the C2-domain of phospholipase C γ 2 (PLC γ 2) using TRPM7-kinase." Cell Signal **24**(11): 2070-2075.
- Deshpande, D. A. and R. B. Penn (2006). "Targeting G protein-coupled receptor signaling in asthma." Cellular signalling **18**(12): 2105-2120.
- Dessauer, C. W., M. Chen-Goodspeed and J. Chen (2002). "Mechanism of G α i-mediated inhibition of type V adenylyl cyclase." J Biol Chem **277**(32): 28823-28829.
- Dessauer, C. W., J. J. Tesmer, S. R. Sprang and A. G. Gilman (1998). "Identification of a G α binding site on type V adenylyl cyclase." J Biol Chem **273**(40): 25831-25839.
- DeWire, S. M., J. Kim, E. J. Whalen, S. Ahn, M. Chen and R. J. Lefkowitz (2008). "Beta-arrestin-mediated signaling regulates protein synthesis." The Journal of biological chemistry **283**(16): 10611-10620.
- Dhillon, S. S. and D. D. Belsham (2011). "Estrogen inhibits NPY secretion through membrane-associated estrogen receptor (ER)- α in clonal, immortalized hypothalamic neurons." Int J Obes (Lond) **35**(2): 198-207.
- Dhillon, S. S., S. Gingerich, C. Virtanen and D. D. Belsham (2012). "Gene array analysis of embryonic- versus adult-derived hypothalamic NPY-expressing cell lines." Mol Cell Endocrinol **358**(1): 116-126.
- Dhillon, S. S., S. A. McFadden, J. A. Chalmers, M. L. Centeno, G. L. Kim and D. D. Belsham (2011). "Cellular leptin resistance impairs the leptin-mediated suppression of neuropeptide Y secretion in hypothalamic neurons." Endocrinology **152**(11): 4138-4147.
- Diel, S., K. Klass, B. Wittig and C. Kleuss (2006). "Gbetagamma activation site in adenylyl cyclase type II. Adenylyl cyclase type III is inhibited by Gbetagamma." J Biol Chem **281**(1): 288-294.
- Dill, K. A. (1990). "Dominant forces in protein folding." Biochemistry **29**(31): 7133-7155.
- Docherty, J. R. (2010). "Subtypes of functional α 1-adrenoceptor." Cellular and Molecular Life Sciences **67**(3): 405-417.
- Dong, X. and X. Dong (2018). "Peripheral and Central Mechanisms of Itch." Neuron **98**(3): 482-494.
- Doore, B. J., M. M. Bashor, N. Spitzer, R. C. Mawe and M. H. Saier, Jr. (1975). "Regulation of adenosine 3' :5'-monophosphate efflux from rat glioma cells in culture*." J Biol Chem **250**(11): 4371-4372.
- Dorovkov, M. V. and A. G. Ryazanov (2004). "Phosphorylation of annexin I by TRPM7 channel-kinase." J Biol Chem **279**(49): 50643-50646.

- Dorton, A. M. (2000). "The pituitary gland: embryology, physiology, and pathophysiology." Neonatal Netw **19**(2): 9-17.
- Dos-Santos, R. C., L. C. Reis, M. Perello, A. V. Ferguson and A. S. Mecawi (2019). "The actions of ghrelin in the paraventricular nucleus: energy balance and neuroendocrine implications." Ann N Y Acad Sci **1455**(1): 81-97.
- Drake, C. L. (2010). "The characterization and pathology of circadian rhythm sleep disorders." J Fam Pract **59**(1 Suppl): S12-17.
- Du, B., Z. Zhang, S. Grubner, J. T. Yurkovich, B. O. Palsson and D. C. Zielinski (2018). "Temperature-Dependent Estimation of Gibbs Energies Using an Updated Group-Contribution Method." Biophys J **114**(11): 2691-2702.
- Duarte, T., F. S. Menezes-Rodrigues and R. O. Godinho (2012). "Contribution of the extracellular cAMP-adenosine pathway to dual coupling of beta2-adrenoceptors to Gs and Gi proteins in mouse skeletal muscle." J Pharmacol Exp Ther **341**(3): 820-828.
- Dunlap, J. C. (1999). "Molecular Bases for Circadian Clocks." Cell **96**(2): 271-290.
- Edelman, I. S. (1976). "Transition from the poikilotherm to the homeotherm: possible role of sodium transport and thyroid hormone." Fed Proc **35**(10): 2180-2184.
- Ehrlich, A. T., B. L. Kieffer and E. Darceq (2019). "Current strategies toward safer mu opioid receptor drugs for pain management." Expert Opin Ther Targets **23**(4): 315-326.
- Ellis, R. J., S. M. van der Vies and S. M. Hemmingsen (1989). "The molecular chaperone concept." Biochem Soc Symp **55**: 145-153.
- Evans, S. S., E. A. Repasky and D. T. Fisher (2015). "Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat." Nat Rev Immunol **15**(6): 335-349.
- Ewing, J. F. and M. D. Maines (1991). "Rapid induction of heme oxygenase 1 mRNA and protein by hyperthermia in rat brain: heme oxygenase 2 is not a heat shock protein." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(12): 5364-5368.
- Falcón, D., I. Galeano-Otero, E. Calderón-Sánchez, R. Del Toro, M. Martín-Bórnez, J. A. Rosado, A. Hmadcha and T. Smani (2019). "TRP Channels: Current Perspectives in the Adverse Cardiac Remodeling." Front Physiol **10**: 159.
- Farhan, M., H. Wang, U. Gaur, P. J. Little, J. Xu and W. Zheng (2017). "FOXO Signaling Pathways as Therapeutic Targets in Cancer." Int J Biol Sci **13**(7): 815-827.
- Faro, D., I. Boekhoff, T. Gudermann and A. Breit (2021). "Physiological temperature changes fine-tune $\beta(2)$ -adrenergic receptor-induced cytosolic cAMP accumulation." Mol Pharmacol.
- Fealey, R. D. (2013). "Interoception and autonomic nervous system reflexes thermoregulation." Handb Clin Neurol **117**: 79-88.
- Feeney, K. A., M. Putker, M. Brancaccio and J. S. O'Neill (2016). "In-depth Characterization of Firefly Luciferase as a Reporter of Circadian Gene Expression in Mammalian Cells." J Biol Rhythms **31**(6): 540-550.
- Fenzl, A. and F. W. Kiefer (2014). "Brown adipose tissue and thermogenesis." Horm Mol Biol Clin Investig **19**(1): 25-37.
- Ferguson, S. S. (2001). "Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling." Pharmacol Rev **53**(1): 1-24.

- Ferguson, S. S., W. E. Downey, 3rd, A. M. Colapietro, L. S. Barak, L. Ménard and M. G. Caron (1996). "Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization." Science **271**(5247): 363-366.
- Firsov, D. and O. Bonny (2018). "Circadian rhythms and the kidney." Nat Rev Nephrol **14**(10): 626-635.
- Flament-Durand, J. (1980). "The hypothalamus: anatomy and functions." Acta Psychiatr Belg **80**(4): 364-375.
- Fortelny, N., C. M. Overall, P. Pavlidis and G. V. C. Freue (2017). "Can we predict protein from mRNA levels?" Nature **547**(7664): E19-E20.
- Foulkes, N. S., D. Whitmore, D. Vallone and C. Bertolucci (2016). "Studying the Evolution of the Vertebrate Circadian Clock: The Power of Fish as Comparative Models." Adv Genet **95**: 1-30.
- Fredriksson, R., M. C. Lagerström, L.-G. Lundin and H. B. Schiöth (2003). "The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints." Molecular Pharmacology **63**(6): 1256-1272.
- Frielle, T., K. W. Daniel, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (1988). "Structural basis of beta-adrenergic receptor subtype specificity studied with chimeric beta 1/beta 2-adrenergic receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(24): 9494-9498.
- Fu, X. D. and M. Ares, Jr. (2014). "Context-dependent control of alternative splicing by RNA-binding proteins." Nat Rev Genet **15**(10): 689-701.
- Fujita, T., Y. Liu, H. Higashitsuji, K. Itoh, K. Shibasaki, J. Fujita and H. Nishiyama (2018). "Involvement of TRPV3 and TRPM8 ion channel proteins in induction of mammalian cold-inducible proteins." Biochem Biophys Res Commun **495**(1): 935-940.
- Fukuchi, M., M. Shimabukuro, Y. Shimajiri, Y. Oshiro, M. Higa, H. Akamine, I. Komiya and N. Takasu (2002). "Evidence for a deficient pancreatic β -cell response in a rat model of hyperthyroidism." Life sciences **71**(9): 1059-1070.
- Füzesi, T., G. Wittmann, R. M. Lechan, Z. Liposits and C. Fekete (2009). "Noradrenergic innervation of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in rats." Brain Res **1294**: 38-44.
- Füzesi, T., G. Wittmann, R. M. Lechan, Z. Liposits and C. Fekete (2009). "Noradrenergic innervation of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in rats." Brain Research **1294**: 38-44.
- Galliot, B., M. Welschhof, O. Schuckert, S. Hoffmeister and H. C. Schaller (1995). "The cAMP response element binding protein is involved in hydra regeneration." Development **121**(4): 1205-1216.
- Gampe, K., M. S. Brill, S. Momma, M. Götz and H. Zimmermann (2011). "EGF induces CREB and ERK activation at the wall of the mouse lateral ventricles." Brain Res **1376**: 31-41.
- Gao, Q., M. J. Wolfgang, S. Neschen, K. Morino, T. L. Horvath, G. I. Shulman and X. Y. Fu (2004). "Disruption of neural signal transducer and activator of transcription 3 causes obesity, diabetes, infertility, and thermal dysregulation." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(13): 4661-4666.

- Gao, V., A. Suzuki, P. J. Magistretti, S. Lengacher, G. Pollonini, M. Q. Steinman and C. M. Alberini (2016). "Astrocytic β 2-adrenergic receptors mediate hippocampal long-term memory consolidation." Proceedings of the National Academy of Sciences **113**(30): 8526-8531.
- Garbuz, D. G. (2017). "[Regulation of heat shock gene expression in response to stress]." Mol Biol (Mosk) **51**(3): 400-417.
- Ghigo, A. and D. Mika (2019). "cAMP/PKA signaling compartmentalization in cardiomyocytes: Lessons from FRET-based biosensors." J Mol Cell Cardiol **131**: 112-121.
- Gierschik, P. and M. Camps (1994). [14] Stimulation of phospholipase C by G-protein $\beta\gamma$ subunits. Methods in Enzymology, Academic Press. **238**: 181-195.
- Glas, E., H. Mückter, T. Gudermann and A. Breit (2016). "Exchange factors directly activated by cAMP mediate melanocortin 4 receptor-induced gene expression." Scientific Reports **6**(1): 32776.
- Glas, E., H. Mückter, T. Gudermann and A. Breit (2016). "Exchange factors directly activated by cAMP mediate melanocortin 4 receptor-induced gene expression." Sci Rep **6**: 32776.
- Glaser, F. T. and R. Stanewsky (2005). "Temperature Synchronization of the Drosophila Circadian Clock." Current Biology **15**(15): 1352-1363.
- Gleeson, M. (1998). "Temperature regulation during exercise." Int J Sports Med **19 Suppl 2**: S96-99.
- Gloerich, M. and J. L. Bos (2010). "Epac: defining a new mechanism for cAMP action." Annu Rev Pharmacol Toxicol **50**: 355-375.
- Godinho, R. O., T. Duarte and E. S. A. Pacini (2015). "New perspectives in signaling mediated by receptors coupled to stimulatory G protein: the emerging significance of cAMP efflux and extracellular cAMP-adenosine pathway." Frontiers in Pharmacology **06**.
- Golombek, D. A. and R. E. Rosenstein (2010). "Physiology of circadian entrainment." Physiol Rev **90**(3): 1063-1102.
- Gomez-Pastor, R., E. T. Burchfiel and D. J. Thiele (2018). "Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease." Nat Rev Mol Cell Biol **19**(1): 4-19.
- Gomez, C. R. (2014). "Disorders of body temperature." Handb Clin Neurol **120**: 947-957.
- Gonzalez, G. A. and M. R. Montminy (1989). "Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133." Cell **59**(4): 675-680.
- Goodman, O. B., J. G. Krupnick, F. Santini, V. V. Gurevich, R. B. Penn, A. W. Gagnon, J. H. Keen and J. L. Benovic (1996). " β -Arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the β 2-adrenergic receptor." Nature **383**(6599): 447-450.
- Goodman, R. H. and S. Smolik (2000). "CBP/p300 in cell growth, transformation, and development." Genes Dev **14**(13): 1553-1577.

- Gotic, I., S. Omid, F. Fleury-Olela, N. Molina, F. Naef and U. Schibler (2016). "Temperature regulates splicing efficiency of the cold-inducible RNA-binding protein geneCirbp." *Genes & Development* **30**(17): 2005-2017.
- Gottesman-Katz, L., R. Latorre, S. Vanner, B. L. Schmidt and N. W. Bunnett (2021). "Targeting G protein-coupled receptors for the treatment of chronic pain in the digestive system." *Gut* **70**(5): 970-981.
- Gragerov, A. I., E. S. Martin, M. A. Krupenko, M. V. Kashlev and V. G. Nikiforov (1991). "Protein aggregation and inclusion body formation in Escherichia coli rpoH mutant defective in heat shock protein induction." *FEBS Letters* **291**(2): 222-224.
- Graul, R. C. and W. Sadée (2001). "Evolutionary relationships among G protein-coupled receptors using a clustered database approach." *AAPS PharmSci* **3**(2): E12.
- Graumann, P. L. and M. A. Marahiel (1998). "A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain." *Trends Biochem Sci* **23**(8): 286-290.
- Greenbaum, D., C. Colangelo, K. Williams and M. Gerstein (2003). "Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale." *Genome Biol* **4**(9): 117.
- Griffith, F. (1928). "The Significance of Pneumococcal Types." *Journal of Hygiene* **27**(2): 113-159.
- Gross, D. N., M. Wan and M. J. Birnbaum (2009). "The role of FOXO in the regulation of metabolism." *Curr Diab Rep* **9**(3): 208-214.
- Grossmann, C., M. Wuttke, S. Ruhs, A. Seiferth, S. Mildenerberger, S. Rabe, G. Schwerdt and M. Gekle (2010). "Mineralocorticoid receptor inhibits CREB signaling by calcineurin activation." *Faseb j* **24**(6): 2010-2019.
- Guillou, J. L., H. Nakata and D. M. Cooper (1999). "Inhibition by calcium of mammalian adenylyl cyclases." *J Biol Chem* **274**(50): 35539-35545.
- Guissouma, H., R. Ghaddab-Zroud, I. Seugnet, S. Decherf, B. Demeneix and M.-S. Clerget-Froidevaux (2014). "TR alpha 2 exerts dominant negative effects on hypothalamic Trh transcription in vivo." *PloS one* **9**(4): e95064-e95064.
- Guissouma, H., M. T. Ghorbel, I. Seugnet, T. Ouatas and B. A. Demeneix (1998). "Physiological regulation of hypothalamic TRH transcription in vivo is T3 receptor isoform specific." *The FASEB Journal* **12**(15): 1755-1764.
- Güler, A. D., H. Lee, T. Iida, I. Shimizu, M. Tominaga and M. Caterina (2002). "Heat-Evoked Activation of the Ion Channel, TRPV4." *The Journal of Neuroscience* **22**(15): 6408-6414.
- Hammel, H. T. (1968). "Regulation of internal body temperature." *Annu Rev Physiol* **30**: 641-710.
- Hammond, K. A. and J. Diamond (1997). "Maximal sustained energy budgets in humans and animals." *Nature* **386**(6624): 457-462.
- Hampton, T. (2019). "Fever Induces a Molecular Homing Response in Immune Cells During Infection." *Jama* **321**(17): 1657-1658.
- Hanahan, D. (1983). "STUDIES ON TRANSFORMATION OF ESCHERICHIA-COLI WITH PLASMIDS." *Journal of Molecular Biology* **166**(4): 557-580.

- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." Journal of Molecular Biology **166**(4): 557-580.
- Hara, Y., Y. Sassi, C. Guibert, N. Gambaryan, P. Dorfmueller, S. Eddahibi, A.-M. Lompre, M. Humbert and J.-S. Hulot (2011). "Inhibition of MRP4 prevents and reverses pulmonary hypertension in mice." The Journal of Clinical Investigation **121**(7): 2888-2897.
- Harden, T. K., G. L. Waldo, S. N. Hicks and J. Sondek (2011). "Mechanism of Activation and Inactivation of Gq/Phospholipase C- β Signaling Nodes." Chemical Reviews **111**(10): 6120-6129.
- Harteneck, C. (2005). "Function and pharmacology of TRPM cation channels." Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology **371**(4): 307-314.
- Hasday, J. D. and I. S. Singh (2000). "Fever and the heat shock response: distinct, partially overlapping processes." Cell Stress & Chaperones **5**(5): 471.
- Haslauer, M., K. Baltensperger and H. Porzig (1998). "Thrombin and phorbol esters potentiate Gs-mediated cAMP formation in intact human erythroid progenitors via two synergistic signaling pathways converging on adenylyl cyclase type VII." Mol Pharmacol **53**(5): 837-845.
- Haus, E. and M. Smolensky (2006). "Biological Clocks and Shift Work: Circadian Dysregulation and Potential Long-term Effects." Cancer Causes & Control **17**(4): 489-500.
- Hauser, A. S., S. Chavali, I. Masuho, L. J. Jahn, K. A. Martemyanov, D. E. Gloriam and M. M. Babu (2018). "Pharmacogenomics of GPCR Drug Targets." Cell **172**(1-2): 41-54.e19.
- Havekes, R., A. J. Park, R. E. Tolentino, V. M. Bruinenberg, J. C. Tudor, Y. Lee, R. T. Hansen, L. A. Guercio, E. Linton, S. R. Neves-Zaph, P. Meerlo, G. S. Baillie, M. D. Houslay and T. Abel (2016). "Compartmentalized PDE4A5 Signaling Impairs Hippocampal Synaptic Plasticity and Long-Term Memory." J Neurosci **36**(34): 8936-8946.
- Hein, L. (2004). "Das β -adrenerge System: Pharmakologische Aspekte." Pharmazie in unserer Zeit **33**(6): 438-441.
- Held, K., T. Voets and J. Vriens (2015). "TRPM3 in temperature sensing and beyond." Temperature **2**(2): 201-213.
- Henrik Heiland, D., V. M. Ravi, S. P. Behringer, J. H. Frenking, J. Wurm, K. Joseph, N. W. C. Garrelfs, J. Strähle, S. Heynckes, J. Grauvogel, P. Franco, I. Mader, M. Schneider, A. L. Potthoff, D. Delev, U. G. Hofmann, C. Fung, J. Beck, R. Sankowski, M. Prinz and O. Schnell (2019). "Tumor-associated reactive astrocytes aid the evolution of immunosuppressive environment in glioblastoma." Nat Commun **10**(1): 2541.
- Hentze, N., L. Le Breton, J. Wiesner, G. Kempf and M. P. Mayer (2016). "Molecular mechanism of thermosensory function of human heat shock transcription factor Hsf1." eLife **5**.
- Hertz, L., D. Lovatt, S. A. Goldman and M. Nedergaard (2010). "Adrenoceptors in brain: cellular gene expression and effects on astrocytic metabolism and $[Ca^{2+}]_i$." Neurochemistry international **57**(4): 411-420.

- Herzig, S., F. Long, U. S. Jhala, S. Hedrick, R. Quinn, A. Bauer, D. Rudolph, G. Schutz, C. Yoon, P. Puigserver, B. Spiegelman and M. Montminy (2001). "CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1." Nature **413**(6852): 179-183.
- Herzog, E. D., T. Hermansteyne, N. J. Smyllie and M. H. Hastings (2017). "Regulating the Suprachiasmatic Nucleus (SCN) Circadian Clockwork: Interplay between Cell-Autonomous and Circuit-Level Mechanisms." Cold Spring Harb Perspect Biol **9**(1).
- Hetem, R. S., D. Mitchell, D. E. W. BA, L. G. Fick, S. K. Maloney, L. C. R. Meyer and A. Fuller (2019). "Body temperature, activity patterns and hunting in free-living cheetah: biologging reveals new insights." Integr Zool **14**(1): 30-47.
- Heyde, I. and H. Oster (2019). "Differentiating external zeitgeber impact on peripheral circadian clock resetting." Sci Rep **9**(1): 20114.
- Hilf, G., P. Gierschik and K. H. Jakobs (1989). "Muscarinic acetylcholine receptor-stimulated binding of guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) to guanine-nucleotide-binding proteins in cardiac membranes." European Journal of Biochemistry **186**(3): 725-731.
- Hilger, D., K. K. Kumar, H. Hu, M. F. Pedersen, E. S. O'Brien, L. Giehm, C. Jennings, G. Eskici, A. Inoue, M. Lerch, J. M. Mathiesen, G. Skiniotis and B. K. Kobilka (2020). "Structural insights into differences in G protein activation by family A and family B GPCRs." Science **369**(6503).
- Hill, A. V. (1910). "The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves." J Physiol (Lond) **40**: 4-7.
- Hill, K., F. Li, A. S. Bogard and R. S. Ostrom (2016). "The IBMX-insensitive PDE8A is expressed in human airway smooth muscle cells and selectively regulates signaling through AC6." The FASEB Journal **30**(S1): 1190.1198-1190.1198.
- Hillmeister, P. and P. B. Persson (2012). "The Kallikrein-Kinin system." Acta Physiol (Oxf) **206**(4): 215-219.
- Himmler, A., C. Stratowa and A. P. Czernilofsky (1993). "Functional testing of human dopamine D1 and D5 receptors expressed in stable cAMP-responsive luciferase reporter cell lines." J Recept Res **13**(1-4): 79-94.
- Hodges, J. R. (1984). "The hypothalamo-pituitary-adrenocortical system." Br J Anaesth **56**(7): 701-710.
- Hoermann, R., J. E. M. Midgley, R. Larisch and J. W. Dietrich (2018). "The role of functional thyroid capacity in pituitary thyroid feedback regulation." Eur J Clin Invest **48**(10): e13003.
- Holzer, P. and A. A. Izzo (2014). "The pharmacology of TRP channels." British Journal of Pharmacology **171**(10): 2469-2473.
- Hong, M. S., J. Y. Song, D. H. Yun, J. J. Cho and J. H. Chung (2009). "Increase of NADPH-diaphorase expression in hypothalamus of stat4 knockout mice." Korean J Physiol Pharmacol **13**(5): 337-341.
- Honma, K. I. and T. Hiroshige (1978). "Internal synchronization among several circadian rhythms in rats under constant light." Am J Physiol **235**(5): R243-249.
- Hopkinson, H. E., M. L. Latif and S. J. Hill (2000). "Non-competitive antagonism of beta(2)-agonist-mediated cyclic AMP accumulation by ICI 118551 in BC3H1 cells

endogenously expressing constitutively active beta(2)-adrenoceptors." British journal of pharmacology **131**(1): 124-130.

Horrocks, D. L. (1976). The Mechanisms of the Liquid Scintillation Process. Liquid Scintillation. A. A. Noujaim, C. Ediss and L. I. Weibe, Academic Press: 1-16.

Houslay, M. D., G. S. Baillie and D. H. Maurice (2007). "cAMP-Specific phosphodiesterase-4 enzymes in the cardiovascular system: a molecular toolbox for generating compartmentalized cAMP signaling." Circ Res **100**(7): 950-966.

Hu, F., Y. Zhao, Z. Hui, F. Xing, J. Yang, I. Lee, X. Zhang, L. Pan and J. Xu (2019). "Regulation of intracellular Ca²⁺/CaMKII signaling by TRPV4 membrane translocation during osteoblastic differentiation." Biophysics Reports **5**(5): 254-263.

Hulme, E. C. and M. A. Trevethick (2010). "Ligand binding assays at equilibrium: validation and interpretation." Br J Pharmacol **161**(6): 1219-1237.

Hunter, P. (2007). "The impact of CO₂. The global rise in the levels of CO₂ is good for trees, bad for grasses and terrible for corals." EMBO reports **8**(12): 1104-1106.

Ikeda, K. and T. Yamada (2020). "UCP1 Dependent and Independent Thermogenesis in Brown and Beige Adipocytes." Front Endocrinol (Lausanne) **11**: 498.

Ikegami, K., X.-H. Liao, Y. Hoshino, H. Ono, W. Ota, Y. Ito, T. Nishiwaki-Ohkawa, C. Sato, K. Kitajima and M. Iigo (2014). "Tissue-specific posttranslational modification allows functional targeting of thyrotropin." Cell reports **9**(3): 801-809.

Inada, A., Y. Hamamoto, Y. Tsuura, J.-i. Miyazaki, S. Toyokuni, Y. Ihara, K. Nagai, Y. Yamada, S. Bonner-Weir and Y. Seino (2004). "Overexpression of inducible cyclic AMP early repressor inhibits transactivation of genes and cell proliferation in pancreatic beta cells." Molecular and cellular biology **24**(7): 2831-2841.

Isogaya, M., Y. Sugimoto, R. Tanimura, R. Tanaka, H. Kikkawa, T. Nagao and H. Kurose (1999). "Binding pockets of the beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors for subtype-selective agonists." Mol Pharmacol **56**(5): 875-885.

Iwami, G., J. Kawabe, T. Ebina, P. J. Cannon, C. J. Homcy and Y. Ishikawa (1995). "Regulation of adenylyl cyclase by protein kinase A." J Biol Chem **270**(21): 12481-12484.

Jackson, E. K., D. Cheng, V. B. Ritov and Z. Mi (2020). "Alkaline Phosphatase Activity Is a Key Determinant of Vascular Responsiveness to Norepinephrine." Hypertension **76**(4): 1308-1318.

Jackson, E. K. and D. K. Raghvendra (2004). "The Extracellular Cyclic AMP-Adenosine Pathway in Renal Physiology." Annual Review of Physiology **66**(1): 571-599.

Jacob, P., H. Hirt and A. Bendahmane (2017). "The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance." Plant Biotechnol J **15**(4): 405-414.

Jacobowitz, O. and R. Iyengar (1994). "Phorbol ester-induced stimulation and phosphorylation of adenylyl cyclase 2." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**(22): 10630-10634.

Jagannath, A., L. Taylor, Z. Wakaf, S. R. Vasudevan and R. G. Foster (2017). "The genetics of circadian rhythms, sleep and health." Hum Mol Genet **26**(R2): R128-r138.

- Jakob, U., W. Muse, M. Eser and J. C. Bardwell (1999). "Chaperone activity with a redox switch." Cell **96**(3): 341-352.
- Jang, T.-W., H. Kim, S.-H. Kang, S.-H. Choo, I.-S. Lee and K.-H. Choi (2017). "Circadian Rhythm of Wrist Temperature among Shift Workers in South Korea: A Prospective Observational Study." International journal of environmental research and public health **14**(10): 1109.
- Jang, W., C. E. Adams, H. Liu, C. Zhang, F. O. Levy, K. W. Andressen and N. A. Lambert (2020). "An inactive receptor-G protein complex maintains the dynamic range of agonist-induced signaling." Proceedings of the National Academy of Sciences **117**(48): 30755-30762.
- Jedlitschky, G., B. Burchell and D. Keppler (2000). "The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides." J Biol Chem **275**(39): 30069-30074.
- Jeong, S. (2017). "SR Proteins: Binders, Regulators, and Connectors of RNA." Molecules and Cells **40**(1): 1-9.
- Jhala, U. S., G. Canettieri, R. A. Screaton, R. N. Kulkarni, S. Krajewski, J. Reed, J. Walker, X. Lin, M. White and M. Montminy (2003). "cAMP promotes pancreatic beta-cell survival via CREB-mediated induction of IRS2." Genes Dev **17**(13): 1575-1580.
- Jia, Y., J. Zhou, Y. Tai and Y. Wang (2007). "TRPC channels promote cerebellar granule neuron survival." Nature Neuroscience **10**(5): 559-567.
- Jiang, Q., L. Detolla, I. S. Singh, L. Gatdula, B. Fitzgerald, N. van Rooijen, A. S. Cross and J. D. Hasday (1999). "Exposure to febrile temperature upregulates expression of pyrogenic cytokines in endotoxin-challenged mice." Am J Physiol **276**(6): R1653-1660.
- Jiang, Z., S. Rajamanickam and N. J. Justice (2018). "Local Corticotropin-Releasing Factor Signaling in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus." J Neurosci **38**(8): 1874-1890.
- Jin, H., M. Aziz, Y. Ode and P. Wang (2019). "CIRP Induces Neutrophil Reverse Transendothelial Migration in Sepsis." Shock **51**(5): 548-556.
- Jin, X., L. P. Shearman, D. R. Weaver, M. J. Zylka, G. J. De Vries and S. M. Reppert (1999). "A Molecular Mechanism Regulating Rhythmic Output from the Suprachiasmatic Circadian Clock." Cell **96**(1): 57-68.
- Jockers, R., A. Da Silva, A. D. Strosberg, M. Bouvier and S. Marullo (1996). "New Molecular and Structural Determinants Involved in β_2 -Adrenergic Receptor Desensitization and Sequestration: DELINEATION USING CHIMERIC β_2 -ADRENERGIC RECEPTORS." Journal of Biological Chemistry **271**(16): 9355-9362.
- Johnson, M. (2006). "Molecular mechanisms of β_2 -adrenergic receptor function, response, and regulation." Journal of Allergy and Clinical Immunology **117**(1): 18-24.
- Johnston, C. A. and D. P. Siderovski (2007). "Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins: current structural insights." Mol Pharmacol **72**(2): 219-230.
- Julius, D. (2013). "TRP channels and pain." Annu Rev Cell Dev Biol **29**: 355-384.
- Jung, W. W., I. M. Yang, K. S. Seo and S. W. Jung (1994). "Characterization of Cyclic AMP Response Element (CRE) in the Promoter of the Rat Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) Gene." Endocrinol Metab **9**(3): 190-199.

- Kalsbeek, A., E. Bruinstroop, C. X. Yi, L. P. Klieverik, S. E. La Fleur and E. Fliers (2010). "Hypothalamic control of energy metabolism via the autonomic nervous system." Annals of the New York Academy of Sciences **1212**(1): 114-129.
- Kalsbeek, A. and E. Fliers (2013). "Daily regulation of hormone profiles." Handb Exp Pharmacol(217): 185-226.
- Kaneko, M., T. Hiroshige, J. Shinsako and M. F. Dallman (1980). "Diurnal changes in amplification of hormone rhythms in the adrenocortical system." American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology **239**(3): R309-R316.
- Kanewska, A., M. Ito, Y. Karasawa, M. Inada, F. Garreis, F. Paulsen and M. Takeuchi (2020). "Developmental change in the gene expression of transient receptor potential melastatin channel 3 (TRPM3) in murine lacrimal gland." Ann Anat **231**: 151551.
- Kashio, M. and M. Tominaga (2015). "Redox Signal-mediated Enhancement of the Temperature Sensitivity of Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) Elevates Glucose-induced Insulin Secretion from Pancreatic Islets *." Journal of Biological Chemistry **290**(19): 12435-12442.
- Kashio, M. and M. Tominaga (2017). "The TRPM2 channel: A thermo-sensitive metabolic sensor." Channels **11**(5): 426-433.
- Katoh, M. and M. Katoh (2004). "Human FOX gene family (Review)." Int J Oncol **25**(5): 1495-1500.
- Kecklund, G. and J. Axelsson (2016). "Health consequences of shift work and insufficient sleep." Bmj **355**: i5210.
- Kecskés, M., G. Jacobs, S. Kerselaers, N. Syam, A. Menigoz, P. Vangheluwe, M. Freichel, V. Flockerzi, T. Voets and R. Vennekens (2015). "The Ca²⁺-activated cation channel TRPM4 is a negative regulator of angiotensin II-induced cardiac hypertrophy." Basic Research in Cardiology **110**(4): 43.
- Keller-Wood, M. (2015). "Hypothalamic-Pituitary--Adrenal Axis-Feedback Control." Compr Physiol **5**(3): 1161-1182.
- Kenakin, T. (2004). "Principles: Receptor theory in pharmacology." Trends in Pharmacological Sciences **25**(4): 186-192.
- Kenakin, T. P. and T. Kenakin (1993). Pharmacologic analysis of drug-receptor interaction, Raven press.
- Keravis, T. and C. Lugnier (2012). "Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments." Br J Pharmacol **165**(5): 1288-1305.
- Kidd, P. B., M. W. Young and E. D. Siggia (2015). "Temperature compensation and temperature sensation in the circadian clock." Proceedings of the National Academy of Sciences **112**(46): E6284-E6292.
- Kiefhaber, T., R. Rudolph, H.-H. Kohler and J. Buchner (1991). "Protein Aggregation in vitro and in vivo: A Quantitative Model of the Kinetic Competition between Folding and Aggregation." Bio/Technology **9**(9): 825-829.
- Kilpatrick, G. J., F. M. Dautzenberg, G. R. Martin and R. M. Eglen (1999). "7TM receptors: the splicing on the cake." Trends Pharmacol Sci **20**(7): 294-301.

- Kim, M.-S., Y. K. Pak, P.-G. Jang, C. Namkoong, Y.-S. Choi, J.-C. Won, K.-S. Kim, S.-W. Kim, H.-S. Kim, J.-Y. Park, Y.-B. Kim and K.-U. Lee (2006). "Role of hypothalamic Foxo1 in the regulation of food intake and energy homeostasis." Nature Neuroscience **9**(7): 901-906.
- Kimura, G. (2008). Kidney and circadian blood pressure rhythm, Am Heart Assoc.
- Kiyatkin, E. A. (2007). "Brain temperature fluctuations during physiological and pathological conditions." Eur J Appl Physiol **101**(1): 3-17.
- Kluger, M. J., C. A. Conn, B. Franklin, R. Freter and G. D. Abrams (1990). "Effect of gastrointestinal flora on body temperature of rats and mice." Am J Physiol **258**(2 Pt 2): R552-557.
- Knauth, P., E. Emde, J. Rutenfranz, E. Kiesswetter and P. Smith (1981). "Re-entrainment of body temperature in field studies of shiftwork." International Archives of Occupational and Environmental Health **49**(2): 137-149.
- Kobilka, B. K., T. S. Kobilka, K. Daniel, J. W. Regan, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (1988). "Chimeric alpha 2-,beta 2-adrenergic receptors: delineation of domains involved in effector coupling and ligand binding specificity." Science **240**(4857): 1310-1316.
- Kohlhaas, M. and C. Maack (2013). "Calcium release microdomains and mitochondria." Cardiovasc Res **98**(2): 259-268.
- Komatsu, H. (2015). "Novel therapeutic GPCRs for psychiatric disorders." International journal of molecular sciences **16**(6): 14109-14121.
- Koo, S. H., L. Flechner, L. Qi, X. Zhang, R. A. Sreaton, S. Jeffries, S. Hedrick, W. Xu, F. Boussouar, P. Brindle, H. Takemori and M. Montminy (2005). "The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism." Nature **437**(7062): 1109-1111.
- Koopman, M., G. Koomen, R. Krediet, E. De Moor, F. Hoek and L. Arisz (1989). "Circadian rhythm of glomerular filtration rate in normal individuals." Clinical science **77**(1): 105-111.
- Kornmann, B., O. Schaad, H. Bujard, J. S. Takahashi and U. Schibler (2007). "System-Driven and Oscillator-Dependent Circadian Transcription in Mice with a Conditionally Active Liver Clock." PLoS Biology **5**(2): e34.
- Kornmann, B., O. Schaad, H. Bujard, J. S. Takahashi and U. Schibler (2007). "System-driven and oscillator-dependent circadian transcription in mice with a conditionally active liver clock." PLoS Biol **5**(2): e34.
- Kouidhi, S. and M.-S. Clerget-Froidevaux (2018). "Integrating Thyroid Hormone Signaling in Hypothalamic Control of Metabolism: Crosstalk Between Nuclear Receptors." International Journal of Molecular Sciences **19**(7): 2017.
- Krashes, M. J., B. B. Lowell and A. S. Garfield (2016). "Melanocortin-4 receptor-regulated energy homeostasis." Nat Neurosci **19**(2): 206-219.
- Kräuchi, K. (2002). "How is the circadian rhythm of core body temperature regulated?" Clinical Autonomic Research **12**(3): 147-149.
- Kravets, I. (2016). "Hyperthyroidism: Diagnosis and Treatment." Am Fam Physician **93**(5): 363-370.

