



ACADEMIA ROMÂNĂ
Școala de Studii Avansate a Academiei Române
Institutul de Biochimie

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Implementarea și validarea unei platforme multiplex pentru analiza funcțională a
receptorilor cuplați cu proteină G (GPCR) și canale ionice**

Coordonator științific:

Prof. Dr. Ștefan Eugen Szedlacsek

Student-doctorand:

Alexandra-Maria Bănică

2024

Cuprins

| | |
|--|-----------|
| Scopul studiului..... | 3 |
| Capitolul 1. INTRODUCERE | 4 |
| 1.1. Receptorii cuplați cu proteină G | 4 |
| 1.1.1. Receptorul IP | 7 |
| 1.2. Canale TRP | 8 |
| 1.2.1. TRPM8..... | 9 |
| 1.3. Interacțiunile între GPCRs și canale ionice | 10 |
| Capitolul 2. MATERIALE ȘI METODE | 14 |
| Capitolul 3. REZULTATE..... | 15 |
| 3.1. Etapa de optimizare..... | 15 |
| 3.2. Interacțiunea funcțională dintre IP-R și TRPM8 | 21 |
| CONCLUZII ȘI PERSPECTIVE..... | 30 |
| Mulțumiri..... | 32 |
| Lista lucrărilor publicate | 33 |
| Bibliografie | 34 |

Scopul studiului

Receptorii cuplați cu proteină G (GPCR) și canalele potențiale de receptor tranzitoriu (TRP) sunt printre cele mai importante proteine de membrană implicate în semnalizarea celulară. GPCR constituie cea mai mare familie de receptori, reprezentând ținta pentru aproximativ 40% dintre medicamentele comercializate. Ei mediază numeroase procese fiziologice prin transducerea semnalelor extracelulare în răspunsuri intracelulare prin interacțiunea cu proteinele G. Pe de altă parte, canalele TRP sunt un grup divers de canale ionice care răspund la diferiți stimuli, inclusiv temperatură, pH și stres mecanic. Atât canalele GPCR, cât și TRP sunt cruciale în contextul durerii, inflamației și percepției senzoriale, făcându-le ținte principale în descoperirea medicamentelor. Capacitatea lor de a regla căile complexe de semnalizare îi poziționează ca potențiale ținte terapeutice pentru diferite afecțiuni, inclusiv durere cronică, boli cardiovasculare și tulburări neurologice.

Scopul general al acestei teze este de a valida o platformă multiplex concepută inițial pentru screeningul de mare capacitate a compușilor care vizează GPCR și de a o utiliza pentru analiza funcțională a receptorilor cuplați cu proteinele G și a canalelor ionice, cu un accent deosebit pe interacțiunea dintre receptorul pentru prostaciclina (IPR) și canalele TRPM8.

În prima parte a tezei, mi-am propus să optimizez testele bazate pe tehnologia BRET pentru a măsura cu precizie cAMP și nivelurile de calciu intracelular. Aceste două molecule sunt mesageri secunzi cruciali în căile de semnalizare celulare mediate de GPCR și canalele ionice. Prin optimizarea acestor teste, am dorit să stabilesc o metodă fiabilă și sensibilă pentru evaluarea stărilor funcționale ale GPCR-urilor și ale canalelor ionice. Această optimizare a inclus ajustarea condițiilor de testare, validarea tehnicilor de măsurare și asigurarea reproductibilității în diferite configurații experimentale.

A doua parte a tezei se concentrează pe utilizarea platformei multiplex optimizate pentru a investiga interacțiunea funcțională dintre canalele IP-R și TRPM8. TRPM8 este un canal ionic binecunoscut implicat în detectarea temperaturilor reci și medierea efectelor antiinflamatorii și analgezice. În schimb, prostaciclina și receptorul său IPR sunt asociate cu promovarea inflamației și a durerii prin activarea căilor de semnalizare specifice.

Având în vedere rolurile critice ale TRPM8 și IP-R în reglarea durerii și a răspunsurilor inflamatorii și modelele lor de expresie suprapuse în diferite țesuturi, acest studiu explorează ipoteza că activarea IP-R poate modula funcția TRPM8. În mod specific, este examinat modul în care agoniștii IP-R afectează activitatea canalului TRPM8 în sistem de expresie heterolog în celule HEK293T și în neuroni DRG proveniți de la șoareci.

În plus, înțelegerea căilor specifice prin care IP-R modulează activitatea TRPM8 poate dezvălui noi perspective asupra mecanismelor moleculare care stau la baza durerii inflamatorii. Aceste cunoștințe ar putea contribui la dezvoltarea de noi strategii terapeutice care vizează aceste căi pentru a trata durerea cronică și afecțiunile inflamatorii. Prin atingerea acestor obiective, această teză își propune să contribuie la înțelegerea mai largă a interacțiunilor canalelor GPCR-TRP, în special modul în care semnalizarea receptorului de prostaciclina influențează funcția TRPM8.

Capitolul 1. INTRODUCERE

1.1. Receptorii cuplați cu proteină G

Receptorii cuplați cu proteină G constituie cea mai mare și cea mai diversă familie de proteine membranare, cu peste 800 de membri identificați în genomul uman. Ei au roluri esențiale în aproape fiecare proces fiziologic, inclusiv percepția senzorială, neurotransmisia, răspunsul imun și semnalizarea hormonală (M. Zhang și colab., 2024).

Aproximativ jumătate din GPCR identificate la om au funcții senzoriale. Ele mediază olfacția, gustul, percepția luminii și semnalizarea mirosului. Restul GPCR-urilor non-senzoriale mediază semnalizarea prin diverși liganzi, de la molecule mici la peptide sau proteine mari (Alexander et al., 2021). Esențial pentru funcția lor este capacitatea de a interacționa cu proteinele G heterotrimerice, care servesc drept comutatoare moleculare care transduc semnalele din compartimentele extracelulare la proteinele efectoare intracelulare. (Hamm, 1998).

Receptorii cuplați cu proteina G au o arhitectură tipică, reprezentând un cadru conservat structural esențial pentru diversele lor roluri. Fiecare GPCR cuprinde în mod obișnuit o singură polipeptidă caracterizată printr-un capăt N-terminal extracelular, care facilitează legarea ligandului și un capăt C-terminal intracelular, care interacționează cu moleculele de semnalizare intracelulare. Centrul GPCR constă din șapte domenii transmembranare hidrofobe (TM1-TM7) dispuse într-un mănunchi elicoidal care traversează stratul dublu lipidic al membranei celulare. Aceste elice transmembranare servesc ca o schelă pentru recunoașterea ligandului și transducția semnalului, cu aminoacizi specifici acoperind interiorul fasciculului transmembranar, formând buzunarul de legare a ligandului. Conectând elicele transmembranare sunt trei bucle extracelulare (ECL1-ECL3) și trei bucle intracelulare (ICL1-ICL3), care oferă suport structural suplimentar și contribuie la interfața de legare a ligandului

și la activarea receptorului (Katritch și colab., 2013). Legarea ligandului (Figura 1) induce modificări conformaționale în receptor, activând căile de semnalizare în aval.

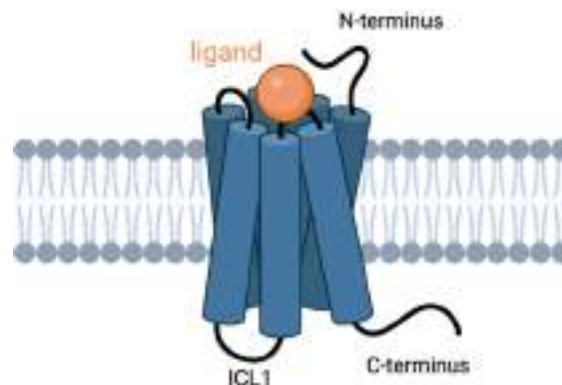


Figura 1. Reprezentarea schematică a structurii tridimensionale a GPCR. Helicile transmembranare servesc ca o schelă pentru recunoașterea ligandului și transducția semnalului, iar aminoacizii specifici din elice formează buzunarul de legare a ligandului. În plus, buclele extracelulare și intracelulare contribuie la activarea receptorului (creat cu BioRender).

GPCR-urile transduc semnalele extracelulare în răspunsuri intracelulare prin cuplarea la proteinele G heterotrimerice, care servesc ca comutatoare moleculare. Aceste proteine G sunt compuse din trei subunități: α , β , și γ . La legarea ligandului de GPCR, are loc o schimbare conformațională, permițând receptorului să interacționeze cu subunitatea α , ducând la activarea acesteia și disocierea ulterioară de subunitatea $\beta\gamma$ dimerică.

Proteina G circulă între o stare inactivă legată de GDP și o stare activă legată de GTP. În starea sa activă, subunitatea α este legată de GTP și asociată cu subunitățile $\beta\gamma$. La activarea receptorului, GDP este schimbat cu GTP, ceea ce duce la disocierea subunității de dimer. Atât subunitatea α , cât și dimerul $\beta\gamma$ pot apoi modula proteinele efectoare din aval, ducând la diferite răspunsuri celulare. În special, subunitatea posedă activitate GTPază intrinsecă, permițându-i să hidrolizeze GTP la GDP, terminând astfel semnalizarea și revenind la starea sa inactivă (Wettschureck & Offermanns, 2005).

Versatilitatea funcțională a sistemului de semnalizare mediat de proteina G rezultă din designul său modular și prezența mai multor subtipuri de proteine G. Aceste subtipuri sunt clasificate în patru familii în funcție de subunitatea lor, și anume Gs, Gi/Go, Gq/G11, G12/G13. Modelele de cuplare caracteristice între receptori și proteinele G au fost identificate pentru majoritatea receptorilor, ceea ce duce la o clasificare alternativă a GPCRurilor în patru categorii principale pe baza asocierii lor cu subtipurile G.

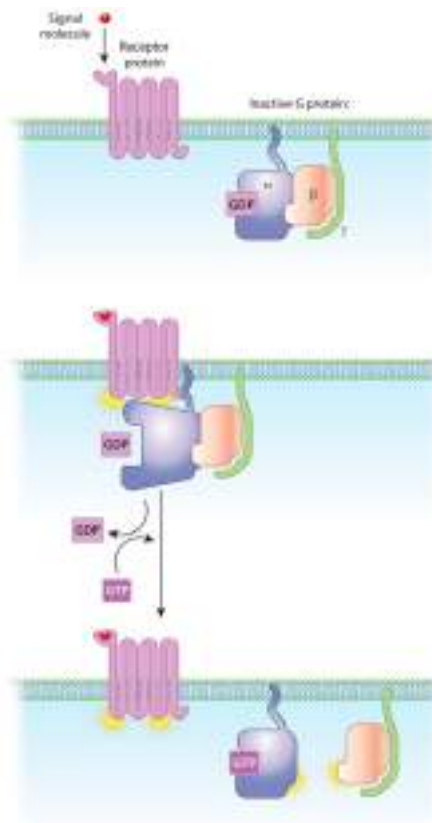


Figura 2. Proteinele G în timpul activării receptorului prin membrana plasmatică. α , β , și γ sunt reprezentate cu asocieri diferite cu membrana plasmatică. La schimbul GDP-GTP pe subunitate, atât subunitatea cât și complexul pot interacționa cu alte molecule pentru a promova cascadele de semnalizare. În special, atât subunitatea cât și complexul rămân ancorate de membrana plasmatică în timpul activării lor. Aceste subunități activate pot interacționa în continuare cu canalele ionice, alte proteine membranare și mesageri secundari dispersați în întreaga celulă (Nature Education, 2010).

Familia Gs a proteinelor G, exprimată omniprezent în întregul corp, joacă un rol esențial în activarea căii dependente de cAMP. Această familie cuprinde proteina Gs codificată de gena GNAS și Golf, exprimată în primul rând în sistemul olfactiv și codificată de gena GNAL. În timp ce Gs servesc ca mediatori fundamentali ai semnalizării intracelulare, Golful joacă un rol mai specializat, implicat în principal în transducția semnalului olfactiv.

Calea dependentă de cAMP începe cu activarea GPCR-urilor de către liganzi extracelulari. La activarea receptorului, proteinele Gs sunt stimulate, ducând la disocierea de complex. Proteina Gs eliberată se leagă apoi de adenilil ciclază (AC) și activează, catalizând conversia ATP în AMPc. Nivelurile crescute de AMPc activează ulterior protein kinaza dependentă de cAMP, cunoscută sub numele de PKA, prin eliberarea subunităților sale

reglatoare, permițând subunităților catalitice să fosforileze proteinele țintă. Aceste evenimente de fosforilare modulează activitatea efectorilor din aval, a factorilor de transcripție și a canalelor ionice, mediând o gamă largă de răspunsuri celulare.

O altă cale de semnalizare majoră activată de GPCR este mediată de familia Gq/11 de proteine G. Această familie mai este numită și Gq/11/14/15 pentru a include membrii familiei strâns înrudiți, deși Gq și G11 par a fi exprimate în mod omniprezent. Ca și celelalte căi de semnalizare, Gq/11 sunt activate prin legarea ligandului la GPCR-urile cuplate cu Gq. Această activare face ca subunitatea Gq să se disocieze de dimer, care apoi modulează activitatea efectorilor din aval. Efectorul primar al acestei căi de semnalizare este fosfolipaza C- (PLC-), care hidrolizează fosfatidilinozitol 4,5-bifosfat (PIP2) în doi mesageri secundari esențiali: inozitol 1,4,5-trifosfat (IP3) și diacilglicerol (DAG). IP3 difuzează prin citoplasmă pentru a se lega de receptorii IP3 de pe reticulul endoplasmatic, declanșând eliberarea ionilor de calciu în citosol. Concentrația crescută de calciu intracelular duce la diferite răspunsuri celulare, inclusiv contracția musculară, secreția și metabolismul. În același timp, DAG rămâne ancorat de membrana plasmatică datorită naturii sale hidrofobe și activează protein kinaza C (PKC), care fosforilează proteinele țintă pentru a propaga semnalul în continuare (Wettschureck & Offermanns, 2005).

1.1.1. Receptorul IP

Receptorul de prostacilină, cunoscut și sub numele de Receptor de prostaglandină I2 sau IP-R, este un GPCR activat de prostacilină (PGI2) și un membru al familiei de mediatori lipidici ai prostanoizilor. Gena care codifică IP umană este PTGIR, situată pe cromozomul 19q13.32. Expresia PTGIR este larg răspândită, dar este deosebit de proeminentă în endoteliul vaselor de sânge, trombocitelor, celulelor musculare netede, rinichilor și celulelor imune specifice, cum ar fi macrofagele și celulele dendritice.

Ligandul endogen al receptorului de prostacilină este PGI2, care este foarte instabil, ceea ce face dificilă determinarea afinității sale exacte. Această instabilitate a condus la sintetizarea analogilor stabili pentru cercetare și utilizare clinică. Printre acești compuși se numără cicaprost, iloprost și carbociclic, cicaprost prezentând cea mai mare selectivitate și potență decât ligandul endogen. Ca antagoniști au fost folosiți mai mulți compuși sintetici, și anume CAY10441, TG6-126 și RO3244794, ultimii părănd a fi cei mai specifici (Clapp și colab., 2023).

Receptorul IP se cuplează în primul rând cu proteinele Gs, rezultând niveluri crescute de AMPc și mediand efectele prostacilinei. Cu toate acestea, în funcție de tipul de celulă,

receptorul IP poate semnala și prin alte căi de semnalizare, inclusiv cascade de semnalizare dependente de Gq și Gi.

Prostaciclina joacă un rol crucial în menținerea homeostaziei cardiovasculare. Activarea IP-R induce vasodilatație, scăderea tensiunii arteriale și îmbunătățirea fluxului sangvin. Acest efect are loc în principal prin calea dependentă de cAMP, care relaxează celulele musculare netede. În plus, prostaciclina inhibă agregarea trombocitelor, prevenind apariția trombozei și exercitând efecte cardioprotectoare, proces asociat și cu creșterea concentrației de AMPc în trombocite. În plămâni, IP-R promovează tensiunea arterială pulmonară și scade hipersensibilitatea bronșică, în timp ce în rinichi, reglează fluxul sanguin renal și rata de filtrare glomerulară.

IP-R joacă un rol semnificativ ca mediator al inflamației. Reduce aderența și migrarea leucocitelor, reglează în jos expresia citokinelor proinflamatorii și scade stresul oxidativ. De asemenea, modulează activitatea diferitelor celule imunitare, inclusiv macrofagele și celulele T, influențând astfel răspunsul imun și inflamația. În schimb, în condițiile reumatologice, IP-R prezintă răspunsuri proinflamatorii (Stitham și colab., 2011).

În plus, receptorul de prostaciclina prezintă un rol complex în percepția durerii. În neuronii senzoriali, activarea IPR poate duce la hiperalgezie și o sensibilitate crescută la durere, în special în inflamație. Acest efect hiperalgezic este mediat de creșterea nivelurilor de cAMP, care sporesc excitabilitatea neuronilor nociceptivi. Cu toate acestea, IP-R poate exercita și efecte analgezice în anumite condiții prin modularea proceselor inflamatorii și reducerea eliberării de citokine proinflamatorii. Astfel, implicarea receptorului IP în percepția durerii este dependentă de context, cu efecte variind în funcție de condiții patologice specifice.

1.2. Canale TRP

Canalele de potențial receptor tranzitoriu (TRP) detectează diverse semnale celulare și de mediu. Aceste canale ionice sunt prezente în numeroase țesuturi și tipuri de celule și permit trecerea mai multor cationi, inclusiv Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ și K^+ . Canalele TRP sunt implicate în răspunsurile senzoriale, cum ar fi căldura, frigul, durerea, stresul, vederea și gustul, iar numeroși stimuli le pot declanșa. Locația lor predominantă pe suprafața celulei, interacțiunea cu diferite căi de semnalizare fiziologice și structura cristalină unică fac canalele TRP ținte promițătoare pentru dezvoltarea medicamentelor și relevante pentru tratarea mai multor boli.

Canalele TRP au fost identificate pentru prima dată cu peste 50 de ani în urmă, când s-a descoperit că un mutant vizual din *Drosophila* are un răspuns tranzitoriu la lumina puternică. Datorită proprietăților sale electrofiziologice, acest mutant a fost numit „potențial receptor

tranzitoriu” (trp). Mai târziu, trp a fost donat și recunoscut ca o proteină transmembranară. De atunci, cercetătorii au aprofundat în înțelegerea canalelor TRP, stabilindu-le legătura cu transportul calciului și identificându-le drept canale activate de lumină, permeabile Ca²⁺. Ei au observat, 1. Canale TRP de asemenea, că proteinele asemănătoare TRP seamănă cu canalele dependente de tensiune și au confirmat prezența repetărilor anchirinei în secvențele lor de aminoacizi (M. Zhang și colab., 2023).

La începutul acestui secol, s-au făcut eforturi pentru standardizarea nomenclaturii TRP, rezultând clasificarea a 28 de gene subunități de canal în șapte subfamilii: TRPA (anchirina), TRPC (canonic), TRPV (vaniloid), TRPM (melastatin), TRPML (mucolină), TRPP (policistină) și TRPN (NO-mecano-potențial) (Venkatachalam & Montell, 2007).

1.2.1. TRPM8

TRPM8, este o genă localizată pe cromozomul 2q37.1, care codifică o proteină compusă din 1.104 aminoacizi. Această genă este esențială în codificarea unui receptor de frig și mentol, esențial pentru detectarea temperaturilor reci și a senzației de răcoare. TRPM8 este un canal ionic polimodal, ceea ce înseamnă că răspunde la diferiți stimuli, inclusiv schimbări de temperatură, tensiune, presiune, agenți de răcire precum mentolul și icilina (Pertusa și colab., 2023a) și modificările osmolarității. Aceste moduri de activare diverse subliniază complexitatea și versatilitatea TRPM8 în procesele fiziologice.

Canalul TRPM8 este un canal cationic neselectiv permeabil pentru cationi monovalenți și divalenți. Această permeabilitate este crucială în percepția senzorială, în special în detectarea frigului. Activarea TRPM8 implică mai multe căi de semnalizare, în special calea de semnalizare fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat (PIP₂), care este esențială pentru funcționarea și reglarea corespunzătoare a canalului (Izquierdo et al., 2021).

Structura moleculară a TRPM8 a fost elucidată prin tehnici avansate, cum ar fi microscopia crio-electronică. Acest canal ionic este un tetramer compus din patru subunități, fiecare conținând șase domenii transmembranare (TM1- TM6). Regiunea dintre TM5 și TM6 formează canalul, care este poros, critic pentru conducția ionică. Regiunile N-terminale și C-terminale ale TRPM8 sunt intracelulare și joacă roluri semnificative în reglarea canalelor și interacțiunea cu alte proteine (Palchevsky și colab., 2023).

TRPM8 este exprimat predominant într-un subset de neuroni senzoriali din ganglionii rădăcinii dorsale (DRG) și ganglionii trigemenali, responsabili pentru detectarea stimulilor rece și reci din mediu. Este prezent și în alte țesuturi, cum ar fi pielea, corneea și vezica urinară, contribuind la diferite răspunsuri fiziologice. TRPM8 mediază senzația de frig în aceste țesuturi

și este implicat în termotransducția rece. Când sunt activate, canalele TRPM8 permit afluxul de cationi precum Ca^{2+} , ducând la depolarizarea neuronală și transmiterea ulterioară a semnalelor reci către sistemul nervos central.

Pe lângă rolul său în percepția senzorială, TRPM8 modulează răspunsurile celulare la inflamație și durere. Interacționează cu molecule și căi de semnalizare, cum ar fi fosfolipaza C (PLC) și protein kinaza C (PKC). De exemplu, activarea TRPM8 poate modula răspunsurile inflamatorii prin afectarea producției de citokine în celulele imune. Această modulare subliniază importanța TRPM8 în menținerea homeostaziei și răspunsul la stimulii din mediu (Voets, 2007).

TRPM8 joacă un rol semnificativ în modularea durerii, în special în durerea indusă de frig. Este profund implicat în senzația și modularea durerii, contribuind în mod semnificativ la afecțiunii precum alodinia rece, în care stimulii rece nedureroși devin dureroși în urma leziunilor sau inflamației nervoase. Activarea TRPM8 de către agenți de răcire 1. TRPM8 precum mentolul este bine documentată pentru a oferi efecte analgezice. Aceste efecte nu se datorează doar activării directe a TRPM8, ci și interacțiunilor complexe cu alte căi de durere, inclusiv cele mediate de canalele TRPV1.

În contexte inflamatorii, activarea TRPM8 poate influența funcția celulelor imune. De exemplu, la macrofage, TRPM8 afectează fagocitoza și producția de citokine. În celulele T, inhibarea TRPM8 are un impact asupra producției de citokine critice precum IL-2 și IL-6, sugerând un rol regulator în răspunsurile imune. Acest rol dublu atât în căile nociceptive, cât și în cele anti-nociceptive evidențiază natura complexă a TRPM8, unde efectele sale asupra durerii pot fi foarte dependente de context, influențate de starea generală a neuronilor senzoriali și de prezența altor stimuli (Dussor & Cao, 2016).

TRPM8 este un canal ionic cu mai multe fațete, cu roluri semnificative în percepția senzorială, reglarea imună, progresia cancerului și mai multe afecțiuni clinice. Funcțiile sale diverse și mecanismele de reglementare îl fac o țintă promițătoare pentru intervenția terapeutică în diverse probleme de sănătate. Cercetările în curs privind funcțiile și mecanismele TRPM8 vor continua probabil să descopere noi oportunități pentru aplicații clinice și inovații terapeutice.

1.3. Interacțiunile între GPCRs și canale ionice

Interacțiunea dintre receptorii cuplați cu proteină G și canalele TRP reprezintă o zonă semnificativă de interes în semnalizarea celulară. În timp ce canalele GPCR și TRP au fost studiate pe larg individual pentru rolurile lor în transducerea semnalelor extracelulare și

medierea fluxurilor ionice, interacțiunile lor introduc straturi suplimentare de complexitate de reglementare și diversitate funcțională.

Interacțiunile GPCR-TRP sunt esențiale în numeroase procese fiziologice. La activarea de către diverși liganzi, GPCR-urile inițiază cascade de semnalizare care pot modula activitatea canalului TRP direct prin proteinele G sau indirect prin mesageri secundari, cum ar fi diacilglicerol (DAG) și inozitol trifosfat (IP3). Aceste interacțiuni influențează funcții critice, inclusiv percepția senzorială, reglarea cardiovasculară și răspunsurile imune (Veldhuis et al., 2015).

Înțelegerea mecanismelor din spatele interacțiunilor canalului GPCR-TRP oferă perspective asupra modului în care celulele integrează semnale multiple pentru a menține homeostazia și a răspunde la schimbările de mediu. Dereglarea acestor căi poate duce la diferite afecțiuni patologice, inclusiv durere cronică, inflamație și boli cardiovasculare, evidențiind potențialul terapeutic al țintirii acestor interacțiuni.

Interacțiunile dintre receptorii cuplați cu proteina G (GPCR) și canalele potențiale de receptor tranzitoriu (TRP) implică mecanisme complexe de semnalizare care permit celulelor să se integreze și să răspundă la diverși stimuli externi. Aceste interacțiuni apar prin mai multe căi, fiecare adăugând straturi de complexitate de reglementare și diversitate funcțională.