- Kreiner, P. W., J. J. Keirns and M. W. Bitensky (1973). "A Temperature-Sensitive Change in the Energy of Activation of Hormone-Stimulated Hepatic Adenylyl Cyclase." Proceedings of the National Academy of Sciences **70**(6): 1785-1789.
- Kuhn, L. R. (1949). "Effect of Elevated Body Temperatures on Cryptococcosis in Mice." Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine **71**(3): 341-343.
- Kuwahara, K., Y. Wang, J. McAnally, J. A. Richardson, R. Bassel-Duby, J. A. Hill and E. N. Olson (2006). "TRPC6 fulfills a calcineurin signaling circuit during pathologic cardiac remodeling." J Clin Invest **116**(12): 3114-3126.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lam, E. W., J. J. Brosens, A. R. Gomes and C. Y. Koo (2013). "Forkhead box proteins: tuning forks for transcriptional harmony." Nat Rev Cancer **13**(7): 482-495.
- Langhans, W. (2002). "Zentrale Regulation der Nahrungsaufnahme." Aktuelle Ernährungsmedizin **27**(06): 381-388.
- Larsson, H. P. (2010). "How is the heart rate regulated in the sinoatrial node? Another piece to the puzzle." J Gen Physiol **136**(3): 237-241.
- Lauffer, L., E. Glas, T. Gudermann and A. Breit (2016). "Endogenous 5-HT_{2C} Receptors Phosphorylate the cAMP Response Element Binding Protein via Protein Kinase C-Promoted Activation of Extracellular-Regulated Kinases-1/2 in Hypothalamic mHypoA-2/10 Cells." J Pharmacol Exp Ther **358**(1): 39-49.
- Lauretti, E., A. Di Meco, S. Merali and D. Praticò (2017). "Circadian rhythm dysfunction: a novel environmental risk factor for Parkinson's disease." Molecular Psychiatry **22**(2): 280-286.
- Lechan, R. M. and C. Fekete (2006). "The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism." Prog Brain Res **153**: 209-235.
- Lee, G. C., I. M. Yang, B. J. Kim, J. T. Woo, S. W. Kim, J. W. Kim, Y. S. Kim and Y. K. Choi (1996). "Identification of glucocorticoid response element of the rat TRH gene." The Korean journal of internal medicine **11**(2): 138-144.
- Lee, H., T. Iida, A. Mizuno, M. Suzuki and M. J. Caterina (2005). "Altered Thermal Selection Behavior in Mice Lacking Transient Receptor Potential Vanilloid 4." The Journal of Neuroscience **25**(5): 1304.
- Lee, J.-Y., H. Muenzberg, O. Gavrilova, J. A. Reed, D. Berryman, E. C. Villanueva, G. W. Louis, G. M. Leininger, S. Bertuzzi, R. J. Seeley, G. W. Robinson, M. G. Myers, Jr. and L. Hennighausen (2008). "Loss of Cytokine-STAT5 Signaling in the CNS and Pituitary Gland Alters Energy Balance and Leads to Obesity." PLOS ONE **3**(2): e1639.
- Lee, K. A. (1991). "Transcriptional regulation by cAMP." Curr Opin Cell Biol **3**(6): 953-959.
- Lee, S. L., K. Stewart and R. H. Goodman (1988). "Structure of the gene encoding rat thyrotropin releasing hormone." Journal of Biological Chemistry **263**(32): 16604-16609.
- Leeb-Lundberg, L. M. F., F. Marceau, W. Müller-Esterl, D. J. Pettibone and B. L. Zuraw (2005). "International Union of Pharmacology. XLV. Classification of the Kinin Receptor Family: from Molecular Mechanisms to Pathophysiological Consequences." Pharmacological Reviews **57**(1): 27.

- Lefkowitz, R. J. (2000). "The superfamily of heptahelical receptors." Nature Cell Biology **2**(7): E133-E136.
- Lemonnier, L., M. Trebak, J. P. Lievreumont, G. S. Bird and J. W. Putney (2006). "Protection of TRPC7 cation channels from calcium inhibition by closely associated SERCA pumps." The FASEB Journal **20**(3): 503-505.
- Lerner, A. and P. M. Epstein (2006). "Cyclic nucleotide phosphodiesterases as targets for treatment of haematological malignancies." Biochem J **393**(Pt 1): 21-41.
- Lerner, R. G., C. Depatie, G. A. Rutter, R. A. Screaton and N. Balthasar (2009). "A role for the CREB co-activator CRTC2 in the hypothalamic mechanisms linking glucose sensing with gene regulation." EMBO reports **10**(10): 1175-1181.
- Lesch, A., O. G. Rössler and G. Thiel (2017). "Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase, c-Jun N-Terminal Protein Kinase, and Calcineurin Regulate Transient Receptor Potential M3 (TRPM3) Induced Activation of AP-1." Journal of Cellular Biochemistry **118**(8): 2409-2419.
- Leschner, J., L. Ring, J. Feierler, K. Dinkel, M. Jochum and A. Faussner (2011). "Fever-like temperature modification differentially affects in vitro signaling of bradykinin B(1) and B(2) receptors." Biol Chem **392**(11): 1021-1029.
- Li, D. P., S. R. Chen and H. L. Pan (2010). "Adenosine inhibits paraventricular pre-sympathetic neurons through ATP-dependent potassium channels." J Neurochem **113**(2): 530-542.
- Liao, Y., L. Tong, L. Tang and S. Wu (2017). "The role of cold-inducible RNA binding protein in cell stress response." Int J Cancer **141**(11): 2164-2173.
- Liedtke, W. B. (2017). "Deconstructing mammalian thermoregulation." Proceedings of the National Academy of Sciences **114**(8): 1765-1767.
- Liggett, S. B. (2002). "Update on current concepts of the molecular basis of beta2-adrenergic receptor signaling." J Allergy Clin Immunol **110**(6 Suppl): S223-227.
- Lim, C. L., C. Byrne and J. K. Lee (2008). "Human thermoregulation and measurement of body temperature in exercise and clinical settings." Ann Acad Med Singap **37**(4): 347-353.
- Lin, S. and X. D. Fu (2007). "SR proteins and related factors in alternative splicing." Adv Exp Med Biol **623**: 107-122.
- Liposits, Z., W. K. Paull, P. Wu, I. M. Jackson and R. M. Lechan (1987). "Hypophysiotrophic thyrotropin releasing hormone (TRH) synthesizing neurons. Ultrastructure, adrenergic innervation and putative transmitter action." Histochemistry **88**(1): 1-10.
- Little, K. Y., G. E. Duncan, G. R. Breese and W. E. Stumpf (1992). "Beta-adrenergic receptor binding in human and rat hypothalamus." Biol Psychiatry **32**(6): 512-522.
- Liu, C., S. Li, T. Liu, J. Borjigin and J. D. Lin (2007). "Transcriptional coactivator PGC-1alpha integrates the mammalian clock and energy metabolism." Nature **447**(7143): 477-481.
- Liu, X., H. Wang, Y. Jiang, Q. Zheng, M. Petrus, M. Zhang, S. Zheng, C. Schmedt, X. Dong and B. Xiao (2019). "STIM1 thermosensitivity defines the optimal preference temperature for warm sensation in mice." Cell Research **29**(2): 95-109.

- Long, P. H., E. A. Bliss and H. M. Carpenter (1933). "Studies upon the nasal secretions. I. The cellular content of the nasal secretions in acute disease of the respiratory tract." J Clin Invest **12**(6): 1127-1134.
- Lonze, B. E. and D. D. Ginty (2002). "Function and Regulation of CREB Family Transcription Factors in the Nervous System." Neuron **35**(4): 605-623.
- Lowrey, P. L. and J. S. Takahashi (2004). "mammalian circadian biology: Elucidating Genome-Wide Levels of Temporal Organization." Annual Review of Genomics and Human Genetics **5**(1): 407-441.
- Lugnier, C., P. Schoeffter, A. Le Bec, E. Strouthou and J. C. Stoclet (1986). "Selective inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterases of human, bovine and rat aorta." Biochem Pharmacol **35**(10): 1743-1751.
- Lujan, D. A., J. L. Ochoa and R. S. Hartley (2018). "Cold-inducible RNA binding protein in cancer and inflammation." Wiley Interdiscip Rev RNA **9**(2).
- Lundblad, J. R., R. P. Kwok, M. E. Laurance, M. L. Harter and R. H. Goodman (1995). "Adenoviral E1A-associated protein p300 as a functional homologue of the transcriptional co-activator CBP." Nature **374**(6517): 85-88.
- Macdonald, R. L., J. Zhang, L. S. Marton and B. Weir (1999). "Effects of cell-permeant calcium chelators on contractility in monkey basilar artery." J Neurotrauma **16**(1): 37-47.
- Madden, C. J. and S. F. Morrison (2019). "Central nervous system circuits that control body temperature." Neurosci Lett **696**: 225-232.
- Madison, J. M., C. B. Basbaum, J. K. Brown and W. E. Finkbeiner (1989). "Characterization of beta-adrenergic receptors in cultured bovine tracheal gland cells." American Journal of Physiology-Cell Physiology **256**(2): C310-C314.
- Maguire, J. J., R. E. Kuc and A. P. Davenport (2012). Radioligand Binding Assays and Their Analysis. Receptor Binding Techniques. A. P. Davenport. Totowa, NJ, Humana Press: 31-77.
- Mahat, D. B., H. H. Salamanca, F. M. Duarte, C. G. Danko and J. T. Lis (2016). "Mammalian Heat Shock Response and Mechanisms Underlying Its Genome-wide Transcriptional Regulation." Mol Cell **62**(1): 63-78.
- Maier, T., M. Güell and L. Serrano (2009). "Correlation of mRNA and protein in complex biological samples." FEBS Lett **583**(24): 3966-3973.
- Makhatadze, G. I. and P. L. Privalov (1995). "Energetics of protein structure." Advances in protein chemistry **47**: 307-425.
- Manning, B. D. and A. Toker (2017). "AKT/PKB Signaling: Navigating the Network." Cell **169**(3): 381-405.
- Manoogian, E. N. C. and S. Panda (2017). "Circadian rhythms, time-restricted feeding, and healthy aging." Ageing Res Rev **39**: 59-67.
- Masser, A. E., M. Ciccarelli and C. Andréasson (2020). "Hsf1 on a leash - controlling the heat shock response by chaperone titration." Exp Cell Res **396**(1): 112246.
- Mattson, M. P., D. B. Allison, L. Fontana, M. Harvie, V. D. Longo, W. J. Malaisse, M. Mosley, L. Notterpek, E. Ravussin, F. A. J. L. Scheer, T. N. Seyfried, K. A. Varady and

- S. Panda (2014). "Meal frequency and timing in health and disease." Proceedings of the National Academy of Sciences **111**(47): 16647-16653.
- McAlpine, C. S. and F. K. Swirski (2016). "Circadian Influence on Metabolism and Inflammation in Atherosclerosis." Circ Res **119**(1): 131-141.
- Mckemy, D. D., W. M. Neuhauser and D. Julius (2002). "Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation." Nature **416**(6876): 52-58.
- Meersman, F., L. Smeller and K. Heremans (2006). "Protein stability and dynamics in the pressure-temperature plane." Biochim Biophys Acta **1764**(3): 346-354.
- Meister, G., M. Landthaler, A. Patkaniowska, Y. Dorsett, G. Teng and T. Tuschl (2004). "Human Argonaute2 Mediates RNA Cleavage Targeted by miRNAs and siRNAs." Molecular Cell **15**(2): 185-197.
- Melanie, E., W. Kittrell and E. Satinoff (1988). "Diurnal rhythms of body temperature, drinking and activity over reproductive cycles." Physiology & Behavior **42**(5): 477-484.
- Michl, J., K. C. Park and P. Swietach (2019). "Evidence-based guidelines for controlling pH in mammalian live-cell culture systems." Communications Biology **2**(1): 144.
- Milligan, G. (2003). "Principles: extending the utility of [35S]GTP gamma S binding assays." Trends Pharmacol Sci **24**(2): 87-90.
- Milligan, G. (2009). "G protein-coupled receptor hetero-dimerization: contribution to pharmacology and function." British Journal of Pharmacology **158**(1): 5-14.
- Milligan, G. and E. Kostenis (2006). "Heterotrimeric G-proteins: a short history." Br J Pharmacol **147 Suppl 1**(Suppl 1): S46-55.
- Missiaen, L., G. Callewaert, H. De Smedt and J. B. Parys (2001). "2-Aminoethoxydiphenyl borate affects the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, the intracellular Ca²⁺ pump and the non-specific Ca²⁺ leak from the non-mitochondrial Ca²⁺ stores in permeabilized A7r5 cells." Cell Calcium **29**(2): 111-116.
- Mohawk, J. A., C. B. Green and J. S. Takahashi (2012). "Central and Peripheral Circadian Clocks in Mammals." Annual Review of Neuroscience **35**(1): 445-462.
- Montanari, T., N. Pošćić and M. Colitti (2017). "Factors involved in white-to-brown adipose tissue conversion and in thermogenesis: a review." Obes Rev **18**(5): 495-513.
- Montminy, M. R., G. A. Gonzalez and K. K. Yamamoto (1990). "Regulation of camp-inducible genes by creb." Trends in Neurosciences **13**(5): 184-188.
- Moo, E. V., J. R. van Senten, H. Bräuner-Osborne and T. C. Møller (2021). "Arrestin-Dependent and -Independent Internalization of G Protein-Coupled Receptors: Methods, Mechanisms, and Implications on Cell Signaling." Mol Pharmacol **99**(4): 242-255.
- Moran, M. M. (2018). "TRP Channels as Potential Drug Targets." Annual Review of Pharmacology and Toxicology **58**(1): 309-330.
- Morf, J., G. Rey, K. Schneider, M. Stratmann, J. Fujita, F. Naef and U. Schibler (2012). "Cold-Inducible RNA-Binding Protein Modulates Circadian Gene Expression Posttranscriptionally." Science **338**(6105): 379-383.
- Morf, J. and U. Schibler (2013). "Body temperature cycles: gatekeepers of circadian clocks." Cell Cycle **12**(4): 539-540.