Un mecanism principal este cuplarea directă a proteinei G. La activarea de către liganzii respectivi, GPCR-urile suferă modificări conformaționale care facilitează activarea proteinelor G heterotrimerice. Subunitățile activate $G\alpha$ și $G\beta\gamma$ pot interacționa direct cu canalele TRP, modulând activitatea acestora (Zhao & MacKinnon, 2023). De exemplu, s-a demonstrat că subunitatea $G\alpha_i$ activează direct canalele TRPC4 și TRPC5, reglând în mod 1. GPCR și interacțiuni cu canale ionice semnificativ tonusul vascular și funcția cardiacă. Această cuplare directă permite modularea rapidă și precisă a activității canalului TRP ca răspuns la semnalele extracelulare (Kang și colab., 2024).

O altă cale semnificativă implică activarea fosfolipazei C (PLC). La activarea GPCR, subunitatea $G\alpha_q$ activează PLC, ducând la hidroliza fosfatidilinozitolului 4,5-bisfosfat (PIP2) în diacilglicerol (DAG) și inozitol trifosfat (IP3). DAG poate activa direct canale TRP specifice, cum ar fi TRPC3, TRPC6 și TRPC7, care sunt implicate în procese precum contracția mușchilor netezi și proliferarea celulară (Veldhuis et al., 2015). IP3 facilitează eliberarea de calciu din depozitele intracelulare, care pot modula indirect activitatea canalului TRP prin modificarea concentrației intracelulare de calciu. Această cale PLC exemplifică modul în care GPCR-urile pot influența indirect funcția canalului TRP prin mesageri secundari, legând semnalele extracelulare de dinamica Ca^{2+} intracelular (Clapham, 2003).

Activarea GPCR poate genera mesageri secundari, cum ar fi AMP ciclic (cAMP) și poate activa protein kinaze precum PKA și PKC. Acești mesageri secundari și kinaze pot fosforila canalele TRP, modulând activitatea lor. De exemplu, canalele TRPV1, critice în percepția durerii, pot fi sensibilizate de PKA și PKC după activarea GPCR de către mediatori inflamatori precum bradikinina (Montell, 2005). Această sensibilizare îmbunătățește capacitatea de răspuns a canalului la stimuli nocivi, ilustrând rolul interacțiunilor GPCR-TRP în amplificarea semnalelor senzoriale în condiții inflamatorii (Ramsey și colab., 2006). În schimb, activarea receptorilor cuplați cu *Gai* scade activitatea adenilil ciclază, reducând nivelurile de AMPc și activarea ulterioară a PKA. Această cale este implicată în efectele analgezice periferice ale opioidelor și canabinoizilor prin acțiunea lor asupra receptorilor cuplați cu *Gai*, ceea ce reduce curenții receptorilor TRPV1 (Salzer et al., 2019).

Un exemplu de reglare mediată de GPCR-uri este modularea TRPM8, unul dintre punctele centrale ale acestei teze. Reglarea TRPM8 de către GPCR cuprinde o varietate de mecanisme complexe care evidențiază rolul canalului în funcțiile senzoriale și non-senzoriale. O cale proeminentă implică derivatul hormonului tiroidian 3-iodotironina (3-T1AM), care poate modula TRPM8 direct sau prin semnalizare mediată de receptorul β -adrenergic. Această interacțiune implică subunitățile $\beta\gamma$ ale proteinelor Gi/o, rezultând niveluri crescute de calciu intracelular și inhibarea activității TRPV1, prezentând astfel un potențial efect antiinflamator. Interacțiunea complexă dintre TRPM8 și TRPV1 sugerează o rețea de reglementare nuanțată influențată de 3-T1AM, care are un impact atât asupra termoreglării, cât și asupra răspunsurilor inflamatorii (Khajavi et al., 2017).

Reglarea TRPM8 mediată de GPCR implică, de asemenea, calea PIP2. Activarea canalelor TRPM8 duce la afluxul de calciu, care activează PLC. Această activare are ca rezultat hidroliza PIP2, o lipidă critică pentru funcția TRPM8, reducând astfel activitatea canalului. Reziduurile specifice din TRPM8, cum ar fi R688, R850 și R997, sunt esențiale pentru legarea PIP2, evidențiind semnificația acestei interacțiuni (Pertusa și colab., 2023b). În plus, căile care implică adrenoreceptorul α 2A (α 2A-AR) și proteinele Gi duc la scăderea nivelurilor cAMP și la reducerea activității PKA, culminând cu inhibarea TRPM8. Această cale subliniază echilibrul complicat al evenimentelor de semnalizare intracelulară care reglează fin activitatea TRPM8 ca răspuns la diverși stimuli (Bavencoffe și colab., 2010).

În plus, inhibarea directă a TRPM8 de către subunitatea $G\alpha_q$ reprezintă un mecanism de reglare unic. Mediatorii inflamatori, cum ar fi bradikinina, utilizează această cale prin activarea receptorilor bradikininei, unde $G\alpha_q$ se leagă direct de TRPM8, provocând o schimbare conformațională care inhibă activitatea canalului. Această interacțiune ocolește căile de

semnalizare convențională, subliniind specificitatea Gαq în modularea TRPM8 (X. Zhang și colab., 2012). În plus, liganzii endogeni, cum ar fi anandamida și N-arachidonol-dopamina (NADA), care acționează prin receptorii canabinoizi precum CB1, funcționează ca antagoniști ai TRPM8, evidențiind și mai mult peisajul de reglementare divers (De Petrocellis și colab., 2007). Modularea TRPM8 prin diferite căi GPCR ilustrează rolul său esențial în percepția senzorială, în special în senzația de frig și durere. Deschide căi pentru potențiale intervenții terapeutice care vizează hiperalgezia inflamatorie și alodinia rece.

Pasul inițial în investigarea interacțiunilor dintre GPCR și canalele TRP implică stabilirea unor teste experimentale robuste și precise. Acest proces necesită selecția meticuloasă și optimizarea condițiilor de analiză pentru a reflecta cu acuratețe mediul fiziologic și pentru a asigura reproductibilitatea și fiabilitatea rezultatelor.

Tehnicile utilizate în mod obișnuit pentru a studia interacțiunile GPCR-TRP sunt testele de co-immunoprecipitare (Co-IP) și pull-down. Aceste metode detectează și confirmă interacțiunile proteină-proteină în probele biologice. De exemplu, Zhang (2019) a folosit teste pull-down pentru a demonstra interacțiunea dintre subunitatea Gαq și canalul TRPM8, aruncând lumină asupra mecanismelor de semnalizare care reglează canalele TRP de către GPCR-urile cuplate cu Gq (X. Zhang, 2019).

Cu toate acestea, nu toate interacțiunile GPCR-TRP implică contact direct; multe sunt funcționale, necesitând tehnici precum electrofiziologia și imagistica de calciu pentru a studia aceste interacțiuni funcționale în mod cuprinzător. Aceste metode sunt utilizate pe scară largă datorită rezoluției lor înalte în măsurarea activității canalelor ionice și a dinamicii calciului intracelular. Ele sunt adesea combinate cu studii farmacologice care utilizează agoniști și antagoniști și studii comportamentale in vivo pentru a înțelege aceste interacțiuni în mod cuprinzător (Quallo et al., 2017).

Interacțiunile dintre GPCR și canalele TRP sunt promițătoare în descoperirea medicamentelor, oferind numeroase oportunități pentru intervenții terapeutice noi. Înțelegerea diafoniei complicate dintre aceste familii de receptori poate duce la identificarea de noi ținte de medicamente și la proiectarea agenților farmacologici mai eficienți și specifici.

Studierea mecanismelor modulatorie ale interacțiunilor GPCR-TRP oferă oportunități pentru dezvoltarea medicamentelor cu specificitate și eficacitate sporite. Această abordare poate ajusta cu precizie căile de semnalizare specifice și poate minimiza efectele secundare. Studierea interacțiunilor în care GPCR-urile influențează activitatea canalului TRP indirect prin mesageri secundari sau direct prin interacțiuni proteină-proteină oferă noi căi pentru crearea unor intervenții terapeutice precise. Aceste mecanisme de modulare pot oferi opțiuni de

direcționare mai selective, ceea ce poate duce la mai puține efecte secundare și la îmbunătățirea rezultatelor pacientului. Această strategie este deosebit de promițătoare pentru afecțiuni precum durerea cronică, în care terapiile tradiționale ar putea eșua să ofere o ameliorare eficientă fără efecte adverse.

Progresele în tehnologiile și testele de screening cu randament ridicat au facilitat identificarea de noi compuși care modulează interacțiunile GPCR-TRP, accelerând procesul de descoperire a medicamentelor. Aceste tehnologii permit screening-ul eficient al bibliotecilor mari de compuși, identificând potențialii candidați la medicamente care vizează aceste interacțiuni. Potențialul de sinergie farmacologică, în care medicamentele vizează atât canalele GPCR, cât și canalele TRP, poate duce la efecte terapeutice mai mari, în special în tratarea bolilor complexe care implică mai multe căi de semnalizare, cum ar fi cancerul și tulburările neurodegenerative.

Înțelegerea interacțiunilor GPCR-TRP contribuie la medicina personalizată prin identificarea anomaliilor de semnalizare specifice pacientului. Aceste cunoștințe permit dezvoltarea de terapii personalizate care abordează nevoile individuale în mod mai eficient, îmbunătățind rezultatele terapeutice și reducând probabilitatea efectelor adverse.

În concluzie, studierea interacțiunilor canalelor GPCR-TRP este esențială în farmacologia modernă și dezvoltarea terapeutică. Aceste interacțiuni oferă numeroase oportunități pentru dezvoltarea unor tratamente eficiente pentru diferite boli. Dirijarea acestor interacțiuni, de la gestionarea durerii la sănătatea cardiovasculară, poate duce la progrese medicale semnificative.

Capitolul 2. MATERIALE ȘI METODE

În acest studiu, nivelurile de cAMP intracelular au fost măsurate folosind tehnologia GloSensor™ de la Promega, utilizând în mod specific varianta pGlo22F (Figura 3). Acest biosenzor este proiectat prin fuzionarea domeniilor de legare a cAMP la o formă mutantă de luciferază derivată din licuriciul *Photinus pyralis*. La legarea cAMP, biosenzorul suferă modificări conformaționale care cresc semnificativ luminescența, oferind o măsură foarte sensibilă și cuantificabilă a cAMP intracelular.

Celulele HEK293T au fost cultivate în Mediu Eagle Modificat Dulbecco (DMEM) suplimentat cu ser fetal bovin 10% și însămânțate în plăci cu 96 de godeuri. În ziua următoare, celulele au fost transfectate cu plasmide care codifică sonda bioluminiscentă p22F sensibilă la AMPc și proteinele membranare de interes folosind Lipofectamine 2000. După o perioadă de

incubare de 48 de ore, mediul a fost înlocuit cu soluție de sare echilibrată Hank (HBSS) suplimentată cu luciferină-h, clorură de calciu și glucoză. Celulele au fost apoi incubate pentru încă 2 ore la temperatura camerei în întuneric pentru a minimiza potențiala interferență luminoasă. După stimularea ligandului, nivelurile cAMP au fost cuantificate prin măsurarea semnalului bioluminescent utilizând un cititor de plăci cu 96 de godeuri, cu rezultatele exprimate în unități de luminiscentă relativă (RLU).

Pentru determinarea calciului intracelular, am folosit un indicator de calciu codificat genetic, G5A (Figura 5), așa cum este descris într-un studiu anterior de (Baubet și colab., 2000). Acest biosenzor este o fuziune între proteina verde fluorescentă (GFP) și aequorin, o proteină bioluminescentă sensibilă la calciu derivată din meduze. Biosenzorul G5A funcționează pe baza principiului transferului de energie de rezonanță a bioluminescenței (BRET), în care legarea calciului de aequorin induce o schimbare conformațională care are ca rezultat emisia de lumină albastră. Această energie este transferată ulterior către GFP, ceea ce duce la emisia de lumină verde. Celulele HEK293T au fost transfectate cu plasmide care codifică biosenzorul G5A și proteine de membrană specifice. După 48 de ore, mediul de creștere a fost înlocuit cu HBSS suplimentat cu coelenterazină h, clorură de calciu și glucoză, iar celulele au fost incubate la 37°C timp de 2 ore pentru a menține stabilitatea și funcționalitatea proteinei de fuziune G5A. După stimularea ligandului, nivelurile de calciu intracelular au fost înregistrate prin captarea semnalului bioluminescent utilizând un cititor de plăci FlexStation 3. Datele rezultate au fost analizate pentru a calcula aria sub curba tranzitorie a calciului (AUC), oferind o cuantificare cuprinzătoare a dinamicii semnalizării calciului în interiorul celulelor.