- Morf, J. and U. Schibler (2013). "Body temperature cycles: Gatekeepers of circadian clocks." Cell Cycle **12**(4): 539-540.
- Mori, M. A., R. C. Araújo, F. C. Reis, D. G. Sgai, R. G. Fonseca, C. C. Barros, V. F. Merino, M. Passadore, A. M. Barbosa, B. Ferrari, P. Carayon, C. H. Castro, S. I. Shimuta, J. Luz, J. L. Bascands, J. P. Schanstra, P. C. Even, S. M. Oliveira, M. Bader and J. B. Pesquero (2008). "Kinin B1 receptor deficiency leads to leptin hypersensitivity and resistance to obesity." Diabetes **57**(6): 1491-1500.
- Morris, C. J., T. E. Purvis, K. Hu and F. A. J. L. Scheer (2016). "Circadian misalignment increases cardiovascular disease risk factors in humans." Proceedings of the National Academy of Sciences **113**(10): E1402-E1411.
- Morris, R., N. J. Kershaw and J. J. Babon (2018). "The molecular details of cytokine signaling via the JAK/STAT pathway." Protein Sci **27**(12): 1984-2009.
- Morrison, K. J., R. H. Moore, N. D. Carsrud, J. Trial, E. E. Millman, M. Tuvim, R. B. Clark, R. Barber, B. F. Dickey and B. J. Knoll (1996). "Repetitive endocytosis and recycling of the beta 2-adrenergic receptor during agonist-induced steady state redistribution." Mol Pharmacol **50**(3): 692-699.
- Morrison, S. F. (2016). "Central control of body temperature." F1000Research **5**: 880.
- Mullur, R., Y. Y. Liu and G. A. Brent (2014). "Thyroid hormone regulation of metabolism." Physiol Rev **94**(2): 355-382.
- Musiek, E. S. and D. M. Holtzman (2016). "Mechanisms linking circadian clocks, sleep, and neurodegeneration." Science **354**(6315): 1004-1008.
- Nakamura, K. (2011). "Central circuitries for body temperature regulation and fever." American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology **301**(5): R1207-R1228.
- Nantel, F., H. Bonin, L. J. Emorine, V. Zilberfarb, A. D. Strosberg, M. Bouvier and S. Marullo (1993). "The human beta 3-adrenergic receptor is resistant to short term agonist-promoted desensitization." Molecular Pharmacology **43**(4): 548-555.
- Nantel, F., H. Bonin, L. J. Emorine, V. Zilberfarb, A. D. Strosberg, M. Bouvier and S. Marullo (1993). "The human beta 3-adrenergic receptor is resistant to short term agonist-promoted desensitization." Mol Pharmacol **43**(4): 548-555.
- Narouze, S., H. T. Benzon, D. A. Provenzano, A. Buvanendran, J. De Andres, T. R. Deer, R. Rauck and M. A. Huntoon (2015). "Interventional spine and pain procedures in patients on antiplatelet and anticoagulant medications: guidelines from the American Society of Regional Anesthesia and Pain Medicine, the European Society of Regional Anaesthesia and Pain Therapy, the American Academy of pain Medicine, the international Neuromodulation Society, the north American Neuromodulation Society, and the world Institute of Pain." Regional Anesthesia & Pain Medicine **40**(3): 182-212.
- Navara, K. J. and R. J. Nelson (2007). "The dark side of light at night: physiological, epidemiological, and ecological consequences." J Pineal Res **43**(3): 215-224.
- Nedergaard, J. and B. Cannon (2018). "Brown adipose tissue as a heat-producing thermoeffector." Handb Clin Neurol **156**: 137-152.
- Nevado-Holgado, A. J., E. Ribe, L. Thei, L. Furlong, M. A. Mayer, J. Quan, J. C. Richardson, J. Cavanagh, N. Consortium and S. Lovestone (2019). "Genetic and Real-

World Clinical Data, Combined with Empirical Validation, Nominate Jak-Stat Signaling as a Target for Alzheimer's Disease Therapeutic Development." Cells **8**(5).

Neves-Zaph, S. R. (2017). "Phosphodiesterase Diversity and Signal Processing Within cAMP Signaling Networks." Adv Neurobiol **17**: 3-14.

Nguyen, Q., J. Dominguez, L. Nguyen and N. Gullapalli (2010). "Hypertension management: an update." American health & drug benefits **3**(1): 47-56.

Nguyen, T. and O. Bensauade (1994). "Increased thermal aggregation of proteins in ATP-depleted mammalian cells." European Journal of Biochemistry **220**(1): 239-246.

Niclauff, N., M. B. Michel-Reher, A. E. Alewijnse and M. C. Michel (2006). "Comparison of three radioligands for the labelling of human β -adrenoceptor subtypes." Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology **374**(2): 99-105.

Nilius, B., T. Voets and J. Peters (2005). "TRP channels in disease." Sci STKE **2005**(295): re8.

Nillni, E. A. (2007). "Regulation of Prohormone Convertases in Hypothalamic Neurons: Implications for ProThyrotropin-Releasing Hormone and Proopiomelanocortin." Endocrinology **148**(9): 4191-4200.

Nimmesgern, E. and F. U. Hartl (1993). "ATP-dependent protein refolding activity in reticulocyte lysate. Evidence for the participation of different chaperone components." FEBS Lett **331**(1-2): 25-30.

Nishiyama, H., K. Itoh, Y. Kaneko, M. Kishishita, O. Yoshida and J. Fujita (1997). "A Glycine-rich RNA-binding Protein Mediating Cold-inducible Suppression of Mammalian Cell Growth." Journal of Cell Biology **137**(4): 899-908.

Nishiyama, H., J.-H. Xue, T. Sato, H. Fukuyama, N. Mizuno, T. Houtani, T. Sugimoto and J. Fujita (1998). "Diurnal Change of the Cold-Inducible RNA-Binding Protein (Circp) Expression in Mouse Brain." Biochemical and Biophysical Research Communications **245**(2): 534-538.

O'Malley, J. J., F. Seibt, J. Chin and M. Beierlein (2020). "TRPM4 Conductances in Thalamic Reticular Nucleus Neurons Generate Persistent Firing during Slow Oscillations." The Journal of Neuroscience **40**(25): 4813-4823.

Oakley, R. H., S. A. Laporte, J. A. Holt, M. G. Caron and L. S. Barak (2000). "Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors." J Biol Chem **275**(22): 17201-17210.

Obermeyer, Z., J. K. Samra and S. Mullainathan (2017). "Individual differences in normal body temperature: longitudinal big data analysis of patient records." BMJ **359**: j5468.

Obi, S., T. Nakajima, T. Hasegawa, H. Kikuchi, G. Oguri, M. Takahashi, F. Nakamura, T. Yamasoba, M. Sakuma, S. Toyoda, C. Tei and T. Inoue (2017). "Heat induces interleukin-6 in skeletal muscle cells via TRPV1/PKC/CREB pathways." Journal of Applied Physiology **122**(3): 683-694.

Ogoina, D. (2011). "Fever, fever patterns and diseases called 'fever'--a review." J Infect Public Health **4**(3): 108-124.

Oldham, W. M. and H. E. Hamm (2008). "Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(1): 60-71.

- Oldham, W. M. and H. E. Hamm (2008). "Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors." Nature Reviews Molecular Cell Biology **9**(1): 60-71.
- Oliveira Ldos, S., L. P. da Silva, A. I. da Silva, C. P. Magalhães, S. L. de Souza and R. M. de Castro (2011). "Effects of early weaning on the circadian rhythm and behavioral satiety sequence in rats." Behav Processes **86**(1): 119-124.
- Oliveira, R. F., A. Terrin, G. Di Benedetto, R. C. Cannon, W. Koh, M. Kim, M. Zaccolo and K. T. Blackwell (2010). "The role of type 4 phosphodiesterases in generating microdomains of cAMP: large scale stochastic simulations." PLoS One **5**(7): e11725.
- Oosterman, J. E., A. Kalsbeek, S. E. la Fleur and D. D. Belsham (2015). "Impact of nutrients on circadian rhythmicity." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **308**(5): R337-350.
- Ortiga-Carvalho, T. M., M. I. Chiamolera, C. C. Pazos-Moura and F. E. Wondisford (2016). "Hypothalamus-Pituitary-Thyroid Axis." Compr Physiol **6**(3): 1387-1428.
- Oshima, N., H. Onimaru, K. Yamamoto, H. Takechi, Y. Nishida, T. Oda and H. Kumagai (2014). "Expression and functions of β 1- and β 2-adrenergic receptors on the bulbospinal neurons in the rostral ventrolateral medulla." Hypertension Research **37**(11): 976-983.
- Ouyang, Y., C. R. Andersson, T. Kondo, S. S. Golden and C. H. Johnson (1998). "Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(15): 8660-8664.
- Paoli, A., G. Tinsley, A. Bianco and T. Moro (2019). "The Influence of Meal Frequency and Timing on Health in Humans: The Role of Fasting." Nutrients **11**(4).
- Parekh, A. B. (2008). "Ca²⁺microdomains near plasma membrane Ca²⁺channels: impact on cell function." The Journal of Physiology **586**(13): 3043-3054.
- Parker, D., K. Ferreri, T. Nakajima, V. J. LaMorte, R. Evans, S. C. Koerber, C. Hoeger and M. R. Montminy (1996). "Phosphorylation of CREB at Ser-133 induces complex formation with CREB-binding protein via a direct mechanism." Mol Cell Biol **16**(2): 694-703.
- Partch, C. L., C. B. Green and J. S. Takahashi (2014). "Molecular architecture of the mammalian circadian clock." Trends Cell Biol **24**(2): 90-99.
- Patapoutian, A., A. M. Peier, G. M. Story and V. Viswanath (2003). "ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation." Nature Reviews Neuroscience **4**(7): 529-539.
- Patapoutian, A., A. M. Peier, G. M. Story and V. Viswanath (2003). "ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation." Nat Rev Neurosci **4**(7): 529-539.
- Patke, A., M. W. Young and S. Axelrod (2020). "Molecular mechanisms and physiological importance of circadian rhythms." Nat Rev Mol Cell Biol **21**(2): 67-84.
- Peier, A. M. (2002). "A Heat-Sensitive TRP Channel Expressed in Keratinocytes." Science **296**(5575): 2046-2049.
- Peinado, J. M. and R. D. Myers (1987). "Norepinephrine release from PVN and lateral hypothalamus during perfusion with 2-DG or insulin in the sated and fasted rat." Pharmacology Biochemistry and Behavior **27**(4): 715-721.

- Pekary, A. E., S. A. Stevens and A. Sattin (2006). "Circadian rhythms of TRH-like peptide levels in rat brain." Brain Res **1125**(1): 67-76.
- Pekary, E. and A. Sattin (2017). "TRH and TRH-Like Peptide Levels Co-Vary with Reproductive and Metabolic Rhythms." Horm Metab Res **49**(2): 86-94.
- Perello, M., R. C. Stuart, C. A. Vaslet and E. A. Nillni (2007). "Cold Exposure Increases the Biosynthesis and Proteolytic Processing of Prothyrotropin-Releasing Hormone in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus via β -Adrenoreceptors." Endocrinology **148**(10): 4952-4964.
- Perozzo, R., G. Folkers and L. Scapozza (2004). "Thermodynamics of protein-ligand interactions: history, presence, and future aspects." J Recept Signal Transduct Res **24**(1-2): 1-52.
- Perozzo, R., G. Folkers and L. Scapozza (2004). "Thermodynamics of Protein–Ligand Interactions: History, Presence, and Future Aspects." Journal of Receptors and Signal Transduction **24**(1-2): 1-52.
- Petrovic, S. L., J. K. McDonald, G. D. Snyder and S. M. McCann (1983). "Characterization of β -adrenergic receptors in rat brain and pituitary using a new high-affinity ligand, [125I]iodocyanopindolol." Brain Research **261**(2): 249-259.
- Philippe, J. and C. Dibner (2015). "Thyroid circadian timing: roles in physiology and thyroid malignancies." J Biol Rhythms **30**(2): 76-83.
- Piccione, G., F. Fazio, E. Giudice and R. Refinetti (2009). "Body size and the daily rhythm of body temperature in dogs." Journal of Thermal Biology **34**: 171-175.
- Pierce, K. L. and R. J. Lefkowitz (2001). "Classical and new roles of β -arrestins in the regulation of G-PROTEIN-COUPLED receptors." Nature Reviews Neuroscience **2**(10): 727-733.
- Pincus, D. (2020). Regulation of Hsf1 and the Heat Shock Response. HSF1 and Molecular Chaperones in Biology and Cancer. M. L. Mendillo, D. Pincus and R. Scherz-Shouval. Cham, Springer International Publishing: 41-50.
- Pitcher, J. A., N. J. Freedman and R. J. Lefkowitz (1998). "G protein-coupled receptor kinases." Annu Rev Biochem **67**: 653-692.
- Porro, A., M. Haber, D. Diolaiti, N. Iraci, M. Henderson, S. Gherardi, E. Valli, M. A. Munoz, C. Xue, C. Flemming, M. Schwab, J. H. Wong, G. M. Marshall, G. Della Valle, M. D. Norris and G. Perini (2010). "Direct and coordinate regulation of ATP-binding cassette transporter genes by Myc factors generates specific transcription signatures that significantly affect the chemoresistance phenotype of cancer cells." The Journal of biological chemistry **285**(25): 19532-19543.
- Preußner, M., G. Goldammer, A. Neumann, T. Haltenhof, P. Rautenstrauch, M. Müller-McNicoll and F. Heyd (2017). "Body Temperature Cycles Control Rhythmic Alternative Splicing in Mammals." Mol Cell **67**(3): 433-446.e434.
- Preussner, M. and F. Heyd (2018). "Temperature-controlled Rhythmic Gene Expression in Endothermic Mammals: All Diurnal Rhythms are Equal, but Some are Circadian." Bioessays **40**(7): e1700216.
- Prinzinger, R., A. Preßmar and E. Schleucher (1991). "Body temperature in birds." Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology **99**(4): 499-506.

- Prosser, R. A. and M. U. Gillette (1991). "Cyclic changes in cAMP concentration and phosphodiesterase activity in a mammalian circadian clock studied in vitro." Brain Research **568**(1-2): 185-192.
- Pruitt, K. and C. J. Der (2001). "Ras and Rho regulation of the cell cycle and oncogenesis." Cancer Lett **171**(1): 1-10.
- Pucci, F., M. Dhanani, Y. Dehouck and M. Rooman (2014). "Protein thermostability prediction within homologous families using temperature-dependent statistical potentials." PLoS One **9**(3): e91659.
- Putney, J. W. and T. Tomita (2012). "Phospholipase C signaling and calcium influx." Adv Biol Regul **52**(1): 152-164.
- Qadri, F., F. Rimmele, L. Mallis, W. Häuser, A. Dendorfer, O. Jöhren, P. Dominiak, L. M. Leeb-Lundberg and M. Bader (2016). "Acute hypothalamo-pituitary-adrenal axis response to LPS-induced endotoxemia: expression pattern of kinin type B1 and B2 receptors." Biol Chem **397**(2): 97-109.
- Qadri, F., F. Rimmele, L. Mallis, W. Häuser, A. Dendorfer, O. Jöhren, P. Dominiak, L. M. F. Leeb-Lundberg and M. Bader (2016). "Acute hypothalamo-pituitary-adrenal axis response to LPS-induced endotoxemia: expression pattern of kinin type B1 and B2 receptors." Biological Chemistry **397**(2): 97-109.
- Qi, L., M. Saberi, E. Zmuda, Y. Wang, J. Altarejos, X. Zhang, R. Dentin, S. Hedrick, G. Bandyopadhyay, T. Hai, J. Olefsky and M. Montminy (2009). "Adipocyte CREB promotes insulin resistance in obesity." Cell metabolism **9**(3): 277-286.
- Qian, J. and F. A. J. L. Scheer (2016). "Circadian System and Glucose Metabolism: Implications for Physiology and Disease." Trends in Endocrinology & Metabolism **27**(5): 282-293.
- Qiang, X., W. L. Yang, R. Wu, M. Zhou, A. Jacob, W. Dong, M. Kuncewitch, Y. Ji, H. Yang, H. Wang, J. Fujita, J. Nicastro, G. F. Coppa, K. J. Tracey and P. Wang (2013). "Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) triggers inflammatory responses in hemorrhagic shock and sepsis." Nat Med **19**(11): 1489-1495.
- Qin, C., J. Li and K. Tang (2018). "The Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus: Development, Function, and Human Diseases." Endocrinology **159**(9): 3458-3472.
- Quinn, P. (1988). "Effects of temperature on cell membranes." Symposia of the Society for Experimental Biology **42**: 237-258.
- Rage, F., J.-B. Lazaro, A. Benyassi, S. Arancibia and L. Tapia-Arancibia (1994). "Rapid Changes in Somatostatin and TRH mRNA in Whole Rat Hypothalamus in Response to Acute Cold Exposure." Journal of Neuroendocrinology **6**(1): 19-23.
- Raha, K. and K. M. Merz (2005). Chapter 9 Calculating Binding Free Energy in Protein–Ligand Interaction. Annual Reports in Computational Chemistry, Elsevier. **1**: 113-130.
- Raidoo, D. M. and K. D. Bhoola (1997). "Kinin receptors on human neurones." J Neuroimmunol **77**(1): 39-44.
- Rainbow, T. C., B. Parsons and B. B. Wolfe (1984). "Quantitative autoradiography of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors in rat brain." Proceedings of the National Academy of Sciences **81**(5): 1585-1589.

- Ramsey, I. S., M. Delling and D. E. Clapham (2006). "An introduction to TRP channels." Annu Rev Physiol **68**: 619-647.
- Rasmussen, S. G. F., H.-J. Choi, J. J. Fung, E. Pardon, P. Casarosa, P. S. Chae, B. T. Devree, D. M. Rosenbaum, F. S. Thian, T. S. Kobilka, A. Schnapp, I. Konetzki, R. K. Sunahara, S. H. Gellman, A. Pautsch, J. Steyaert, W. I. Weis and B. K. Kobilka (2011). "Structure of a nanobody-stabilized active state of the β_2 adrenoceptor." Nature **469**(7329): 175-180.
- Ravnskjaer, K., A. Madiraju and M. Montminy (2016). "Role of the cAMP Pathway in Glucose and Lipid Metabolism." Handb Exp Pharmacol **233**: 29-49.
- Rawlings, J. S., K. M. Rosler and D. A. Harrison (2004). "The JAK/STAT signaling pathway." Journal of cell science **117**(8): 1281-1283.
- Rawlings, J. S., K. M. Rosler and D. A. Harrison (2004). "The JAK/STAT signaling pathway." J Cell Sci **117**(Pt 8): 1281-1283.
- Refinetti, R. (2010). "The circadian rhythm of body temperature." Front Biosci (Landmark Ed) **15**: 564-594.
- Refinetti, R. (2010). "The circadian rhythm of body temperature." Frontiers in Bioscience **15**(1): 564.
- Refinetti, R. (2010). "Entrainment of circadian rhythm by ambient temperature cycles in mice." J Biol Rhythms **25**(4): 247-256.
- Refinetti, R. (2015). "Comparison of light, food, and temperature as environmental synchronizers of the circadian rhythm of activity in mice." J Physiol Sci **65**(4): 359-366.
- Refinetti, R. and M. Menaker (1992). "The circadian rhythm of body temperature." Physiol Behav **51**(3): 613-637.
- Reichlin, S. (1967). "Function of the hypothalamus." Am J Med **43**(4): 477-485.
- Reinke, H., C. Saini, F. Fleury-Olela, C. Dibner, I. J. Benjamin and U. Schibler (2008). "Differential display of DNA-binding proteins reveals heat-shock factor 1 as a circadian transcription factor." Genes & Development **22**(3): 331-345.
- Reitman, M. L. (2018). "Of mice and men - environmental temperature, body temperature, and treatment of obesity." FEBS Lett **592**(12): 2098-2107.
- Reppert, S. M. and D. R. Weaver (2001). "Molecular analysis of mammalian circadian rhythms." Annu Rev Physiol **63**: 647-676.
- Richter, K., M. Haslbeck and J. Buchner (2010). "The heat shock response: life on the verge of death." Mol Cell **40**(2): 253-266.
- Ridge, K. D. and K. Palczewski (2007). "Visual rhodopsin sees the light: structure and mechanism of G protein signaling." J Biol Chem **282**(13): 9297-9301.
- Rijo-Ferreira, F. and J. S. Takahashi (2019). "Genomics of circadian rhythms in health and disease." Genome Med **11**(1): 82.
- Rindler, M. J., M. M. Bashor, N. Spitzer and M. H. Saier, Jr. (1978). "Regulation of adenosine 3':5'-monophosphate efflux from animal cells." J Biol Chem **253**(15): 5431-5436.