Capitolul 3. REZULTATE

3.1. Etapa de optimizare

Primul pas în dezvoltarea unui test bazat pe luminiscentă pentru determinarea cAMP este selecția țintei și optimizarea testului. Ca țintă, am ales receptorul de prostacilină (IP-R) pentru determinarea cAMP intracelular datorită rolului său bine documentat ca GPCR cuplat cu Gs. Acest experiment ne-a permis să verificăm fiabilitatea testului. Am folosit celule HEK293T, transfectate tranzitoriu cu IP-R uman și am evaluat efectul a 1 pM de compus

specific sintetic cicaprost. După cum se arată în Figura 3, prezența cicaprost a condus la o creștere semnificativă a nivelurilor cAMP, indicând activitatea constitutivă minimă a IP-R.

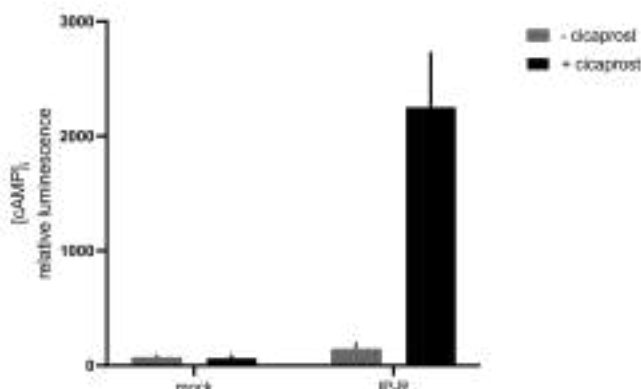


Figura 3. Efectul pre-incubării cu 1 μ M cicaprost timp de 10 minute asupra acumulării de cAMP în celulele HEK293T care exprimă IP-R împreună cu pGlo22F. Exprimat ca medie \pm SEM, n=32

În continuare, am ales un alt GPCR, GPR101, cunoscut pentru activitatea sa constitutivă. Pentru a investiga acest lucru, am analizat activitatea GPR101 în celulele CHO transfectate tranzitoriu cu GPR101 și pGlo22F. După cum era de așteptat, în absența stimulării ligandului, celulele care exprimă GPR101 prezintă niveluri crescute de AMPc, așa cum se arată în Figura 4 (a). Această activitate constitutivă a oferit un model valoros pentru evaluarea performanței testului nostru, făcând distincție între activitatea constitutivă și efectele stimulate de ligand.

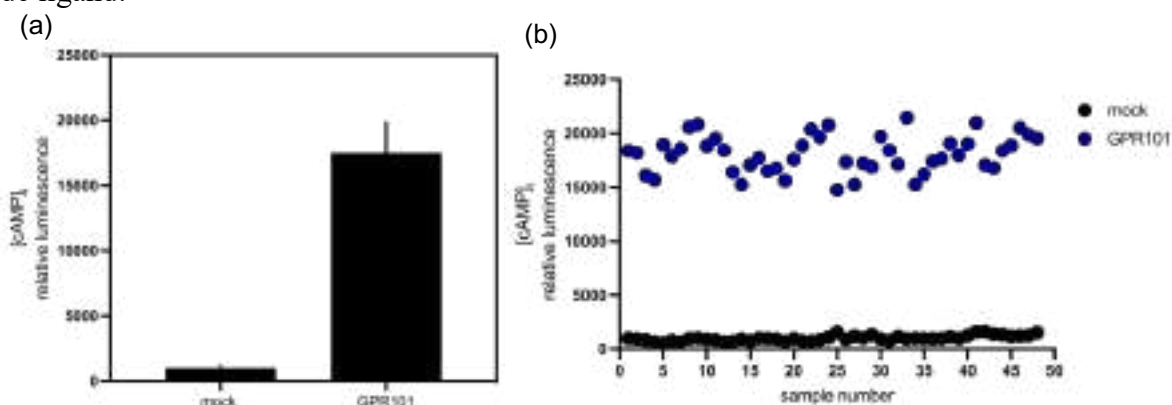


Figura 4. (a) Activitatea constitutivă a celulelor CHO care exprimă GPR101. Datele sunt prezentate ca medii \pm SEM, n=48; (b) Distribuția datelor pentru celulele CHO care exprimă GPR101 în absența stimulării ligandului. Datele sunt prezentate ca luminiscentă relativă, n=48

Pentru a valida în continuare fiabilitatea testului pentru potențialele campanii de screening cu randament ridicat (HTS), am calculat parametrii esențiali, inclusiv abaterea standard, coeficientul de variație și factorul Z'. După cum este ilustrat în Figura 4 (b), datele

obținute au fost consistente, indicând precizia testului. Tabelul 1 prezintă parametrii calculați pentru acest experiment, cu factorul Z' măsurat la 0,59. Această valoare confirmă robustețea și adecvarea testului pentru aplicațiile HTS, asigurând detectarea fiabilă și reproductibilă a nivelurilor cAMP.

| | mock | GPR101 |
|--------------------|-------------|---------------|
| Average (RLU) | 981,5 | 17906 |
| Median (RLU) | 955 | 17945 |
| Standard deviation | 205 | 2105 |
| CV % | 0,21 | 0,12 |
| Maximum | 1410 | 22960 |
| Minimum | 610 | 12450 |
| S: N | | 82,39 |
| S: B | | 18,24 |
| Signal window | | 4,748 |
| Z' score | | 0,59 |

Tabelul 1. Caracterizarea valorilor HTS pentru celulele CHO care exprimă GPR101 în absența stimulării ligandului. RLU – unități de luminiscentă relativă, CV % – procentul coeficientului de variație, S:N – semnal-zgomot, S:B – semnal-fond

Pentru analiza de determinare a calciului intracelular, am folosit un alt GPCR cuplat cu Gq bine descris, și anume receptorul M3 uman (hM3). Celulele HEK293T care exprimă receptorul hM3 și sonda de calciu G5A au fost stimulate cu 30 μ M agonist selectiv carbacol pentru a măsura activitatea acestuia. După cum se arată în Figura 5 (a), carbacolul a crescut semnificativ tranzitorii de calciu intracelular în celulele care exprimă hM3 cu G5A. Acest răspuns robust a demonstrat capacitatea testului de a detecta cu precizie fluxul de calciu.

Datele obținute din aceste experimente au fost utilizate în continuare pentru a măsura valorile HTS, care sunt esențiale pentru evaluarea fiabilității testului în aplicații la scară largă (Figura 5 (b)). Scorul Z calculat pentru acest experiment a fost 0,62, așa cum este prezentat în Tabelul 2. Acest scor Z' indică un rezultat de încredere, confirmând că testul este precis și potrivit pentru aplicațiile HTS.

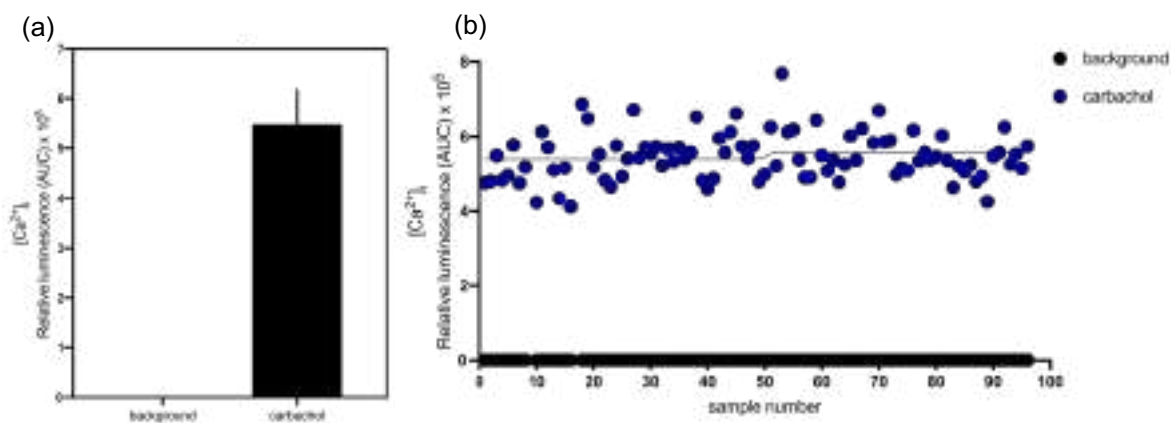


Figura 5. (a) Efectul carbacolului 30 M asupra celulelor HEK293T care exprimă receptorul M3 uman. Datele sunt prezentate ca medii \pm SEM, n=96; (b) Distribuția datelor pentru celulele HEK293T care exprimă receptorul hM3. Datele au exprimat luminescența relativă, n=96

| | background | carbachol |
|--------------------|-------------------|------------------|
| Average (AUC) | 26,826851 | 548302,4407 |
| Median (AUC) | 0 | 541454,2928 |
| Standard deviation | 40 | 68265,78991 |
| CV % | 1,49 | 0,12 |
| Maximum | 217,39 | 806746,8634 |
| Minimum | 0 | 411809,8174 |
| S: N | | 13750,92849 |
| S: B | | 20438,56878 |
| Signal window | | 5,029732005 |
| Z' score | | 0,62 |

Tabelul 2. Caracterizarea parametrilor HTS pentru celulele HEK293T care exprimă hM3 în prezența stimulării cu carbocol 30 M. RLU – unități de luminescență relativă, CV % – procentul coeficientului de variație, S:N – semnal-zgomot, S:B – semnal-fond

Pentru a confirma în continuare fiabilitatea testului, am aplicat aceeași abordare experimentală pentru a măsura activitatea receptorului GPR40, un GPCR care se cuplează predominant cu proteinele Gq/11, ceea ce duce la creșterea nivelului de calciu intracelular. Am stimulat celulele CHO care exprimă receptorul GPR40 și G5A folosind trei liganzi endogeni: acid palmitoleic, palmitat de sodiu și acid linoleic. După cum se arată în Figura 6 (a), această stimulare a crescut nivelul de calciu intracelular, acidul linoleic inducând un efect distinct în comparație cu celelalte. Ulterior, am evaluat efectul unui compus sintetic specific foarte puternic, TAK-895. După cum se demonstrează în Figura 6 (b), TAK-895 a provocat un

răspuns semnificativ mai mare decât acidul linoleic, cu o creștere de aproximativ zece ori. Acești compuși au fost utilizați precum controale în campanii de screening pentru un proiect care vizează reutilizarea medicamentelor aprobate de FDA pentru tratarea diabetului de tip 2.

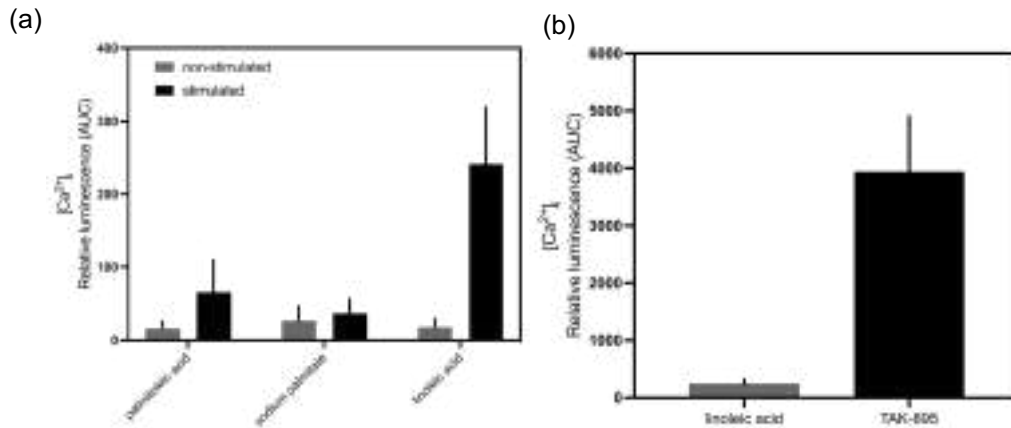


Figura 6. (a) Efectul liganzilor endogeni asupra celulelor CHO care exprimă GPR40. Date exprimate ca medii \pm SEM, n=16; (b) Comparație între efectul 100 M de acid linoleic și 0,3 M TAK-895. Datele sunt prezentate ca medii \pm SEM, n=96

Am investigat în continuare impactul acidului oleic, un alt ligand endogen al GPR40, asupra celulelor CHO pentru a-i evalua activitatea. După cum se arată în Figura 7, când celulele CHO care exprimă atât GPR40, cât și sonda sensibilă la calciu au fost stimulate cu concentrații crescătoare de acid oleic, a existat o creștere marcată a activității în comparație cu celulele care exprimă doar sonda sensibilă la calciu. Acest experiment a fost realizat ca parte a unui studiu mai larg care vizează înțelegerea rolului GPR40 în reglarea TRPV1 indusă de acidul oleic.