- Roberts, S. J., P. Molenaar and R. J. Summers (1993). "Characterization of propranolol-resistant (-)-[125I]-cyanopindolol binding sites in rat soleus muscle." British Journal of Pharmacology **109**(2): 344-352.
- Roenneberg, T., T. Kuehnle, M. Juda, T. Kantermann, K. Allebrandt, M. Gordijn and M. Merrow (2007). "Epidemiology of the human circadian clock." Sleep Med Rev **11**(6): 429-438.
- Roessingh, S., M. Rosing, M. Marunova, M. Ogueta, R. George, A. Lamaze and R. Stanewsky (2019). "Temperature synchronization of the *Drosophila* circadian clock protein PERIOD is controlled by the TRPA channel PYREXIA." Communications Biology **2**(1): 246.
- Roilo, M., M. K. Kullmann and L. Hengst (2018). "Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) induces translation of the cell-cycle inhibitor p27Kip1." Nucleic Acids Res **46**(6): 3198-3210.
- Rojanathammanee, L., E. B. Harmon, L. A. Grisanti, P. Govitrapong, M. Ebadi, B. D. Grove, M. Miyagi and J. E. Porter (2009). "The 27-kDa Heat Shock Protein Confers Cytoprotective Effects through a β 2-Adrenergic Receptor Agonist-Initiated Complex with β -Arrestin." Molecular Pharmacology **75**(4): 855-865.
- Romanovsky, A. A. (2014). "Skin temperature: its role in thermoregulation." Acta Physiol (Oxf) **210**(3): 498-507.
- Romanovsky, A. A. (2018). "The thermoregulation system and how it works." Handb Clin Neurol **156**: 3-43.
- Rose, S. R. and B. C. Nisula (1989). "Circadian variation of thyrotropin in childhood." J Clin Endocrinol Metab **68**(6): 1086-1090.
- Rosenbaum, D. M., S. G. F. Rasmussen and B. K. Kobilka (2009). "The structure and function of G-protein-coupled receptors." Nature **459**(7245): 356-363.
- Rosin, J. M. and D. M. Kurrasch (2019). "Emerging roles for hypothalamic microglia as regulators of physiological homeostasis." Front Neuroendocrinol **54**: 100748.
- Roy, A. F., Y. Benomar, V. Bailleux, C. M. Vacher, A. Aubourg, A. Gertler, J. Djiane and M. Taouis (2007). "Lack of cross-desensitization between leptin and prolactin signaling pathways despite the induction of suppressor of cytokine signaling 3 and PTP-1B." J Endocrinol **195**(2): 341-350.
- Ruby, N. F., D. E. Burns and H. C. Heller (1999). "Circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus are temperature-compensated and phase-shifted by heat pulses in vitro." J Neurosci **19**(19): 8630-8636.
- Russell, W., R. F. Harrison, N. Smith, K. Darzy, S. Shalet, A. P. Weetman and R. J. Ross (2008). "Free Triiodothyronine Has a Distinct Circadian Rhythm That Is Delayed but Parallels Thyrotropin Levels." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **93**(6): 2300-2306.
- Sadana, R. and C. W. Dessauer (2009). "Physiological Roles for G Protein-Regulated Adenylyl Cyclase Isoforms: Insights from Knockout and Overexpression Studies." Neurosignals **17**(1): 5-22.

- Sahu, A. (2011). "Intracellular Leptin-Signaling Pathways in Hypothalamic Neurons: The Emerging Role of Phosphatidylinositol-3 Kinase-Phosphodiesterase-3B-cAMP Pathway." Neuroendocrinology **93**(4): 201-210.
- Saikia, S., M. Bordoloi and R. Sarmah (2019). "Established and In-trial GPCR Families in Clinical Trials: A Review for Target Selection." Curr Drug Targets **20**(5): 522-539.
- Saini, C., J. Morf, M. Stratmann, P. Gos and U. Schibler (2012). "Simulated body temperature rhythms reveal the phase-shifting behavior and plasticity of mammalian circadian oscillators." Genes & Development **26**(6): 567-580.
- Saito, S. and M. Tominaga (2015). "Functional diversity and evolutionary dynamics of thermoTRP channels." Cell Calcium **57**(3): 214-221.
- Sajib, M., E. Albers, M. Langeland and I. Undeland (2020). "Understanding the effect of temperature and time on protein degree of hydrolysis and lipid oxidation during ensilaging of herring (*Clupea harengus*) filleting co-products." Sci Rep **10**(1): 9590.
- Sakamoto, K., K. Karelina and K. Obrietan (2011). "CREB: a multifaceted regulator of neuronal plasticity and protection." Journal of neurochemistry **116**(1): 1-9.
- Sakamoto, T. and D. A. Bryant (1997). "Temperature-regulated mRNA accumulation and stabilization for fatty acid desaturase genes in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002." Mol Microbiol **23**(6): 1281-1292.
- Salomon, Y., C. Londos and M. Rodbell (1974). "A highly sensitive adenylate cyclase assay." Analytical Biochemistry **58**(2): 541-548.
- Samanta, A., T. E. T. Hughes and V. Y. Moiseenkova-Bell (2018). "Transient Receptor Potential (TRP) Channels." Subcell Biochem **87**: 141-165.
- Sarkar, S., G. Légrádi and R. M. Lechan (2002). "Intracerebroventricular administration of alpha-melanocyte stimulating hormone increases phosphorylation of CREB in TRH- and CRH-producing neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus." Brain Res **945**(1): 50-59.
- Sassi, Y., A. Abi-Gerges, J. Fauconnier, N. Mougenot, S. Reiken, K. Haghighi, E. G. Kranias, A. R. Marks, A. Lacampagne, S. Engelhardt, S. N. Hatem, A. M. Lompre and J. S. Hulot (2012). "Regulation of cAMP homeostasis by the efflux protein MRP4 in cardiac myocytes." The FASEB Journal **26**(3): 1009-1017.
- Sassi, Y., L. Lipskaia, G. Vandecasteele, V. O. Nikolaev, S. N. Hatem, F. Cohen Aubart, F. G. Russel, N. Mougenot, C. Vrignaud, P. Lechat, A.-M. Lompré and J.-S. Hulot (2008). "Multidrug resistance-associated protein 4 regulates cAMP-dependent signaling pathways and controls human and rat SMC proliferation." The Journal of Clinical Investigation **118**(8): 2747-2757.
- Sassone-Corsi, P. (2012). "The Cyclic AMP Pathway." Cold Spring Harbor Perspectives in Biology **4**(12): a011148-a011148.
- Sawchenko, P. E., L. W. Swanson, R. Grzanna, P. R. Howe, S. R. Bloom and J. M. Polak (1985). "Colocalization of neuropeptide Y immunoreactivity in brainstem catecholaminergic neurons that project to the paraventricular nucleus of the hypothalamus." J Comp Neurol **241**(2): 138-153.

- Scheer, F. A. J. L., M. F. Hilton, C. S. Mantzoros and S. A. Shea (2009). "Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment." Proceedings of the National Academy of Sciences **106**(11): 4453-4458.
- Schibler, U., I. Gotic, C. Saini, P. Gos, T. Curie, Y. Emmenegger, F. Sinturel, P. Gosselin, A. Gerber and F. Fleury-Olela (2015). Clock-talk: interactions between central and peripheral circadian oscillators in mammals. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schibler, U., I. Gotic, C. Saini, P. Gos, T. Curie, Y. Emmenegger, F. Sinturel, P. Gosselin, A. Gerber, F. Fleury-Olela, G. Rando, M. Demarque and P. Franken (2015). "Clock-Talk: Interactions between Central and Peripheral Circadian Oscillators in Mammals." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **80**: 223-232.
- Schimmer, B. P. and A. E. Zimmerman (1976). "Steroidogenesis and extracellular cAMP accumulation in adrenal tumor cell cultures." Mol Cell Endocrinol **4**(4): 263-270.
- Schlader, Z. J. and N. T. Vargas (2019). "Regulation of Body Temperature by Autonomic and Behavioral Thermoeffectors." Exerc Sport Sci Rev **47**(2): 116-126.
- Schmidt, M., I. Cattani-Cavaleri, F. J. Nuñez and R. S. Ostrom (2020). "Phosphodiesterase isoforms and cAMP compartments in the development of new therapies for obstructive pulmonary diseases." Curr Opin Pharmacol **51**: 34-42.
- Schulte, G. and B. B. Fredholm (2003). "Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases." Cell Signal **15**(9): 813-827.
- Schwartz, M. W., S. C. Woods, D. Porte, Jr., R. J. Seeley and D. G. Baskin (2000). "Central nervous system control of food intake." Nature **404**(6778): 661-671.
- Scicli, A. G. and O. A. Carretero (1986). "Renal kallikrein-kinin system." Kidney Int **29**(1): 120-130.
- Screaton, R. A., M. D. Conkright, Y. Katoh, J. L. Best, G. Canettieri, S. Jeffries, E. Guzman, S. Niessen, J. R. Yates, 3rd, H. Takemori, M. Okamoto and M. Montminy (2004). "The CREB coactivator TORC2 functions as a calcium- and cAMP-sensitive coincidence detector." Cell **119**(1): 61-74.
- Seamon, K. B. and J. W. Daly (1986). "Forskolin: its biological and chemical properties." Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res **20**: 1-150.
- Secher, A., J. Jelsing, A. F. Baquero, J. Hecksher-Sørensen, M. A. Cowley, L. S. Dalbøge, G. Hansen, K. L. Grove, C. Pyke, K. Raun, L. Schäffer, M. Tang-Christensen, S. Verma, B. M. Witgen, N. Vrang and L. Bjerre Knudsen (2014). "The arcuate nucleus mediates GLP-1 receptor agonist liraglutide-dependent weight loss." J Clin Invest **124**(10): 4473-4488.
- Serin, Y. and N. Acar Tek (2019). "Effect of Circadian Rhythm on Metabolic Processes and the Regulation of Energy Balance." Ann Nutr Metab **74**(4): 322-330.
- Shaywitz, A. J., S. L. Dove, J. M. Kornhauser, A. Hochschild and M. E. Greenberg (2000). "Magnitude of the CREB-dependent transcriptional response is determined by the strength of the interaction between the kinase-inducible domain of CREB and the KIX domain of CREB-binding protein." Mol Cell Biol **20**(24): 9409-9422.

- Shaywitz, A. J. and M. E. Greenberg (1999). "CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals." Annu Rev Biochem **68**: 821-861.
- Sheng, M., M. Thompson and M. Greenberg (1991). "CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases." Science **252**(5011): 1427-1430.
- Shepard, A. M., A. Bharwani, Z. Durisko and P. W. Andrews (2016). "Reverse Engineering the Febrile System." Q Rev Biol **91**(4): 419-457.
- Shigetomi, E., E. A. Bushong, M. D. Haustein, X. Tong, O. Jackson-Weaver, S. Kracun, J. Xu, M. V. Sofroniew, M. H. Ellisman and B. S. Khakh (2013). "Imaging calcium microdomains within entire astrocyte territories and endfeet with GCaMPs expressed using adeno-associated viruses." J Gen Physiol **141**(5): 633-647.
- Shiina, T. and Y. Shimizu (2020). "Temperature-Dependent Alternative Splicing of Precursor mRNAs and Its Biological Significance: A Review Focused on Post-Transcriptional Regulation of a Cold Shock Protein Gene in Hibernating Mammals." Int J Mol Sci **21**(20).
- Shimomura, O., F. H. Johnson and H. Morise (1974). "Mechanism of the luminescent intramolecular reaction of aequorin." Biochemistry **13**(16): 3278-3286.
- Shinohara, Y., Y. M. Koyama, M. Ukai-Tadenuma, T. Hirokawa, M. Kikuchi, R. G. Yamada, H. Ukai, H. Fujishima, T. Umehara, K. Tainaka and H. R. Ueda (2017). "Temperature-Sensitive Substrate and Product Binding Underlie Temperature-Compensated Phosphorylation in the Clock." Mol Cell **67**(5): 783-798.e720.
- Silva, J. E. (1995). "Thyroid hormone control of thermogenesis and energy balance." Thyroid **5**(6): 481-492.
- Silva, J. E. (2001). "The multiple contributions of thyroid hormone to heat production." The Journal of clinical investigation **108**(1): 35-37.
- Silva, J. E. (2003). "The thermogenic effect of thyroid hormone and its clinical implications." Ann Intern Med **139**(3): 205-213.
- Silverman, A. J., D. L. Hoffman and E. A. Zimmerman (1981). "The descending afferent connections of the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN)." Brain Res Bull **6**(1): 47-61.
- Sin, Y. Y., H. V. Edwards, X. Li, J. P. Day, F. Christian, A. J. Dunlop, D. R. Adams, M. Zaccolo, M. D. Houslay and G. S. Baillie (2011). "Disruption of the cyclic AMP phosphodiesterase-4 (PDE4)-HSP20 complex attenuates the β -agonist induced hypertrophic response in cardiac myocytes." J Mol Cell Cardiol **50**(5): 872-883.
- Singh, S., T. G. Singh and A. K. Rehni (2020). "An Insight into Molecular Mechanisms and Novel Therapeutic Approaches in Epileptogenesis." CNS Neurol Disord Drug Targets **19**(10): 750-779.
- Smith, B. J. (1984). SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. Proteins. J. M. Walker. Totowa, NJ, Humana Press: 41-55.
- Smith, J. E., A. L. Barnes and S. K. Maloney (2006). "A nonsurgical method allowing continuous core temperature monitoring in mares for extended periods, including during endurance exercise." Equine Veterinary Journal **38**(S36): 65-69.

Smrcka, A. V. (2008). "G protein $\beta\gamma$ subunits: central mediators of G protein-coupled receptor signaling." Cell Mol Life Sci **65**(14): 2191-2214.

Smrcka, A. V. and I. Fisher (2019). "G-protein $\beta\gamma$ subunits as multi-functional scaffolds and transducers in G-protein-coupled receptor signaling." Cell Mol Life Sci **76**(22): 4447-4459.

So, A. Y., T. U. Bernal, M. L. Pillsbury, K. R. Yamamoto and B. J. Feldman (2009). "Glucocorticoid regulation of the circadian clock modulates glucose homeostasis." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(41): 17582-17587.

Sohn, J.-W. (2015). "Network of hypothalamic neurons that control appetite." BMB reports **48**(4): 229-233.

Sohn, J. W. (2015). "Network of hypothalamic neurons that control appetite." BMB Rep **48**(4): 229-233.

Solomonson, A. and E. M. Mills (2016). "Uncoupling Proteins and the Molecular Mechanisms of Thyroid Thermogenesis." Endocrinology **157**(2): 455-462.

Somero, G. N. (1995). "Proteins and temperature." Annu Rev Physiol **57**: 43-68.

Sommerville, J. (1999). "Activities of cold-shock domain proteins in translation control." Bioessays **21**(4): 319-325.

Song, K., H. Wang, G. B. Kamm, J. Pohle, F. D. C. Reis, P. Heppenstall, H. Wende and J. Siemens (2016). "The TRPM2 channel is a hypothalamic heat sensor that limits fever and can drive hypothermia." Science **353**(6306): 1393-1398.

Song, R. S., B. Massenburg, W. Wenderski, V. Jayaraman, L. Thompson and S. R. Neves (2013). "ERK regulation of phosphodiesterase 4 enhances dopamine-stimulated AMPA receptor membrane insertion." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(38): 15437-15442.

Soni, H. and A. Adebisi (2016). "TRPC6 channel activation promotes neonatal glomerular mesangial cell apoptosis via calcineurin/NFAT and FasL/Fas signaling pathways." Scientific Reports **6**(1): 29041.

Sotelo-Rivera, I., A. Cote-Vélez, R. M. Uribe, J. L. Charli and P. Joseph-Bravo (2017). "Glucocorticoids curtail stimuli-induced CREB phosphorylation in TRH neurons through interaction of the glucocorticoid receptor with the catalytic subunit of protein kinase A." Endocrine **55**(3): 861-871.

Spengler, C. M. and S. A. Shea (2000). "Endogenous circadian rhythm of pulmonary function in healthy humans." American journal of respiratory and critical care medicine **162**(3): 1038-1046.

Steiner, D., D. Saya, E. Schallmach, W. F. Simonds and Z. Vogel (2006). "Adenylyl cyclase type-VIII activity is regulated by G($\beta\gamma$) subunits." Cell Signal **18**(1): 62-68.

Stephan, F. K. and I. Zucker (1972). "Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions." Proc Natl Acad Sci U S A **69**(6): 1583-1586.

Stetson, M. H. and M. Watson-Whitmyre (1976). "Nucleus suprachiasmaticus: the biological clock in the hamster?" Science **191**(4223): 197-199.

- Stoof, J. C. and J. W. Kebabian (1981). "Opposing roles for D-1 and D-2 dopamine receptors in efflux of cyclic AMP from rat neostriatum." Nature **294**(5839): 366-368.
- Strader, C. D., M. R. Candelore, W. S. Hill, I. S. Sigal and R. A. Dixon (1989). "Identification of two serine residues involved in agonist activation of the beta-adrenergic receptor." J Biol Chem **264**(23): 13572-13578.
- Strader, C. D., I. S. Sigal, M. R. Candelore, E. Rands, W. S. Hill and R. A. Dixon (1988). "Conserved aspartic acid residues 79 and 113 of the beta-adrenergic receptor have different roles in receptor function." J Biol Chem **263**(21): 10267-10271.
- Strange, P. G. (2010). "Use of the GTP γ S ([³⁵S]GTP γ S and Eu-GTP γ S) binding assay for analysis of ligand potency and efficacy at G protein-coupled receptors." British journal of pharmacology **161**(6): 1238-1249.
- Strosberg, A. D. (1993). "Structure, function, and regulation of adrenergic receptors." Protein Science **2**(8): 1198-1209.
- Sugasawa, T., M. Matsuzaki-Fujita, J.-L. Guillaume, L. Camoin, S. Morooka and A. Strosberg (1997). "Characterization of a Novel Iodocyanopindolol and SM-11044 Binding Protein, Which May Mediate Relaxation of Depolarized Rat Colon Tonus." The Journal of biological chemistry **272**: 21244-21252.
- Sulli, G., E. N. C. Manoogian, P. R. Taub and S. Panda (2018). "Training the Circadian Clock, Clocking the Drugs, and Drugging the Clock to Prevent, Manage, and Treat Chronic Diseases." Trends Pharmacol Sci **39**(9): 812-827.
- Sun, P. and R. A. Maurer (1995). "An Inactivating Point Mutation Demonstrates That Interaction of cAMP Response Element Binding Protein (CREB) with the CREB Binding Protein Is Not Sufficient for Transcriptional Activation (*)." Journal of Biological Chemistry **270**(13): 7041-7044.
- Sun, W., A. P. Bergemeier, Y. Liao, S. Wu and L. Tong (2020). "CIRP Sensitizes Cancer Cell Responses to Ionizing Radiation." Radiat Res.
- Sund-Levander, M., C. Forsberg and L. K. Wahren (2002). "Normal oral, rectal, tympanic and axillary body temperature in adult men and women: a systematic literature review." Scandinavian Journal of Caring Sciences **16**(2): 122-128.
- Sundar, I. K., H. Yao, M. T. Sellix and I. Rahman (2015). "Circadian molecular clock in lung pathophysiology." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **309**(10): L1056-1075.
- Sutkowski, E. M., W. J. Tang, C. W. Broome, J. D. Robbins and K. B. Seamon (1994). "Regulation of forskolin interactions with type I, II, V, and VI adenylyl cyclases by Gs alpha." Biochemistry **33**(43): 12852-12859.
- Suzuki, K., K. A. Simpson, J. S. Minnion, J. C. Shillito and S. R. Bloom (2010). "The role of gut hormones and the hypothalamus in appetite regulation." Endocr J **57**(5): 359-372.
- Swope, D. L., C. L. Mueller and J. C. Chrivia (1996). "CREB-binding Protein Activates Transcription through Multiple Domains." Journal of Biological Chemistry **271**(45): 28138-28145.
- Tamotsu, S., C. Schomerus, J. R. H. Stehle, P. H. Roseboom and H.-W. Korf (1995). "Norepinephrine-induced phosphorylation of the transcription factor CREB in isolated

- rat pinealocytes: an immunocytochemical study." Cell & Tissue Research **282**(2): 219-226.
- Tan, C. H. and P. A. McNaughton (2016). "The TRPM2 ion channel is required for sensitivity to warmth." Nature **536**(7617): 460-463.
- Tanaka, H., M. Yanase and T. Nakayama (1988). "Body temperature regulation in rats during exercise of various intensities at different ambient temperatures." Jpn J Physiol **38**(2): 167-177.
- Tang, W. J. and A. G. Gilman (1991). "Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein beta gamma subunits." Science **254**(5037): 1500-1503.
- Tauber, E. and C. P. Kyriacou (2005). "Molecular evolution and population genetics of circadian clock genes." Methods Enzymol **393**: 797-817.
- Taussig, R., W. J. Tang, J. R. Hepler and A. G. Gilman (1994). "Distinct patterns of bidirectional regulation of mammalian adenylyl cyclases." J Biol Chem **269**(8): 6093-6100.
- Tesmer, J. J. (1999). "Two-Metal-Ion Catalysis in Adenylyl Cyclase." Science **285**(5428): 756-760.
- Tesmer, J. J., R. K. Sunahara, A. G. Gilman and S. R. Sprang (1997). "Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G α .GTP γ S." Science **278**(5345): 1907-1916.
- Thieringer, H. A., P. G. Jones and M. Inouye (1998). "Cold shock and adaptation." Bioessays **20**(1): 49-57.
- Thompson, M. A., D. D. Ginty, A. Bonni and M. E. Greenberg (1995). "L-type voltage-sensitive Ca²⁺ channel activation regulates c-fos transcription at multiple levels." J Biol Chem **270**(9): 4224-4235.
- Thosar, S. S., M. P. Butler and S. A. Shea (2018). "Role of the circadian system in cardiovascular disease." J Clin Invest **128**(6): 2157-2167.
- Tibbo, A. J. and G. S. Baillie (2020). "Phosphodiesterase 4B: Master Regulator of Brain Signaling." Cells **9**(5): 1254.
- Timofeeva, E., A. Caron and D. Richard (2017). Energy Homeostasis: Paraventricular Nucleus System☆. Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology, Elsevier.
- Töle, J. C., M. Behrens and W. Meyerhof (2019). "Taste receptor function." Handb Clin Neurol **164**: 173-185.
- Tolkovsky, A. M. and H. S. Suidan (1987). "Adenosine 5'-triphosphate synthesis and metabolism localized in neurites of cultured sympathetic neurons." Neuroscience **23**(3): 1133-1142.
- Tomilin, V., M. Mamenko, O. Zaika and O. Pochynyuk (2016). "Role of renal TRP channels in physiology and pathology." Semin Immunopathol **38**(3): 371-383.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4354.

- Triantafyllou, G. A., S. A. Paschou and C. S. Mantzoros (2016). "Leptin and Hormones: Energy Homeostasis." Endocrinol Metab Clin North Am **45**(3): 633-645.
- Trivedi, S. and M. Starz-Gaiano (2018). "Drosophila Jak/STAT Signaling: Regulation and Relevance in Human Cancer and Metastasis." Int J Mol Sci **19**(12).
- Tsong, T. Y. (1991). "Electroporation of cell membranes." Biophys J **60**(2): 297-306.
- Tsuchiya, Y., M. Akashi and E. Nishida (2003). "Temperature compensation and temperature resetting of circadian rhythms in mammalian cultured fibroblasts." Genes Cells **8**(8): 713-720.
- Tulsian, N. K., A. Ghode and G. S. Anand (2020). "Adenylate control in cAMP signaling: implications for adaptation in signalosomes." Biochem J **477**(16): 2981-2998.
- Tyagi, M. G., R. K. Handa, P. M. Stephen and J. S. Bapna (1998). "Vasopressin induces dopamine release and cyclic AMP efflux from the brain of water-deprived rats: inhibitory effect of vasopressin V2 receptor-mediated phosphorylation." Biol Signals Recept **7**(6): 328-336.
- Uchida, K., K. Dezaki, B. Damdindorj, H. Inada, T. Shiuchi, Y. Mori, T. Yada, Y. Minokoshi and M. Tominaga (2011). "Lack of TRPM2 Impaired Insulin Secretion and Glucose Metabolisms in Mice." Diabetes **60**(1): 119-126.
- Uribe, R. M., J. L. Redondo, J. L. Charli and P. Joseph-Bravo (1993). "Suckling and cold stress rapidly and transiently increase TRH mRNA in the paraventricular nucleus." Neuroendocrinology **58**(1): 140-145.
- Valassi, E., M. Scacchi and F. Cavagnini (2008). "Neuroendocrine control of food intake." Nutr Metab Cardiovasc Dis **18**(2): 158-168.
- van Bruggen, I., T. A. Robertson and J. M. Papadimitriou (1991). "The effect of mild hyperthermia on the morphology and function of murine resident peritoneal macrophages." Exp Mol Pathol **55**(2): 119-134.
- Vandewauw, I., K. De Clercq, M. Mulier, K. Held, S. Pinto, N. Van Ranst, A. Segal, T. Voet, R. Vennekens, K. Zimmermann, J. Vriens and T. Voets (2018). "A TRP channel trio mediates acute noxious heat sensing." Nature **555**(7698): 662-666.
- Vansomeren, E. J. W. (2000). "More than a marker: interaction between the circadian regulation of temperature and sleep, age-related changes, and treatment possibilities." Chronobiology International **17**(3): 313-354.
- Venugopalan, V. V., Z. Ghali, J. Sénécal, T. A. Reader and L. Descarries (2006). "Catecholaminergic activation of G-protein coupling in rat spinal cord: Further evidence for the existence of dopamine and noradrenaline receptors in spinal grey and white matter." Brain Research **1070**(1): 90-100.
- Vicario, P. P., M. R. Candelore, M.-T. Schaeffer, L. Kelly, G. M. Thompson, E. J. Brady, R. Saperstein, D. E. MacIntyre, L. M. Tota and M. A. Cascieri (1998). "Desensitization of β 3-adrenergic receptor- stimulated adenylyl cyclase activity and lipolysis in rats." Life Sciences **62**(7): 627-638.
- Villarino, A. V., Y. Kanno and J. J. O'Shea (2017). "Mechanisms and consequences of Jak-STAT signaling in the immune system." Nat Immunol **18**(4): 374-384.

Vinkers, C. H., R. Penning, J. Hellhammer, J. C. Verster, J. H. Klaessens, B. Olivier and C. J. Kalkman (2013). "The effect of stress on core and peripheral body temperature in humans." Stress **16**(5): 520-530.

Voets, T., A. Janssens, G. Droogmans and B. Nilius (2004). "Outer pore architecture of a Ca²⁺-selective TRP channel." J Biol Chem **279**(15): 15223-15230.

von Wegner, F., N. Wieder and R. H. Fink (2012). "Simulation strategies for calcium microdomains and calcium-regulated calcium channels." Adv Exp Med Biol **740**: 553-567.

Vriens, J. and T. Voets (2018). "Sensing the heat with TRPM3." Pflügers Archiv - European Journal of Physiology **470**(5): 799-807.

Wallukat, G. (2002). "The beta-adrenergic receptors." Herz **27**(7): 683-690.

Wang, J., C. Gareri and H. A. Rockman (2018). "G-Protein–Coupled Receptors in Heart Disease." Circulation Research **123**(6): 716-735.

Warne, T., P. C. Edwards, A. S. Doré, A. G. W. Leslie and C. G. Tate (2019). "Molecular basis for high-affinity agonist binding in GPCRs." Science **364**(6442): 775-778.

Watanabe, N., M. Piché and H. Hotta (2015). "Types of skin afferent fibers and spinal opioid receptors that contribute to touch-induced inhibition of heart rate changes evoked by noxious cutaneous heat stimulation." Mol Pain **11**: 4.

Waterhouse, J., B. Drust, D. Weinert, B. Edwards, W. Gregson, G. Atkinson, S. Kao, S. Aizawa and T. Reilly (2005). "The Circadian Rhythm of Core Temperature: Origin and some Implications for Exercise Performance." Chronobiology International **22**(2): 207-225.

Waters, L., M. P. Padula, D. C. Marks and L. Johnson (2020). "Calcium chelation: a novel approach to reduce cryopreservation-induced damage to frozen platelets." Transfusion **60**(7): 1552-1563.

Wayman, G. A., S. Impey and D. R. Storm (1995). "Ca²⁺ Inhibition of Type III Adenylyl Cyclase in Vivo(*)." Journal of Biological Chemistry **270**(37): 21480-21486.

Wehrens, S. M. T., S. Christou, C. Isherwood, B. Middleton, M. A. Gibbs, S. N. Archer, D. J. Skene and J. D. Johnston (2017). "Meal Timing Regulates the Human Circadian System." Curr Biol **27**(12): 1768-1775.e1763.

Wei, J., G. Wayman and D. R. Storm (1996). "Phosphorylation and Inhibition of Type III Adenylyl Cyclase by Calmodulin-dependent Protein Kinase II in Vivo *." Journal of Biological Chemistry **271**(39): 24231-24235.

Weiland, G. A., K. P. Minneman and P. B. Molinoff (1979). "Fundamental difference between the molecular interactions of agonists and antagonists with the β -adrenergic receptor." Nature **281**(5727): 114-117.

Weiland, G. A., K. P. Minneman and P. B. MOLINOFF (1980). "Thermodynamics of Agonist and Antagonist Interactions with Mammalian β -Adrenergic Receptors." Molecular Pharmacology **18**(3): 341-347.

Weis, W. I. and B. K. Kobilka (2018). "The Molecular Basis of G Protein–Coupled Receptor Activation." Annual Review of Biochemistry **87**(1): 897-919.

- Welsh, D. K., J. S. Takahashi and S. A. Kay (2010). "Suprachiasmatic Nucleus: Cell Autonomy and Network Properties." Annual Review of Physiology **72**(1): 551-577.
- Wen, A. Y., K. M. Sakamoto and L. S. Miller (2010). "The role of the transcription factor CREB in immune function." Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) **185**(11): 6413-6419.
- White, M. D., C. M. Bosio, B. N. Duplantis and F. E. Nano (2011). "Human body temperature and new approaches to constructing temperature-sensitive bacterial vaccines." Cell Mol Life Sci **68**(18): 3019-3031.
- Wieland, K., H. M. Zuurmond, C. Krasel, A. P. Ijzerman and M. J. Lohse (1996). "Involvement of Asn-293 in stereospecific agonist recognition and in activation of the beta 2-adrenergic receptor." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**(17): 9276-9281.
- Wielinga, P. R., I. Van Der Heijden, G. Reid, J. H. Beijnen, J. Wijnholds and P. Borst (2003). "Characterization of the MRP4- and MRP5-mediated Transport of Cyclic Nucleotides from Intact Cells." Journal of Biological Chemistry **278**(20): 17664-17671.
- Wilk-Blaszczak, M. A., S. Gutowski, P. C. Sternweis and F. Belardetti (1994). "Bradykinin modulates potassium and calcium currents in neuroblastoma hybrid cells via different pertussis toxin-insensitive pathways." Neuron **12**(1): 109-116.
- Willoughby, D. (2012). "Organization of cAMP signalling microdomains for optimal regulation by Ca²⁺ entry." Biochem Soc Trans **40**(1): 246-250.
- Winger, J. A., E. R. Derbyshire, M. H. Lamers, M. A. Marletta and J. Kuriyan (2008). "The crystal structure of the catalytic domain of a eukaryotic guanylate cyclase." BMC Structural Biology **8**(1): 42.
- Wittes, J. and T. Schüpbach (2019). "A Gene Expression Screen in *Drosophila melanogaster* Identifies Novel JAK/STAT and EGFR Targets During Oogenesis." G3 (Bethesda) **9**(1): 47-60.
- Woldeyes, M. A., W. Qi, V. I. Razinkov, E. M. Furst and C. J. Roberts (2020). "Temperature Dependence of Protein Solution Viscosity and Protein-Protein Interactions: Insights into the Origins of High-Viscosity Protein Solutions." Molecular Pharmaceutics **17**(12): 4473-4482.
- Wong, S. K., E. M. Parker and E. M. Ross (1990). "Chimeric muscarinic cholinergic: beta-adrenergic receptors that activate Gs in response to muscarinic agonists." J Biol Chem **265**(11): 6219-6224.
- Woo, Y. T. and J. F. Manery (1973). "Cyclic AMP phosphodiesterase activity at the external surface of intact skeletal muscles and stimulation of the enzyme by insulin." Arch Biochem Biophys **154**(2): 510-519.
- Worthington, W. C., Jr. (1955). "Some observations on the hypophyseal portal system in the living mouse." Bull Johns Hopkins Hosp **97**(5): 343-357.
- Wu, H., S. Dunnett, Y. S. Ho and R. C. Chang (2019). "The role of sleep deprivation and circadian rhythm disruption as risk factors of Alzheimer's disease." Front Neuroendocrinol **54**: 100764.
- Wu, J., P. Cohen and B. M. Spiegelman (2013). "Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown?" Genes Dev **27**(3): 234-250.

Wulff, K., S. Gatti, J. G. Wettstein and R. G. Foster (2010). "Sleep and circadian rhythm disruption in psychiatric and neurodegenerative disease." Nat Rev Neurosci **11**(8): 589-599.

Wunderlich, C. R. A. (1871). Human temperature. New York, William Wood & Company.