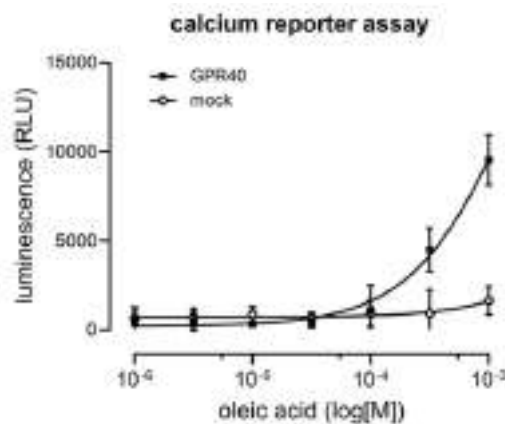


Figura 7. Efectul concentrațiilor crescătoare de acid oleic asupra celulelor CHO care coexprimă GPR40 și sonda sensibilă la calciu, G5A. Datele reprezentate ca medii \pm SEM a n \geq 3 transfecții și măsurători independente. Din Sendetski et al., 2024

Testul pentru determinarea calciului intracelular a fost conceput inițial pentru a evalua activitatea GPCR. Pentru a explora aplicabilitatea sa pentru ținte non-GPCR, i-am evaluat performanța cu TRPM8, un canal ionic care crește nivelul de calciu intracelular. Am aplicat aceeași abordare experimentală folosind celule HEK293T care exprimă TRPM8 și G5A uman. Compusul sintetic icilin a servit ca agonist (Figura 8 a, b).

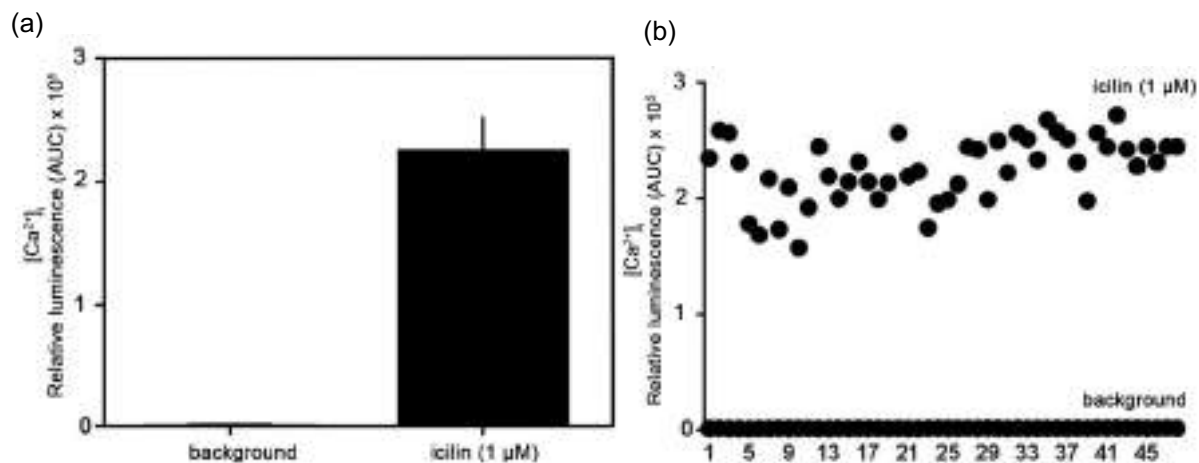


Figura 8. (a) Efectul icilinei asupra celulelor HEK293T care exprimă TRPM8 și G5A uman. Date exprimate ca medii ± SEM, n=48; (b) Distribuția datelor pentru răspunsul indus de icilină în celulele HEK293T care exprimă TRPM8 și G5A uman. Date exprimate ca luminiscentă relativă, n=48

| | background | TRPM8 |
|--------------------|------------|-------------|
| Average (RLU) | 982,7 | 224653 |
| Median (RLU) | 960 | 231244 |
| Standard deviation | 205 | 30875,1 |
| CV % | 0,21 | 0,14 |
| Maximum | 1410 | 278839 |
| Minimum | 610 | 144579 |
| S: N | | 1090,2 |
| S: B | | 228,605 |
| Signal window | | 4,2244 |
| Z' score | | 0,58 |

Tabelul 3. Caracterizarea valorilor HTS pentru răspunsul indus de icilină în celulele HEK293T care exprimă TRPM8 și G5A uman. RLU – unități de luminiscentă relativă, CV % – procentul coeficientului de variație, S:N – semnal-zgomot, S:B – semnal-fond

Etapele de optimizare au fost esențiale pentru determinarea condițiilor experimentale necesare pentru rezultate fiabile și reproductibile. Aceste condiții optimizate au fost apoi aplicate în continuare la studiile ulterioare de validare și caracterizare a țintei, asigurând consistența și acuratețea tuturor experimentelor

3.2. Interacțiunea funcțională dintre IP-R și TRPM8

A doua parte a acestei teze explorează potențiala interacțiune funcțională dintre receptorul de prostaciclina (IP-R) și canalul ionic TRPM8. Această investigație se bazează pe expresia lor suprapusă în anumite tipuri de celule și pe rolurile lor opuse în mediarea durerii inflamatorii. Activarea IP-R promovează în general inflamația, în timp ce activarea TRPM8 poate reduce senzația de durere.

Am exprimat heterolog TRPM8 și IP-R pentru a studia această interacțiune în celulele HEK293T. Celulele au fost apoi incubate cu concentrații crescânde de cicaprost pentru a activa IP-R timp de 10 minute. După această incubare, am măsurat impactul activării IP-R asupra activității TRPM8 prin evaluarea nivelurilor intracelulare de calciu după stimularea TRPM8 cu icilină 1 μ M. După cum este ilustrat în Figura 9, rezultatele au arătat concentrațiile crescânde de cicaprost care au condus la o inhibare completă a activității TRPM8. Răspunsul a fost dependent de doză, confirmând validitatea acestor constatări.

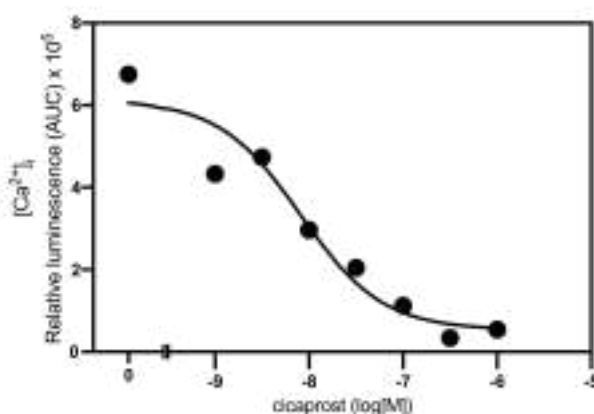


Figura 9. Efectul pre-incubării cu concentrații crescătoare de cicaprost asupra calciului intracelular evocat de activarea TRPM8 indusă de 1 M icilină în celulele HEK293T care exprimă TRPM8 și IP-R, împreună cu G5A. Datele prezentate ca medii \pm SEM, n=6

Pentru a exclude posibilitatea ca efectele observate să se datoreze interferenței cicaprost cu TRPM8 fie ca agonist, fie ca antagonist, am efectuat experimente de control folosind celule HEK293T care exprimă doar TRPM8 fără IP-R. Într-un experiment, am măsurat direct efectul cicaprost asupra activității TRPM8. După cum se arată în Figura 10 1. Interacțiunea funcțională

între IP-R și TRPM8 (a), creșterea concentrațiilor de cicaprost nu a avut niciun impact asupra activității TRPM8, indicând faptul că cicaprost nu acționează ca un agonist pentru TRPM8.

Apoi, am testat dacă cicaprost ar putea acționa ca un antagonist folosind aceeași configurație experimentală în care a fost observată inhibarea TRPM8. Am preincubat celulele care exprimă TRPM8 cu concentrații crescânde de cicaprost și apoi le-am stimulat cu icilină 1 μ M. După cum este ilustrat în Figura 10 (b), tranzitorii de calciu au rămas mari în ciuda preincubării cu cicaprost, demonstrând că cicaprost nu funcționează ca un antagonist.

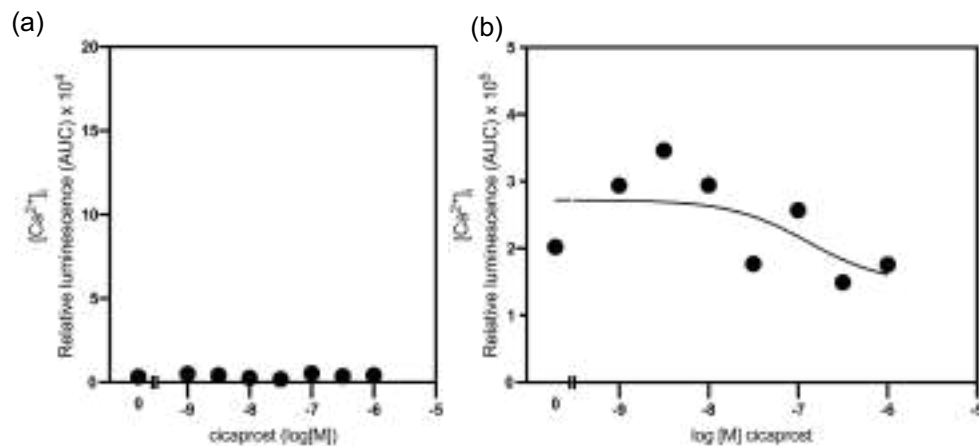


Figura 10. (a) Efectul pre-incubării cu concentrații crescătoare de cicaprost asupra activării TRPM8 în celulele HEK293T care exprimă TRPM8 împreună cu G5A. Datele prezentate ca medii \pm SEM, n=3; (b) Efectul pre-incubării cu concentrații crescânde de cicaprost asupra calciului intracelular evocat de activarea TRPM8 indusă de icilină 0,3 M în celulele HEK293T care exprimă TRPM8 împreună cu G5A.

Datele prezentate ca medii \pm SEM, n=3

Toate datele prezentate până acum indică o inhibare specifică a funcției canalului TRPM8 de către agoniștii receptorului IP. Am efectuat un experiment de profilare farmacologică pentru a elucida în continuare tipul de inhibare exercitat de agoniștii receptorilor IP pe canalele TRPM8. Celulele HEK293T care coexprimă receptorii TRPM8 și IP, împreună cu G5A, au fost pre-incubate cu concentrații crescânde de cicaprost timp de 10 minute. Ulterior, TRPM8 a fost stimulat cu concentrații crescânde de icilină.

Datele rezultate, prezentate în Figura 11, demonstrează că pre-incubarea cu cicaprost conduce la o inhibare dependentă de doză a activității TRPM8, chiar și la concentrații mai mari de icilină. Creșterea concentrației de cicaprost de la 1 nM la 100 nM a dus la o scădere marcată a eficacității icilinei, în timp ce potența sa a rămas neschimbată. Această inhibare dependentă de doză sugerează că inhibarea are loc într-un mod necompetitiv. Aceste constatări susțin ipoteza că reglarea negativă a activității TRPM8 de către IP-R are loc printr-un mediator celular

sau un mecanism de semnalizare care nu presupune competiție directă la locul de legare a icilinei al TRPM8.

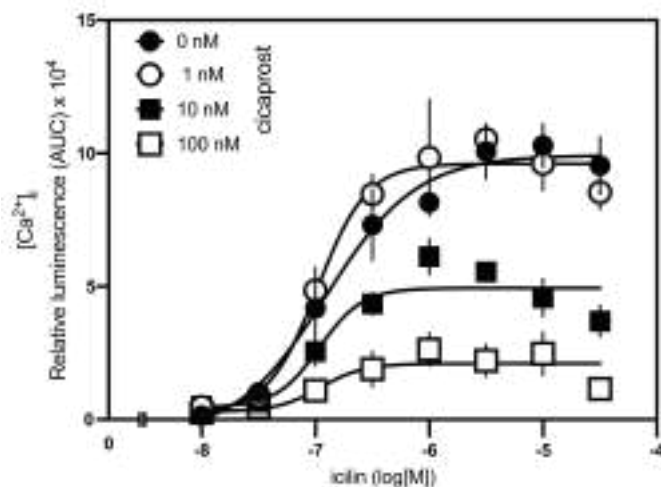


Figura 11. Efectul concentrațiilor crescătoare de icilină asupra tranzițiilor intracelulare de calciu în prezența pre-incubării cu concentrații crescătoare de cicaprost în celulele HEK293T care exprimă heterolog TRPM8, IP-R și G5A. Datele prezentate ca medii \pm SEM, n=3

Pentru a confirma în continuare implicarea IP-R în inhibarea activității TRPM8, am testat efectul unui antagonist competitiv selectiv al IP-R, Cay10444. Celulele HEK293T care coexprimă TRPM8 și IP-R au fost pre-incubate cu 3 μ M de Cay10444 timp de 20 de minute înainte de o preincubare ulterioară de 10 minute cu 1 μ M cicaprost. După acest tratament, am măsurat tranzițiile de calciu după activarea TRPM8 cu 1 μ M icilină.