Xia, T., Q. Zhang, Y. Xiao, C. Wang, J. Yu, H. Liu, B. Liu, Y. Zhang, S. Chen, Y. Liu, Y. Chen and F. Guo (2015). "CREB/TRH pathway in the central nervous system regulates energy expenditure in response to deprivation of an essential amino acid." International Journal of Obesity **39**(1): 105-113.

Xia, T., Q. Zhang, Y. Xiao, C. Wang, J. Yu, H. Liu, B. Liu, Y. Zhang, S. Chen, Y. Liu, Y. Chen and F. Guo (2015). "CREB/TRH pathway in the central nervous system regulates energy expenditure in response to deprivation of an essential amino acid." Int J Obes (Lond) **39**(1): 105-113.

Xiao, K. and S. K. Shenoy (2011). " β 2-Adrenergic Receptor Lysosomal Trafficking Is Regulated by Ubiquitination of Lysyl Residues in Two Distinct Receptor Domains." Journal of Biological Chemistry **286**(14): 12785-12795.

Xie, D., L. Geng, K. Xiong, T. Zhao, S. Wang, J. Xue, C. Wang, G. Wang, Z. Feng, H. Zhou, Y. Li, L. Li, Y. Liu, Z. Xue, J. Yang, H. Ma, D. Liang and Y. H. Chen (2020). "Cold-Inducible RNA-Binding Protein Prevents an Excessive Heart Rate Response to Stress by Targeting Phosphodiesterase." Circ Res **126**(12): 1706-1720.

Xin, P., X. Xu, C. Deng, S. Liu, Y. Wang, X. Zhou, H. Ma, D. Wei and S. Sun (2020). "The role of JAK/STAT signaling pathway and its inhibitors in diseases." Int Immunopharmacol **80**: 106210.

Xing, J., D. D. Ginty and M. E. Greenberg (1996). "Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase." Science **273**(5277): 959-963.

Xu, H., I. S. Ramsey, S. A. Kotecha, M. M. Moran, J. A. Chong, D. Lawson, P. Ge, J. Lilly, I. Silos-Santiago, Y. Xie, P. S. Distefano, R. Curtis and D. E. Clapham (2002). "TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel." Nature **418**(6894): 181-186.

Yadav, R., A. K. Jaryal and H. N. Mallick (2017). "Participation of preoptic area TRPV4 ion channel in regulation of body temperature." J Therm Biol **66**: 81-86.

Yagita, K., F. Tamanini, G. T. van Der Horst and H. Okamura (2001). "Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts." Science **292**(5515): 278-281.

Yamanaka, K. (1999). "Cold shock response in Escherichia coli." J Mol Microbiol Biotechnol **1**(2): 193-202.

Yang, C. and F. Carrier (2001). "The UV-inducible RNA-binding Protein A18 (A18 hnRNP) Plays a Protective Role in the Genotoxic Stress Response." Journal of Biological Chemistry **276**(50): 47277-47284.

Yang, L. (2018). "Neuronal cAMP/PKA Signaling and Energy Homeostasis." Adv Exp Med Biol **1090**: 31-48.

Yang, P., J. Feng, J. Luo, M. Madison and H. Hu (2017). Frontiers in Neuroscience

A Critical Role for TRP Channels in the Skin. Neurobiology of TRP Channels. T. L. R. Emir. Boca Raton (FL), CRC Press/Taylor & Francis© 2018 by Taylor & Francis Group, LLC.: 95-111.

Yang, X., F. Y. Lee, Sr. and G. S. Wand (1997). "Increased expression of Gs(alpha) enhances activation of the adenylyl cyclase signal transduction cascade." Mol Endocrinol **11**(8): 1053-1061.

Yau, W. W. and P. M. Yen (2020). "Thermogenesis in Adipose Tissue Activated by Thyroid Hormone." International Journal of Molecular Sciences **21**(8): 3020.

Yavuz, S., S. Salgado Nunez Del Prado and F. S. Celi (2019). "Thyroid Hormone Action and Energy Expenditure." J Endocr Soc **3**(7): 1345-1356.

Yeo, G. S. and L. K. Heisler (2012). "Unraveling the brain regulation of appetite: lessons from genetics." Nat Neurosci **15**(10): 1343-1349.

Yeung, Y. T., F. Aziz, A. Guerrero-Castilla and S. Arguelles (2018). "Signaling Pathways in Inflammation and Anti-inflammatory Therapies." Curr Pharm Des **24**(14): 1449-1484.

Yin, W. and A. C. Gore (2010). "The hypothalamic median eminence and its role in reproductive aging." Annals of the New York Academy of Sciences **1204**: 113-122.

Yokoyama, W. M., M. L. Thompson and R. O. Ehrhardt (2012). "Cryopreservation and thawing of cells." Curr Protoc Immunol **Appendix 3**: 3g.

Yoshioka, H., S. Koga, M. Maeta, N. Shimizu, R. Hamazoe and A. Murakami (1990). "The influence of hyperthermia in vitro on the functions of peritoneal macrophages in mice." Jpn J Surg **20**(1): 119-122.

Zee, P. C., H. Attarian and A. Videnovic (2013). "Circadian rhythm abnormalities." Continuum (Minneapolis) **19**(1 Sleep Disorders): 132-147.

Zeitlinger, M. A., H. Derendorf, J. W. Mouton, O. Cars, W. A. Craig, D. Andes and U. Theuretzbacher (2011). "Protein Binding: Do We Ever Learn?" Antimicrobial Agents and Chemotherapy **55**(7): 3067-3074.

Zhang, C., S. Chery, A. Lazerson, N. H. Altman, R. Jackson, G. Holt, M. Campos, A. V. Schally and M. Mirsaeidi (2020). "Anti-inflammatory effects of α -MSH through p-CREB expression in sarcoidosis like granuloma model." Sci Rep **10**(1): 7277.

Zhang, E. E., Y. Liu, R. Dentin, P. Y. Pongsawakul, A. C. Liu, T. Hirota, D. A. Nusinow, X. Sun, S. Landais, Y. Kodama, D. A. Brenner, M. Montminy and S. A. Kay (2010). "Cryptochrome mediates circadian regulation of cAMP signaling and hepatic gluconeogenesis." Nat Med **16**(10): 1152-1156.

Zhang, J., L. S. Barak, K. E. Winkler, M. G. Caron and S. S. Ferguson (1997). "A central role for beta-arrestins and clathrin-coated vesicle-mediated endocytosis in beta2-adrenergic receptor resensitization. Differential regulation of receptor resensitization in two distinct cell types." J Biol Chem **272**(43): 27005-27014.

Zhang, J., J. C. Chatham and M. E. Young (2020). "Circadian Regulation of Cardiac Physiology: Rhythms That Keep the Heart Beating." Annu Rev Physiol **82**: 79-101.

Zhang, M. and X. Zhang (2019). "The role of PI3K/AKT/FOXO signaling in psoriasis." Arch Dermatol Res **311**(2): 83-91.

Zhang, X., D. T. Odom, S.-H. Koo, M. D. Conkright, G. Canettieri, J. Best, H. Chen, R. Jenner, E. Herbolsheimer, E. Jacobsen, S. Kadam, J. R. Ecker, B. Emerson, J. B. Hogenesch, T. Unterman, R. A. Young and M. Montminy (2005). "Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues." Proceedings of the National Academy of Sciences **102**(12): 4459-4464.

Zhang, X. C., Y. Zhou and C. Cao (2015). "Thermodynamics of GPCR activation." Biophysics Reports **1**(3): 115-119.

Zhang, Y., J. Yang, J. Yang, J. Li and M. Zhang (2019). "CREB activity is required for epidermal growth factor-induced mouse cumulus expansion." Mol Reprod Dev **86**(12): 1887-1900.

Zhang, Z., A. Boelen, A. Kalsbeek and E. Fliers (2018). "TRH Neurons and Thyroid Hormone Coordinate the Hypothalamic Response to Cold." European Thyroid Journal **7**(6): 279-288.

Zholos, A. (2010). "Pharmacology of transient receptor potential melastatin channels in the vasculature." British Journal of Pharmacology **159**(8): 1559-1571.

Zhong, J., S. Amina, M. Liang, S. Akther, T. Yuhi, T. Nishimura, C. Tsuji, T. Tsuji, H.-X. Liu, M. Hashii, K. Furuhashi, S. Yokoyama, Y. Yamamoto, H. Okamoto, Y. J. Zhao, H. C. Lee, M. Tominaga, O. Lopatina and H. Higashida (2016). "Cyclic ADP-Ribose and Heat Regulate Oxytocin Release via CD38 and TRPM2 in the Hypothalamus during Social or Psychological Stress in Mice." Frontiers in Neuroscience **10**.

Zhu, X., C. Bühner and S. Wellmann (2016). "Cold-inducible proteins CIRP and RBM3, a unique couple with activities far beyond the cold." Cellular and Molecular Life Sciences **73**(20): 3839-3859.

Zimmerman, C. A., D. E. Leib and Z. A. Knight (2017). "Neural circuits underlying thirst and fluid homeostasis." Nat Rev Neurosci **18**(8): 459-469.

Zimmet, P., K. Alberti, N. Stern, C. Bilu, A. El-Osta, H. Einat and N. Kronfeld-Schor (2019). "The Circadian Syndrome: is the Metabolic Syndrome and much more!" J Intern Med **286**(2): 181-191.

Zou, J.-j., Y.-d. Gao, S. Geng and J. Yang (2011). "Role of STIM1/Orai1-mediated store-operated Ca²⁺ entry in airway smooth muscle cell proliferation." Journal of Applied Physiology **110**(5): 1256-1263.

Zou, Z. G., F. J. Rios, A. C. Montezano and R. M. Touyz (2019). "TRPM7, Magnesium, and Signaling." Int J Mol Sci **20**(8).

Zubakova, R., A. Gille, A. Faussner and U. Hilgenfeldt (2008). "Ca²⁺ signalling of kinins in cells expressing rat, mouse and human B1/B2-receptor." Int Immunopharmacol **8**(2): 276-281.

Anhang

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Abb. 1: Schematische Darstellung der kälteinduzierten Thermogenese | 40 |
| Abb. 2: Darstellung der AC-vermittelten Umwandlung von ATP in cAMP unter Abspaltung von Pyrophosphat | 49 |
| Abb. 3: Schematische Darstellung des CPs mit dem Zeitpunkt der Membranpräparation | 66 |
| Abb. 4: Schematische Darstellung der enzymatischen Luciferinumsetzung | 67 |
| Abb. 5: Schematische Darstellung der Luciferasemessung im FluoStar | 69 |
| Abb. 6: Schematische Darstellung der Bestimmung der Endozytoserate | 81 |
| Abb. 7: Schematische Darstellung der Datenverarbeitung nach einer Luciferasemessung nach 2, 4 und 8 h bei 36, 37 und 38 °C | 97 |
| Abb. 8: Schematische Darstellung der Datenverarbeitung nach einer Luciferasemessung bei 36 und 38 °C | 99 |
| Abb. 9: Schematische Darstellung der Datenverarbeitung nach einer Luciferasemessung bei 35,5 und 38,5 °C mit der Verwendung eines Inhibitors | 101 |
| Abb. 10: Schematische Darstellung der Datenverarbeitung nach Bestimmung der Agonisten-induzierten cAMP-Akkumulation bei 36 °C und 38 °C | 102 |
| Abb. 11: Schematische Darstellung der verwendeten Temperaturprogramme | 109 |
| Abb. 12: Schematische Darstellung des CP mit einer 37 °C-Kontrollinkubation | 110 |
| Abb. 13: Aufheizperiode der Temperaturinkubatoren auf 37 °C | 111 |
| Abb. 14: BMAL1-Promotoraktivität in mHypoA-2/10-Zellen (AP und CP) | 114 |
| Abb. 15: mHypoA-2/10-CREB-, STAT- und FOXO-abhängige Reporteraktivität (CP) | 116 |
| Abb. 16: CREB-, STAT- und FOXO-abhängige Reporteraktivität (AP) | 119 |
| Abb. 17: prepro-TRH-Promotoraktivität in mHypoA-2/10-TRH-Zellen (AP) | 121 |
| Abb. 18: CREB-abhängige Reporteraktivierung in mHypoA-2/10-CREB-Zellen nach bis zu 12-stündiger Inkubation im CP | 122 |
| Abb. 19: Reporteraktivität in mHypoA-2/10-Zellen in Abhängigkeit von der Temperatur nach 4 h (AP) | 124 |
| Abb. 20: Expression von hsf1 und HSPs in mHypoA-2/10-Zellen | 125 |
| Abb. 21: Expression von hsf1 in mHypoA-2/10-CREB-Zellen und der Einfluss von KNK437 auf die CREB-abhängige Genexpression (CP) | 127 |
| Abb. 22: mRNA-Expression von CIRP (CP und AP) | 128 |
| Abb. 23: Überexpression von CIRP in mHypoA-2/10-CREB- und HEK-293- CREB-Zellen bei 37 °C und Kontrolle der Überexpression mittels Western Blot | 130 |
| Abb. 24: Verringerung der CIRP-Expression in mHypoA-2/10-CREB-Zellen mittels RNA-Interferenz | 132 |

| | |
|--|-----|
| Abb. 25: mRNA-Expression von TRP-Kanälen in mHypoA-2/10-Zellen | 134 |
| Abb. 26: Einfluss der Ionenkanalmodulatoren RuR und 2-APB auf die CREB-abhängige Reporteraktivität nach Inkubation von mHypoA-2/10-CREB-Zellen (AP) | 135 |
| Abb. 27: Einfluss von 2-APB auf die temperaturabhängige CRE-Aktivität (AP) | 136 |
| Abb. 28: Einfluss von TRP-Kanalmodulatoren auf die temperaturabhängige CRE-Aktivität (AP) | 138 |
| Abb. 29: Expression ausgewählter Rezeptoren in mHypoA-2/10-Zellen | 140 |
| Abb. 30: Funktioneller Nachweis des B2Rs in mHypoA-2/10-Zellen | 141 |
| Abb. 31: BK-induzierte CRE-Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur (CP) | 142 |
| Abb. 32: NA-vermittelte CRE-Aktivität in mHypoA-2/10-Zellen | 144 |
| Abb. 33: NA-induzierte TRH-Reporteraktivität (AP) | 145 |
| Abb. 34: NA-induzierte STAT-Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur (CP) | 146 |
| Abb. 35: Inhibierung der NA-induzierten CRE-Aktivität in mHypoA-2/10-CREB-Zellen durch SR 59230A und ICI 118,551 | 148 |
| Abb. 36: Bindung von ¹²⁵ I-CYP an Membranpräparationen von mHypoA-2/10-Zellen | 149 |
| Abb. 37: Temperaturabhängige Verdrängung von ¹²⁵ I-CYP durch NA an Zellmembranfraktionen von mHypoA-2/10-Zellen (AP) | 150 |
| Abb. 38: Temperaturabhängige Verdrängung von ¹²⁵ I-CYP durch Sal an Zellmembranfraktionen von mHypoA-2/10-Zellen (AP) | 151 |
| Abb. 39: Temperaturabhängige Verdrängung von ¹²⁵ I-CYP durch NA an Zellmembranfraktionen von mHypoA-2/10-Zellen (CP) | 152 |
| Abb. 40: Temperaturabhängige Verdrängung von ¹²⁵ I-CYP durch Sal an Zellmembranfraktionen von mHypoA-2/10-Zellen (CP) | 153 |
| Abb. 41: Verdrängung von ¹²⁵ I-CYP durch Propranolol an Zellmembranfraktionen von mHypoA-2/10-Zellen (CP) | 154 |
| Abb. 42: Bindung von ¹²⁵ I-CYP an den β_2 -AR in Zellmembranfraktionen von mHypoA-2/10-Zellen in Abhängigkeit von der Vorinkubation mit Gpp(NH)p (CP) | 156 |
| Abb. 43: Bestimmung der NA-vermittelten Rezeptorendozytose von mHypoA-2/10-Zellen | 158 |
| Abb. 44: Spezifische Bindung von ¹²⁵ I-CYP an mHypoA-2/10-Zellen und NA-induzierter Rezeptorabbau | 159 |
| Abb. 45: Basale G-Proteinaktivität in Zellmembranfraktionen von mHypoA-2/10-Zellen in Abhängigkeit von Gpp(NH)p und der Membranmenge | 161 |
| Abb. 46: NA-induzierte G-Proteinaktivierung in Zellmembranfraktionen von mHypoA-2/10-Zellen in Abhängigkeit des verwendeten Puffersystems ... | 162 |
| Abb. 47: Verdrängung von ¹²⁵ I-CYP durch Sal in intakten mHypoA-2/10-Zellen (CP) | 163 |
| Abb. 48: Basale cAMP-Akkumulation von mHypoA-2/10-Zellen (AP und CP) .. | 165 |

| | |
|---|-----|
| Abb. 49: Induzierte cAMP-Akkumulation in mHypoA-2/10-Zellen (AP und CP) | 168 |
| Abb. 50: cAMP-Akkumulation in mHypoA-2/10-Zellen bei 36, 37 und 38 °C (AP) | 169 |
| Abb. 51 Dosis-Wirkungskurven der NA-induzierten cAMP-Akkumulation (AP und CP) | 171 |
| Abb. 52: Induzierte cAMP-Akkumulation nach 30 und 60 min in mHypoA-2/10-Zellen | 173 |
| Abb. 53: Kinetik der NA-induzierten intra- und extrazellulären cAMP-Akkumulation in mHypoA-2/10-Zellen | 175 |
| Abb. 54: Expressionsprofil der ABCC-Transporter und die Indomethacin-vermittelte Inhibition des NA-induzierten cAMP-Efflux | 176 |
| Abb. 55: Induzierte intra- und extrazelluläre cAMP-Akkumulation nach 20 und 60 min NA-Stimulation | 179 |
| Abb. 56: Messung des PDE-induzierten ³ H-cAMP in mHypoA-2/10-Zellen in Abhängigkeit von der Anwesenheit von IBMX | 181 |
| Abb. 57: ³ H-cAMP-Abbau in mHypoA-2/10-Zellfragmenten | 182 |
| Abb. 58: ³ H-cAMP-Abbau in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellzahl | 184 |
| Abb. 59: ³ H-cAMP-Abbau in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur | 185 |
| Abb. 60: Induzierte cAMP-Akkumulation nach Stimulation mit NA oder FSK in weiteren Zellsystemen | 187 |
| Abb. 61: Liganden-induzierte cAMP-Akkumulation anderer Zellsysteme (AP) | 189 |
| Abb. 62: Postuliertes Modell für den NA-induzierten cAMP-Haushalt in mHypoA-2/10-Zellen | 209 |

Abb. 1, Abb. 4, Abb. 6 und Abb. 62 wurden mit Biorender erstellt. Abb. 2 wurde mit Marvin erstellt. Alle weiteren Abbildungen wurden mit GraphPad 9.1 erstellt.

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Tabelle 1: Sequenzen der verwendeten Primer | 74 |
| Tabelle 2: Zusammensetzung der Pufferlösungen für die Bestimmung der G-Proteinaktivierung | 85 |
| Tabelle 3: Benötigte Zeit für die Temperaturwechsel der Inkubatoren | 112 |
| Tabelle 4: Pharmakologisches Profil der TRP-Kanäle..... | 137 |
| Tabelle 5: Temperatureffekt der induzierten cAMP-Akkumulation (AP und CP) | 168 |
| Tabelle 6: Vergleich der Dosis-Wirkungs-Kurven (AP und CP)..... | 172 |
| Tabelle 7: NA-, Sal-, bzw. FSK-induzierte cAMP-Akkumulation in verschiedenen Zelllinien..... | 187 |

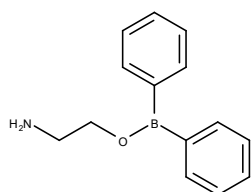
Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|---|
| 2-APB | 2-Aminoethoxydiphenylborat |
| ABC | ATP binding cassette |
| Adr | Adrenalin |
| AgRP | agouti-related protein |
| Akt | Proteinkinase B |
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| AMPK | AMP-abhängige Kinase |
| AP | akutes Programm |
| ARC | Nucleus arcuatus des Hypothalamus |
| BAPTA-AM | 1,2-Bis-(2-aminophenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure-tetrakis-(acetoxymethyl)-ester |
| BMAL1 | brain and muscle ARNT-Like 1 |
| Ca ²⁺ | Calciumionen |
| cAMPe | extrazelluläres cAMP |
| cAMPi | intrazelluläres cAMP |
| CART | cocaine and amphetamine regulated transcript |
| cDNA | complementary DNA |
| CIRP/CIRBP | cold inducible RNA-binding protein |
| CLOCK | circadian locomotor output cycles kaput |
| CP | circadianes Programm |
| CPM | counts per minute |
| CRE | cAMP response element |
| CREB | CRE-binding protein |
| CREM | cAMP response element modulatory protein |
| CRH | corticotropin-releasing hormone, Corticoliberin |
| CRTC | CREB regulated transcription factor |
| DPM | decay per minute |
| ERK1/2 | extracellular regulated kinase 1/2 |
| FBS | fetal bovine serum |
| FluAc | Flufenaminsäure |
| FOX | forkhead-box-protein |
| FSK | Forskolin |
| GEF | GTP-Austauschfaktor |

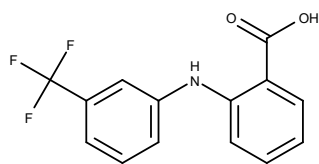
| | |
|-----------|---|
| GIT | Gastrointestinaltrakt |
| GRE | glucocorticoide-responsive element |
| HPT-Achse | Hypothalamus-Hypophyse-Schilddrüse-Achse |
| HRP | horseradish-peroxidase |
| HSE | Hitzeschockelement |
| hsf1 | heat shock factor 1 |
| HSP | Hitzeschockprotein |
| JAK | Januskinasen |
| KSP | Kälteschockprotein |
| LB | lysogenic growth |
| MAPK | mitogen-activated protein kinases |
| MefAc | Mefenaminsäure |
| NA | Noradrenalin |
| NFAT | nuclear factor of activated T-cells |
| NPY | Neuropeptid Y |
| ObR | Leptinrezeptor |
| OD | optische Dichte |
| PBS | phosphate buffered saline |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PER2 | Period 2 |
| PI3K | Phosphoinositid-3-Kinasen |
| PKA | Proteinkinase A |
| POA | Area praeoptica des Hypothalamus |
| POMC | Pro-Opiomelanocortin |
| PVN | Nucleus paraventricularis des Hypothalamus |
| q. s. | quantum satis |
| qRT-PCR | quantitative Echtzeit reverse Transkriptase PCR |
| rEC | ratio of cAMP efflux over cytosolic cAMP |
| RefSeq | reference sequence |
| RuR | Rutheniumrot |
| Sal | Salmeterol |
| SCN | Nucleus suprachiasmaticus |
| SM | Spezialmedium |
| SOCS | suppressor of cytokine signaling |

| | |
|---------------|--|
| STAT | signal transducers and activators of transcription |
| T3 | Trijodthyronin |
| T4 | Thyroxin |
| TCA | Trichloressigsäure |
| TRH | thyrotropin-releasing hormone, Thyreoliberin |
| TRP | transient receptor potential |
| TRPM | TRP-Kanal der Melastatin-Unterfamilie |
| TSH | Thyroidea-stimulierendes Hormon, Thyreotropin |
| w. E. | willkürliche Lichteinheit |
| α -MSH | α -Melanozytenstimulierendes Hormon |
| β -AR | β -Adrenozeptor |

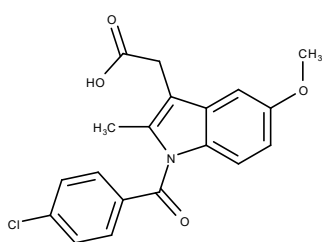
Strukturformeln der verwendeten Agonisten und Inhibitoren



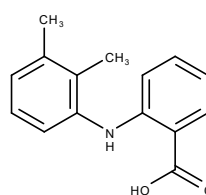
2-APB



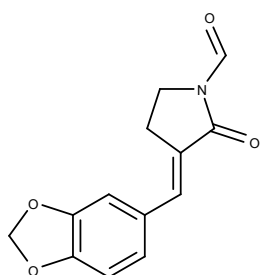
FluAc



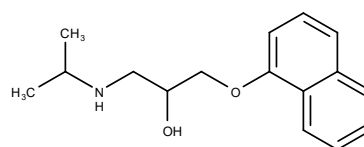
Indomethacin



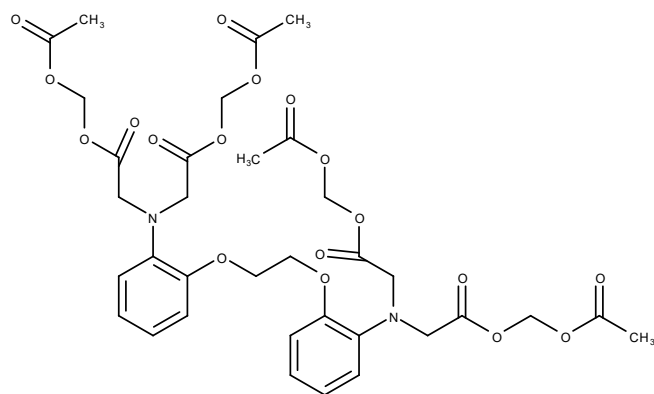
MefAc



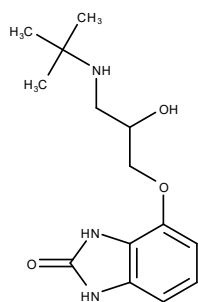
KNK437



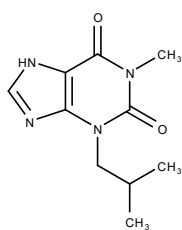
Propranolol



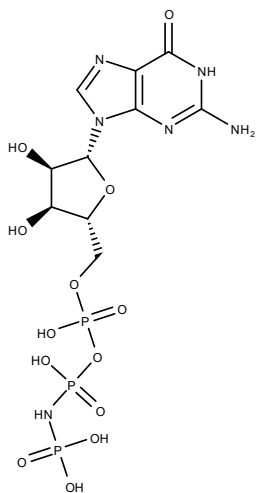
BAPTA-AM



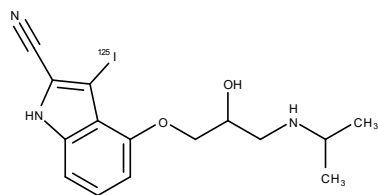
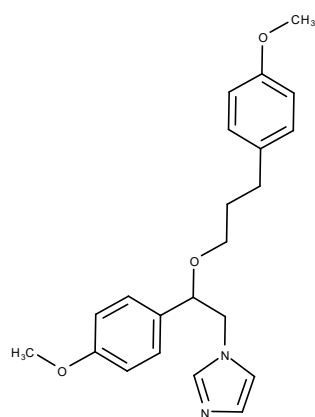
CGP-12177A



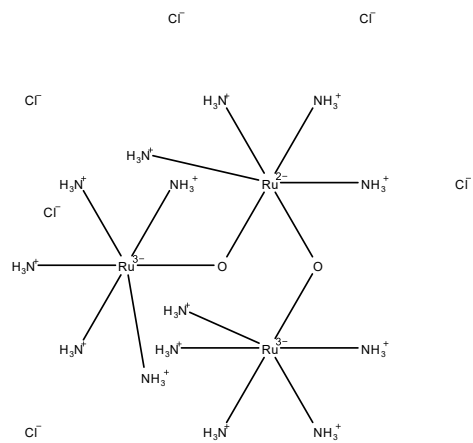
IBMX



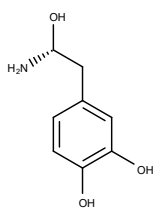
Gpp(NH)p

 ^{125}I -CYP

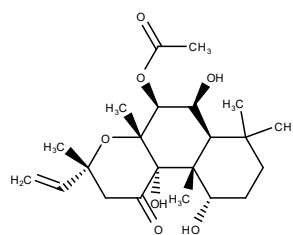
SKF96365



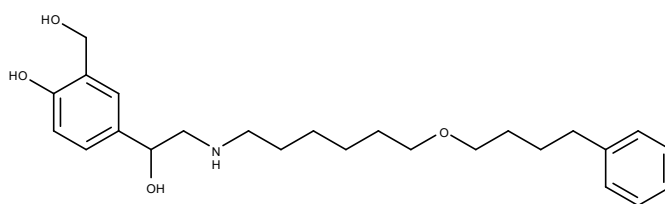
RuR



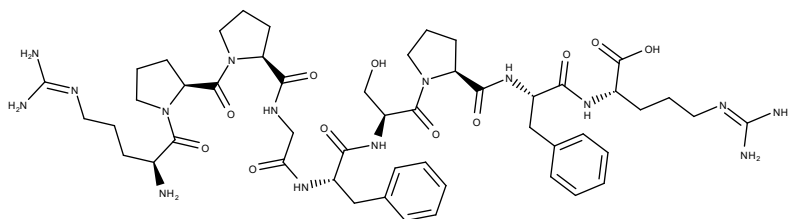
NA



FSK



Sal



Bradykinin

Die Strukturformeln wurden mit dem Editor Marvin von ChemAxon erstellt.

Publikationsliste

Originalarbeiten

Faro, D., Boekhoff, I., Gudermann, T., Breit, A. (2021) "*Physiological temperature changes fine-tune β 2-adrenergic receptor-induced cytosolic cAMP accumulation.*" Molecular Pharmacology

Webert, L., Faro, D., Zeitlmayr, S., Gudermann T., Breit, A. (2022). "*Analysis of the Glucose-Dependent Transcriptome in Murine Hypothalamic Cells.*" Cells

Tagungsbeiträge

Faro, D., Boekhoff, I., Gudermann, T., Breit, A. *Temperature dependent gene expression in mHypoA-2/10 cells.* 4th German Pharm-Tox Summit, 2019

Faro, D., Boekhoff, I., Gudermann, T., Breit, A. *Influence of simulated core body temperature on signaling and gene expression in a mouse hypothalamic cell line.* 5th German Pharm-Tox Summit, 2020

Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Faro, Dennis Michael Thomas

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Einfluss simulierter Körpertemperaturänderungen auf die Signalweiterleitung und Genexpression in hypothalamischen Zellen

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 12.07.2021

Dennis Faro

Danksagung

Beginnend ganz oben, möchte ich mich bei Prof. Dr. Gudermann dafür bedanken, dass ich die Möglichkeit erhalten habe, die Dissertation am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie anzufertigen.

Vielen Dank an die Gutachter und die Mitglieder der Prüfungskommission Prof. Dr. Maria Robles, Prof. Dr. Peter Becker und Prof. Dr. Alexander Faußner für die investierte Mühe und Zeit.

Liebe Ingrid, dir möchte ich herzlich dafür danken, dass du, als meine Doktormutter und Betreuerin, stets erreichbar warst. Außerdem möchte ich dir danken, dass du auch über wissenschaftliche Belange hinaus, jederzeit am Wohlbefinden der Doktoranden interessiert warst. Das ‚Köpfe zusammenstecken‘ und ‚mal-laut-durchlesen‘ war zudem sehr hilfreich.

Andreas, ich möchte dir einen Schwall Dankbarkeit zukommen lassen! Die letzten 4 Jahre waren geprägt von Kollegialität, spannenden wissenschaftlichen Diskussionen und leckeren kulinarischen Erlebnissen. In der Wissenschaft braucht man Fantasie, Mut und eine gehörige Portion Fleiß (neben Glück und einer Flasche guten Bordeaux). Mindestens genauso wichtig ist allerdings, dass bei aller Arbeit auch das Miteinander nicht übersehen wird. Dafür möchte ich dir danken!

Die Kollegen, die lieben Kollegen! Über die Jahre durfte ich mit einigen Bacheloranden, Masteranden und Doktoranden [Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird auf die gleichzeitige Verwendung der Sprachformen männlich, weiblich und divers (m/w/d) verzichtet] zusammenarbeiten und möchte keine einzige vermissen! Allen voran möchte ich Zenze danken: Danken dafür, dass sie meine wissenschaftlichen und weniger wissenschaftlichen Spinnereien ausgehalten hat. Danken dafür, dass sie mindestens (!) genauso viele Spinnereien im Kopf hat. Danken für Spaß, wissenschaftlichen Diskurs und die gemeinsame Zeit. Auch dir, liebe Steffi, soll auf ewig mein Dank nachschleichen! Danke für die gemeinsamen Schmöker-Pausen (RIP), Unterhaltungen und Weihnachtsfeiern! Danke für deine einfühlsame und ruhige Art! Lieber Flo, danke für deinen Humor und dein offenes Wesen. Danke für den Gin. Dear Hardy, thank you for balancing the crazyness in AG Bright. Also, thanks for almost half the pizza. > print („Danke Luisa, für die basics in R und deine kleinen Monster“). Danke Elli, für deine

liebenswürdige Art und Hilfe bei meinen ersten Labor-Gehversuchen. Liebe Irini, Ευχαριστώ πολύ! Ich habe mich immer gefreut, dich als erstes in der Früh anzutreffen! Merce Doris und Renate! Danke an die stets hilfsbereiten Damen Schreier, Krämer und Lakatos. Danke Pranav, Aaron, Christian, Jasmin, Bernd, Larissa aka Larry, Lorenz, Julia, Eva. Danke an alle, deren Namen ich vergessen habe oder nie wusste. Liebe Katy, lieber Markus, danke für eure Hilfe, Engagement und die netten Schwätzchen! Meinen Dank jedem, der mittags zu interessanten, spannenden, abstrusen und unglaublichen Diskussionen beigetragen hat!

Liebe Ute, dir gilt noch ein besonderer Dank: Danke, dass du immer für uns da warst und mit meinen Labor-Allüren zu Recht gekommen bist! Danke für deine optimistische, junge und dynamische Art!

Lieber Opa, danke für so vieles, zuletzt für deinen wertvollen fachlichen und sprachlichen (kommt da jetzt ein Komma hin?) Rat. Danke Om(im)a, dass Opa mir helfen durfte. Danke, dass ihr immer da seid für mich. Lieber Timmy, danke für dein schier endloses Interesse an meiner Arbeit. Danke, dass du dir tausendmal verrückte Ideen, Theorien, Widersprüche, Hasstiraden und Liebesgesänge angehört hast. Jani, auch dir danke für die Unterstützung und deine lieben Worte. Danke euch beiden, dass ihr meine Geschwister seid! Danke an meine Eltern, die zwar nur eine grobe Vorstellung von dem haben, was ich da eigentlich die letzten Jahre gemacht habe, mich aber trotzdem immer unterstützt und bestätigt haben. Danke an Jakob Grubi für die Kommata und Rechtschreibfehler, danke an die Caritas für die Arbeitszeit.

Liebe Anna, der größte Dank geht an dich! Himmelhoch jauchzend oder zu Tode betrübt? Egal, du warst für mich da und hast dich mit mir gefreut oder mich aufgemuntert! Danke dafür, dass du ein guter Mensch bist - der Beste! Merci Mausli, ti amo!