După cum se arată în Figura 12 (a), pre-incubarea cu Cay10444 a restabilit în mod eficient activitatea TRPM8, indicând faptul că inhibarea a fost mediată în mod specific prin IP-R. Acest rezultat a fost coroborat în continuare de un experiment suplimentar în care am folosit concentrații crescânde de Cay10444. Datele au prezentat un răspuns dependent de doză, așa cum este ilustrat în Figura 12 (b), furnizând dovezi că Cay10444 poate antagoniza competitiv inhibarea activității TRPM8 de către cicaprost.

În plus, așa cum este ilustrat în Figura 12 (c), un experiment de colaborare a arătat că impactul inhibitor al cicaprost asupra canalelor TRPM8 a prezentat o deplasare spre dreapta în raport cu influența sa asupra acumulării de cAMP. Această observație implică inhibarea TRPM8 de către receptorii IP activați de cicaprost poate angaja alte mecanisme intracelulare dincolo de calea de semnalizare Gs-cAMP. Aceste descoperiri oferă dovezi convingătoare că inhibarea TRPM8 mediată de cicaprost este determinată în mod explicit de activarea IP-R, implicând potențial mediatori intracelulari alternativi.

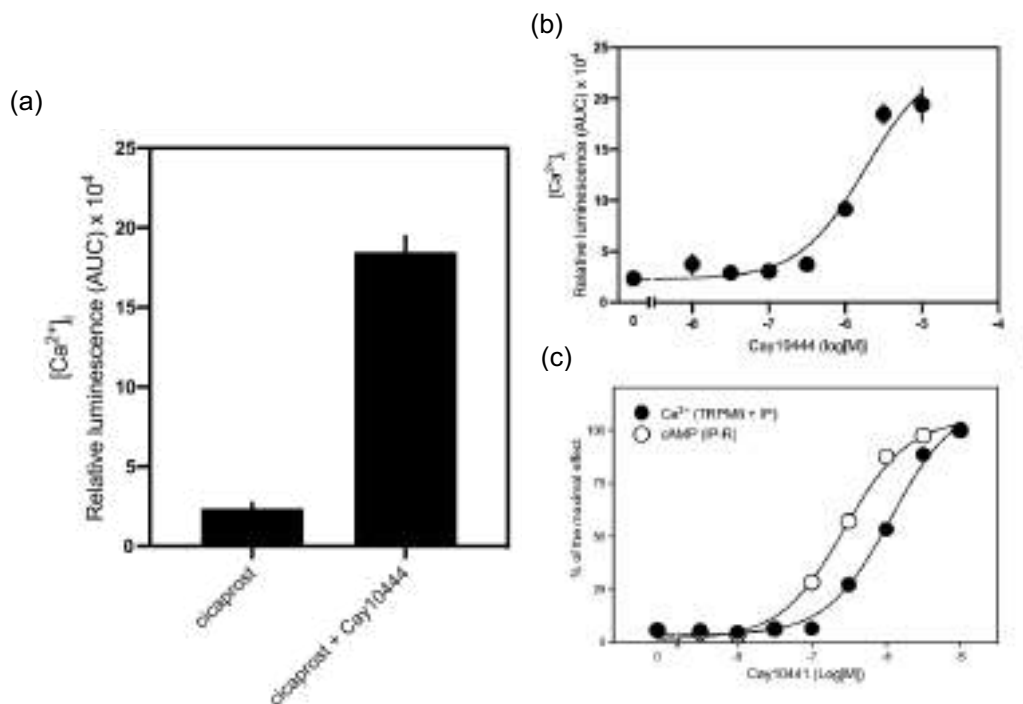


Figura 12. (a) Efectul 3 μM Cay10444 asupra inhibării TRPM8 mediată de cicaprost 1 μM . Datele prezentate ca medii \pm SEM, $n=3$; (b) Efectul creșterii concentrațiilor de Cay10444 asupra inhibării TRPM8 mediată de cicaprost. Date exprimate ca medii \pm SEM, $n=3$; (c) Măsurarea normalizată a efectului creșterii concentrațiilor de Cay10441 asupra acumulării de cAMP indusă de cicaprost în celulele HEK293T care exprimă heterolog receptorii IP și pGlo-22F în comparație cu creșterile induse de icilină ale calciului intracelular în celulele care coexprimă canalele TRPM8 și receptorii IP; împreună cu G5A și pre-tratat cu 1 μM cicaprost timp de 10 minute. Date exprimate ca medii \pm SEM, $n=5$. Figură adaptată după Trif et al., 2024

Toate experimentele au fost efectuate cu o perioadă de pre-incubare de 10 minute cu cicaprost, pe baza timpului necesar pentru acumularea cAMP. Pentru a investiga în continuare dependența de timp a implicării IP-R în inhibarea TRPM8, am măsurat efectul pre-incubării cu cicaprost în diferite momente de timp. După cum este ilustrat în Figura 13, inhibarea TRPM8 de către cicaprost prin receptorii IP a fost într-adevăr dependentă de timp. Datele au arătat o jumătate de timp de aproximativ 5 minute pentru pre-incubarea celulelor HEK293T care exprimă receptorii TRPM8 și IP cu 1 pM cicaprost. Această constatare confirmă faptul că efectul inhibitor este legat de durata activării IP-R, susținând în continuare rolul IP-R în modularea activității TRPM8.

De asemenea, am investigat posibilitatea selectivității funcționale a cicaprost prin evaluarea agoniștilor sintetici ai receptorilor IP și a analogilor de prostaglandină, inclusiv iloprost, beraprost și treprostinil. După cum se arată în Figura 14a, toți agoniștii receptorului IP testați au inhibat activarea TRPM8 indusă de icilină. În plus, în experimentele realizate în

colaborare în aceleași condiții experimentale, acești agoniști au demonstrat o inhibare dependentă de doză a activării TRPM8 indusă de icilină (Figura 14 b), coroborând descoperirile anterioare. Având în vedere absența diferențelor semnificative în răspunsul maxim și potența dintre compușii testați, am selectat cicaprost pentru experimentele ulterioare datorită utilizării pe scară largă și stabilității chimice ca agonist IP.

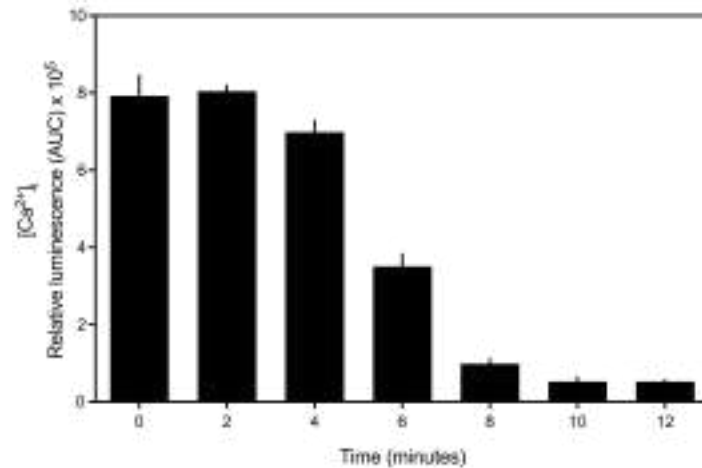


Figura 13. Dependența de timp a inhibării TRPM8 cu 1 pM cicaprost în celulele HEK293T care coexprimă TRPM8, IP și G5A, urmată de stimulare cu 1 pM icilină. Datele sunt prezentate ca medii ± SEM; n = 5. Figură adaptată din Trif și colab., 2024

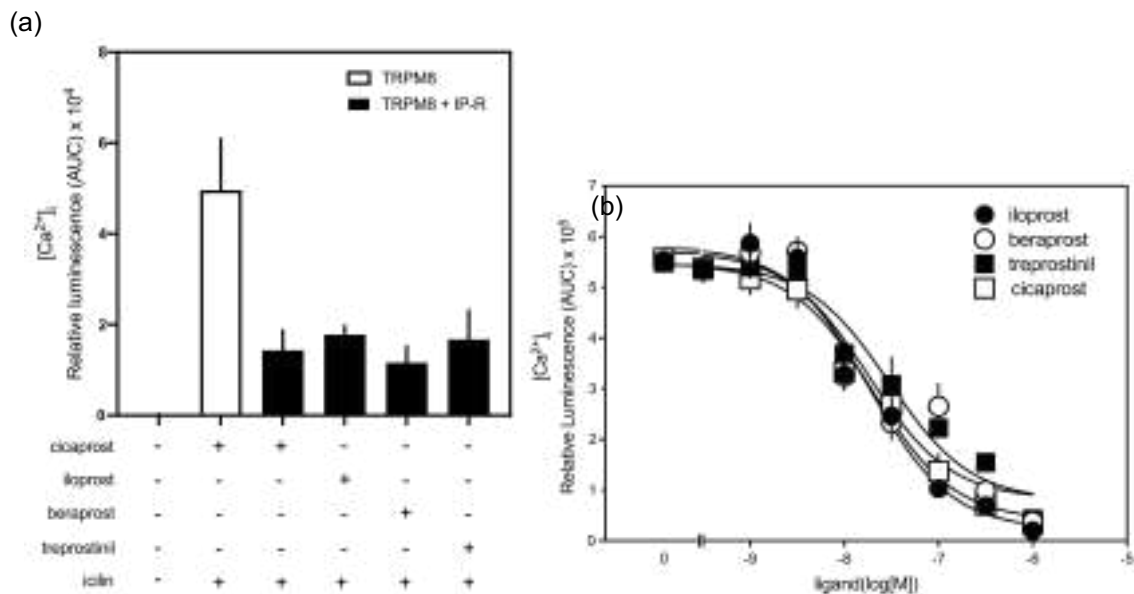


Figura 14. (a) Impactul IP-R sintetic asupra activării TRPM8 indusă de icilină. Celulele HEK293T care coexprimă canale TRPM8 cu receptori IP și G5A au fost tratate cu 1 pM din analogii de prostaciclina desemnați timp de 10 minute, urmată de activarea TRPM8 cu 1 pM icilină. Datele prezentate ca medii ± SEM; n = 16; (b) Efectul creșterii concentrațiilor de agoniști IP-R sintetici asupra activării TRPM8 indusă de icilină. Datele prezentate ca medii ± SEM; n = 5. Figură adaptată după Trif et al., 2024

Pe baza datelor anterioare care arată că funcția TRPM8 nu este afectată de nivelurile crescute de cAMP intracelular sau proteinele Gs, am căutat să explorăm rolul căii mediate de proteine Gq/11 în reglarea negativă a canalelor TRPM8 de către receptorii IP. Am prestimulat celulele HEK293T care exprimă atât receptorii TRPM8, cât și IP cu 1 pM cicaprost timp de 10 minute și apoi am tratat celulele cu blocantul Gq/11 YM254890.

Pretratamentul cu YM254890 a restabilit eficient activitatea TRPM8 ca răspuns la icilină, așa cum se arată în Figura 15 (a). Acest lucru indică faptul că efectul inhibitor al activării receptorului IP asupra TRPM8 este mediat prin proteinele Gq/11. Prin blocarea căii Gq/11, am putea anula reglarea negativă impusă de receptorii IP pe canalele TRPM8.

Acest experiment a investigat în continuare rolul căii mediate de proteine Gq/11 prin evaluarea efectelor diversilor inhibitori farmacologici (Figura 15 b) asupra reglării în jos a canalelor TRPM8 prin receptorii IP, pre-activați cu 1 μM cicaprost timp de 10 minute. În celulele HEK293T care exprimă receptorii TRPM8 și IP, pretratamentul cu galeină, un inhibitor al subunităților βγ a proteinei G, nu a inversat inhibarea funcției TRPM8 indusă de cicaprost prin agoniștii receptorului IP. În mod similar, blocarea PLCβ cu U-73122 și inhibarea protein kinazelor cu PP2 nu au împiedicat suprimarea funcției TRPM8 de către agoniștii receptorului IP. În schimb, inhibitorul Gq/11 YM254890 ar putea restabili complet activitatea TRPM8 ca răspuns la icilină, în concordanță cu constatările experimentale anterioare (Figura 40). Mai mult, YM254890 ar putea restabili răspunsul TRPM8 la icilină într-o manieră dependentă de doză, așa cum se arată în Figura 16. EC50 pentru acest experiment, efectuat în aceleași condiții experimentale, a fost de 100 nM.

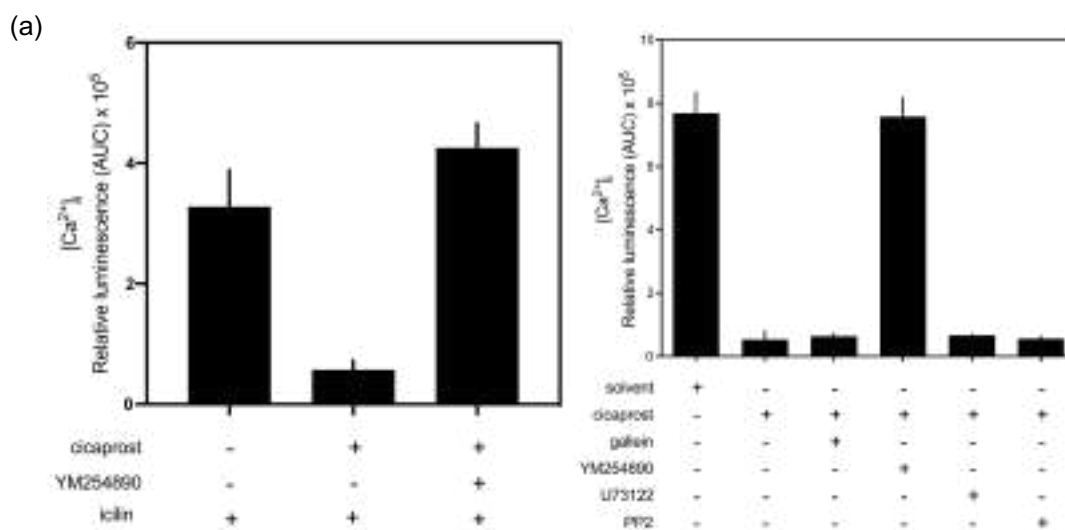


Figura 15. (a) Efectul pretratării cu inhibitorul Gq/11 YM254890 asupra răspunsului indus de icilină al TRPM8 la 1 M cicaprost în celulele HEK293T care exprimă TRPM8 și IP, împreună cu sonda de calciu G5A. Datele prezentate ca medii ± SEM; n = 16; Impactul diversilor inhibitori farmacologici asupra

suprimării canalelor TRPM8 de către agonistul receptorului IP. Celulele HEK293T care coexprimă canale TRPM8 cu receptori IP și G5A au fost tratate cu inhibitorii desemnați timp de 30 de minute înainte de o incubare de 10 minute cu 1 μM cicaprost. Ulterior, celulele au fost stimulate cu icilină 1 μM și au fost măsurate nivelurile de calciu intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Concentrațiile de inhibitori utilizați au fost următoarele: Gallein = 30 μM , YM254890 = 1 μM , U73122 = 30 μM , PP2 = 300 μM . Datele prezentate ca medii \pm SEM; n = 5. Figură adaptată după Trif et al., 2024

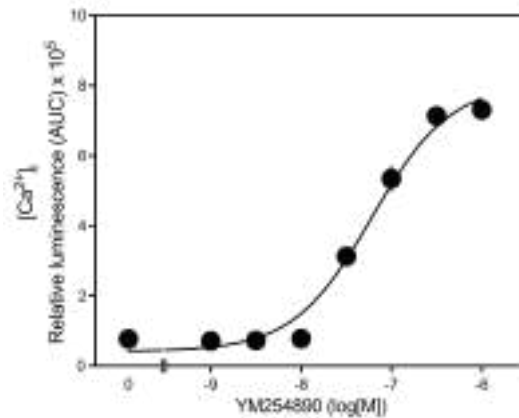


Figura 16. Efectul creșterii concentrațiilor de YM254890 asupra creșterii calciului intracelular indus de icilină în celulele HEK293T care coexprimă TRPM8, IP-R și G5A, după o pre-incubare de 10 minute cu 1 μM cicaprost. Datele prezentate ca medii \pm SEM; n = 5. Figură adaptată din Trif și colab., 2024

Pentru a explora rolul proteinelor Gq/11 în modularea activității TRPM8 la activarea receptorului IP, am evaluat răspunsurile unui mutant TRPM8 (TRPM8-TM) cu trei mutații care împiedică legarea proteinei Gq (X. Zhang, 2019). Această analiză a fost efectuată pe celule HEK293T care coexprimă receptorii IP, pre-tratate cu 1 μM cicaprost și ulterior stimulate cu 1 μM icilină. Rezultatele au fost comparate cu cele obținute din celulele care exprimă canale TRPM8 de tip sălbatic.

Într-un experiment inițial prezentat în Figura 17 (a), celulele care exprimă mutantul TRPM8-TM au apărut neafectate de activarea receptorului IP, ceea ce implică faptul că proteinele Gq/11 mediază efectul inhibitor. Cu toate acestea, analizele ulterioare efectuate de colaboratori au indicat că cicaprost ar putea încă inhiba activitatea TRPM8 în celulele care exprimă TRPM8-TM. După cum este ilustrat în Figura 17 (b), în timp ce cicaprost a inhibat semnificativ canalele TRPM8 de tip sălbatic co-exprimate cu receptorii IP, eficacitatea sa a fost redusă considerabil la mutantul TRPM8-TM. În special, deși inhibarea a fost mult diminuată, concentrațiile mai mari de cicaprost încă au inhibat semnificativ activarea TRPM8-TM de către icilină.

Aceste descoperiri sugerează un rol semnificativ pentru proteinele Gq/11 în cascada de semnalizare care duce la inhibarea TRPM8 la activarea receptorului IP sau la un mediator încă neidentificat în procesul de inhibare

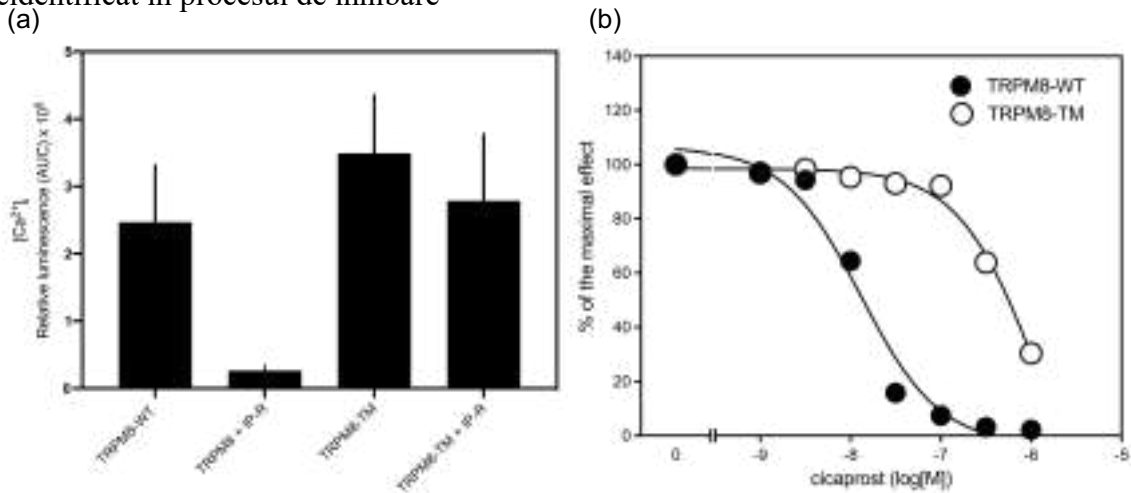


Figura 17. (a) Efectul 1 μ M cicaprost asupra celulelor HEK293T care coexprimă TRPM8 de tip sălbatic sau TRPM8 mutant triplu și receptorii IP, după stimularea cu 1 μ M icilină. Datele prezentate ca medii \pm SEM; n = 5; (b) Efectul creșterii concentrațiilor de cicaprost în celulele HEK293T care coexprimă TRPM8-WT sau TRPM8-TM după stimularea cu icilină 1 μ M. Datele prezentate ca medii \pm SEM; n = 5.

Figură adaptată după Trif et al., 2024

Canalele TRPM8 joacă un rol crucial în medierea răspunsurilor celulare la stimulii de răcire. Pentru a investiga dacă activarea receptorilor IP mediată de cicaprost afectează acest proces, am examinat impactul asupra activării TRPM8 indusă de răcire. Colaboratorii noștri de la Facultatea de Biologie au efectuat aceste experimente, așa cum se arată în Figura 18. Descoperirile lor indică faptul că pretratarea celulelor HEK293T care coexprimă receptorii TRPM8 și IP cu cicaprost a scăzut semnificativ activarea TRPM8 ca răspuns la rampele de răcire.

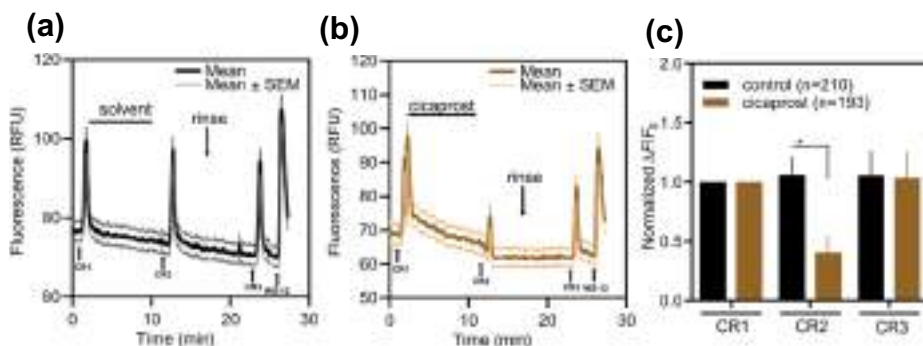


Figura 18. Microfluorimetria calciului a fost efectuată în celule HEK293T care exprimă canale TRPM8 și receptorii IP, supuse la trei rampe de răcire (CR1–3). Măsurătorile au fost făcute în absența (a, n = 104) și prezența (b, n = 72) a 1 μ M cicaprost. La sfârșitul fiecărui experiment, agonistul selectiv al canalului

TRPM8 WS-12 (5 μM) a fost aplicat pentru a confirma expresia funcțională a canalelor TRPM8. Datele prezentate ca urme continue reprezintă mediile, în timp ce urme punctate indică SEM. (c) Răspunsurile medii la rampele de răcire CR2 și CR3 sunt cuantificate ca $\Delta F/F_0$ și normalizate la răspunsul obținut de prima rampă de răcire (CR1). Datele sunt afișate ca medii \pm SEM. * $P \leq 0,05$, semnificativ diferit după cum este indicat; two tailed Student t-test. Figură preluată din Trif și colab., 2024.

Pentru a investiga dacă receptorii IP influențează activitatea canalelor TRPM8 într-un cadru mai relevant din punct de vedere fiziologic, ei au examinat potențiala interacțiune funcțională dintre aceste proteine în neuronii ganglionului rădăcinii dorsale de șoarece (DRG), care sunt implicați în răspunsurile inflamatorii și dureroase.

Colaboratorii noștri de la Facultatea de Biologie au identificat pentru prima dată neuronii care exprimă TRPM8 pe baza răspunsului lor la agonistul selectiv TRPM8 WS-12 (Sherkheli & Hatt, 2008). Expunerea acestor neuroni la icilină a provocat un răspuns substanțial de calciu intracelular, așa cum este ilustrat în Figura 19 a,e. Cu toate acestea, preincubarea cu 1 μM de cicaprost timp de 8 minute a redus semnificativ tranzitorii de calciu induși de icilină (Figura 19 b, e). Această reducere a fost contracarată în mod eficient prin utilizarea unei concentrații maxime a antagonistului receptorului IP Cay10441, sugerând că efectul inhibitor al cicaprost a fost mediat prin receptorii IP co-exprimați cu canalele TRPM8 în neuronii DRG de șoarece (Figura 19 c, e). În conformitate cu constatările din sistemul de expresie heterologă, pretratarea neuronilor DRG cu inhibitorul Gq/11 YM254890 (1 μM) a restabilit complet răspunsurile canalului TRPM8 la icilină în neuronii pretratați cu 1 μM cicaprost timp de 10 minute (Figura 19 d, e). Aceste constatări confirmă ipoteza că inhibarea dependentă de Gq/11 a canalelor TRPM8 de către agoniștii receptorului IP este, de asemenea, evidentă în neuronii DRG.

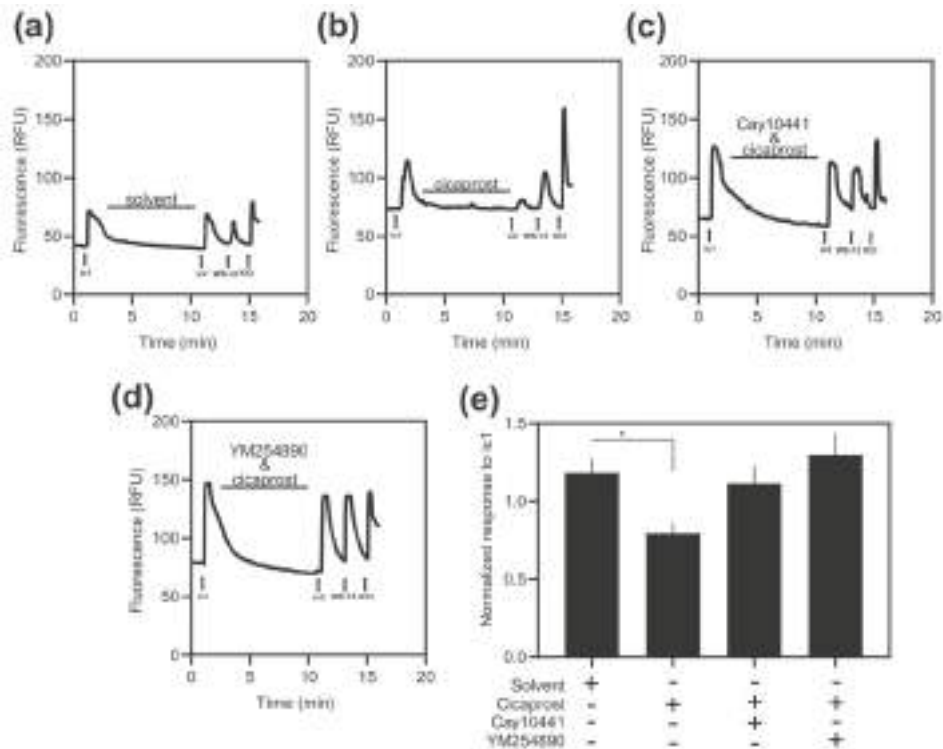


Figura 24. Inhibarea TRPM8 de către receptorul IP în neuronii DRG. (a–d) înregistrări ale tranzitorilor de calciu în neuronii derivați din DRG, supuși la două runde de stimulare cu icilină de 1 μ M (ic1 și ic2), urmată de stimulare cu agonistul selectiv al canalului TRPM8 WS-12 (5 μ M). Înregistrările au fost efectuate fie în absența (a), fie în prezența a 1 μ M cicaprost (b-d), cu sau fără 30 μ M Cay10441 (c) sau 1 μ M YM254890 (d). La sfârșitul fiecărui experiment, a fost aplicată o soluție ridicată de potasiu (KCl, 50 mM) pentru a depolariza neuronii și a confirma viabilitatea acestora. (e) - cuantificarea răspunsului ($\Delta F/F_0$) indus de a doua stimulare cu icilină (ic2), normalizat la răspunsul de la prima stimulare cu icilină (ic1), efectuată în absența și prezența cicaprost, 30 μ M Cay10441, și 1 μ M YM254890. Datele sunt exprimate ca medii \pm SEM, n = 26 (solvent), n = 34 (cicaprost), n = 29 (Cay10441) și n = 27 (YM254890). Semnificația statistică este notată cu * $P \leq 0,05$, așa cum este determinată de testul t cu două cozi al lui Student. Figură preluată din Trif și colab., 2024.

CONCLUZII ȘI PERSPECTIVE

Acest studiu analizează relația intricată dintre GPCR și canalele TRP tranzitorii, concentrându-se în mod special pe interacțiunea dintre canalul ionic TRPM8 și receptorii IP. Cercetarea noastră a urmărit să optimizeze testele concepute inițial pentru evaluarea activității GPCR și, ulterior, să aplice aceste teste pentru a investiga ținte non-GPCR și a elucida interacțiunea funcțională dintre receptorii TRPM8 și IP.

În timpul fazei de optimizare, am măsurat eficient cAMP și nivelurile de calciu intracelular, cu metrici HTS calculate pentru fiecare experiment, ducând la validarea robusteții și fiabilității testelor pentru aplicațiile ulterioare.

Descoperirile din acest studiu au confirmat că receptorii IP pot inhiba canalele TRPM8. Această inhibare are loc independent de calea Gs-cAMP și implică cuplarea Gq/11. În special, inhibarea TRPM8 de către receptorii IP a fost observată în sistem heterolog (celule HEK293T) și neuroni izolați din DRG murine.

Rezultatele subliniază o nouă cale de semnalizare în care receptorii IP, la activarea de către agoniști selectivi, cum ar fi cicaprost, beraprost și iloprost, inhibă funcția canalului TRPM8 prin intermediul proteinelor Gq/11. Acest mecanism de semnalizare atipic ne îmbunătățește înțelegerea rolurilor reglatoare ale canalelor TRPM8 și ale receptorilor IP în durerea inflamatorie.

Implicațiile descoperirilor descrise sunt semnificative pentru domeniul managementului durerii și inflamației. Identificarea unei căi mediate de Gq/11 care inhibă TRPM8 de către receptorii IP oferă noi perspective asupra mecanismelor moleculare care stau la baza durerii inflamatorii.

Cercetările viitoare ar trebui să se concentreze pe mai multe domenii cheie:

- Validare in vivo: În timp ce studiul nostru a demonstrat interacțiunea dintre receptorii TRPM8 și IP in vitro și neuronii izolați, sunt necesare cercetări suplimentare pentru a valida aceste constatări in vivo. Modelele animale de inflamație și durere pot oferi informații valoroase asupra relevanței fiziologice a acestei interacțiuni.
- Elucidarea căii de semnalizare: Sunt necesare studii detaliate pentru a elucidă mecanismele moleculare care guvernează inhibarea TRPM8 mediată de Gq/11. Înțelegerea căilor de semnalizare din aval și a partenerilor care interacționează ne vor îmbunătăți cunoștințele despre acest mecanism de reglementare.
- Dezvoltare aplicații terapeutice: Compușii de identificare care pot modula selectiv interacțiunea receptorului TRPM8-IP sunt promițători pentru dezvoltarea de noi analgezice și medicamente antiinflamatoare. Screeningul cu randament ridicat al bibliotecilor chimice ar putea identifica potențiali candidați pentru dezvoltare terapeutică.
- Implicații mai largi: Investigarea dacă interacțiunile similare apar între alte canale TRP și GPCR-uri ne-ar putea extinde înțelegerea rețelelor de semnalizare celulară. Aceste cunoștințe ar putea dezvălui ținte terapeutice suplimentare pentru diferite afecțiuni legate de durere. În concluzie, studiul nostru oferă o bază pentru cercetările viitoare privind interacțiunile complexe dintre canalele TRPM8 și receptorii IP. Noua cale de semnalizare identificată aici deschide noi căi pentru înțelegerea și potențial tratarea durerii inflamatorii, subliniind importanța receptorilor TRPM8 și IP în semnalizarea celulară și descoperirea medicamentelor.

Mulțumiri

În primul rând, aș dori să-mi exprim recunoștința Dr. Ștefan-Eugen Szedlacsek pentru că mi-a oferit oportunitatea de a-mi urma studiile doctorale la Institutul de Biochimie al Academiei Române din cadrul Departamentului de Enzimologie și pentru sprijinul și îndrumarea sa.

Îmi exprim aprecierea colegului meu din grupul de semnalizare celulară, drd. Cosmin Trif, pentru colaborarea și sprijinul oferit în realizarea experimentelor importante pentru acest studiu. În plus, sunt recunoscătoare colegilor mei din grupul de Semnalizare Celulară, Dr. Rodica Badea, pentru mentorat în primii ani de cercetare și doctorat, drd. Sorina-Andreea Anghel și drd. Teodora Stratulat pentru sprijinul acordat în experimentele realizate în acest studiu.

Aș dori să le mulțumesc colaboratorilor noștri din cadrul Departamentului de Anatomie, Fiziologie Animală și Biofizică din cadrul Facultății de Biologie, Universitatea din București. Mulțumiri speciale Dr. Alexandru Babeș, Dr. Alexandra Manolache, Dr. Tudor Selescu și drd. Debora-Elena Huțanu și drd. George Opriță pentru realizarea experimentelor în neuroni DRG și pentru eforturile lor de colaborare.

De asemenea, aș dori să mulțumesc Dr. Marco Sisignano de la Institutul de Farmacologie Clinică, Spitalul Universitar, Universitatea Goethe, și Dr. Stefan Offermanns de la Institutul Max Planck pentru Cercetarea Inimii și Plămânilor, Bad Nauheim, pentru sprijinul colaborativ.

În plus, sunt extrem de recunoscătoare mamei mele, familiei mele, prietenilor și terapeutei mele pentru sprijinul financiar și emoțional de-a lungul acestor ani.

În cele din urmă, aș dori să îmi mulțumesc mie pentru reziliența și determinarea care mi-au permis să finalizez acest capitol semnificativ din viața mea.

Suport financiar

Acest studiu a fost susținut de fonduri din proiectul cu numărul 338PED (PN-III-P2-2.1-PED-2019-5179) de la Unitatea Executivă pentru Finanțarea Învățământului Superior, Cercetării, Dezvoltării și Inovării (UEFISCDI), România, acordat lui Dr. Sorin Tunaru.

Lista lucrărilor publicate

1. Cosmin Trif*, **Alexandra-Maria Bănică***, Alexandra Manolache, Sorina Andreea Anghel, Debora-Elena Huțanu, Teodora Stratulat, Rodica Badea, George Opriță, Tudor Selescu, Stefana M. Petrescu, Marco Sisignano, Stefan Offermanns, Alexandru Babeș, Sorin Tunaru, Inhibition of TRPM8 function by the prostacyclin receptor requires coupling to Gq/11 proteins. Br J Pharmacol. **2023**. <https://doi.org/10.1111/bph.16295>. **IF: 9.40**
2. Sendetski, M., Wedel, S., Furutani, K., Hahnefeld, L., Angioni, C., Heering, J., Zimmer, B., Pierre, S., **Bănică, A.-M.**, Scholich, K., Tunaru, S., Geisslinger, G., Ji, R.-R., Sisignano, M., Oleic acid released by sensory neurons inhibits TRPV1-mediated thermal hypersensitivity via GPR40, ISCIENCE (2024), doi: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.110552>. **IF: 4.60**

*co-primi autori, contribuție egală

Participări la conferințe

Prezentare orală în cadrul Conferinței Internaționale Anuală a SRBMB. "Functional interaction between Transient Receptor Potential Cation Channel Member 8 (TRPM8) and prostacyclin receptor (IP-R)". 26-27 Septembrie 2019, Iași, România.

Bibliografie

- Alexander, S. P., Christopoulos, A., Davenport, A. P., Kelly, E., Mathie, A., Peters, J. A., Veale, E. L., Armstrong, J. F., Faccenda, E., Harding, S. D., Pawson, A. J., Southan, C., Davies, J. A., Pia Abbracchio, M., Alexander, W., Al-hosaini, K., Bäck, M., Barnes, N. M., Bathgate, R., ... Ye, R. D. (2021). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2021/22: G-protein-coupled receptors. *British Journal of Pharmacology*, 178, 27–156. <https://doi.org/10.1111/bph.15538/full>
- Baubet, V., Le Mouellic, H., Campbell, A. K., Lucas-Meunier, E., Fossier, P., & Brû, P. (2000). *Chimeric green fluorescent protein-aequorin as bioluminescent Ca²⁺ reporters at the single-cell level*. www.pnas.org
- Bavencoffe, A., Gkika, D., Kondratskyi, A., Beck, B., Borowiec, A. S., Bidaux, G., Busserolles, J., Eschalier, A., Shuba, Y., Skryma, R., & Prevarskaya, N. (2010). The transient receptor potential channel TRPM8 is inhibited via the α 2A adrenoreceptor signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 285(13), 9410–9419. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.069377>
- Clapham, D. E. (2003). *TRP channels as cellular sensors*. www.nature.com/nature
- De Petrocellis, L., Starowicz, K., Moriello, A. S., Vivese, M., Orlando, P., & Di Marzo, V. (2007). Regulation of transient receptor potential channels of melastatin type 8 (TRPM8): Effect of cAMP, cannabinoid CB1 receptors and endovanilloids. *Experimental Cell Research*, 313(9), 1911–1920. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.01.008>
- Dussor, G., & Cao, Y. Q. (2016). TRPM8 and Migraine. *Headache*, 56(9), 1406–1417. <https://doi.org/10.1111/head.12948>
- Hamm, H. E. (1998). The many faces of G protein signaling. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 273, Issue 2, pp. 669–672). <https://doi.org/10.1074/jbc.273.2.669>
- Izquierdo, C., Martín-Martínez, M., Gómez-Monterrey, I., & González-Muñiz, R. (2021). Trpm8 channels: Advances in structural studies and pharmacological modulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16). <https://doi.org/10.3390/ijms22168502>
- Kang, H., Kim, J., Park, C. H., Jeong, B., & So, I. (2024). Direct modulation of TRPC ion channels by $G\alpha$ proteins. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 15). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fphys.2024.1362987>
- Katritch, V., Cherezov, V., & Stevens, R. C. (2013). Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. In *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* (Vol. 53, pp. 531–556). <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-032112-135923>
- Khajavi, N., Mergler, S., & Biebermann, H. (2017). 3-Iodothyronamine, a novel endogenous modulator of transient receptor potential melastatin 8? *Frontiers in Endocrinology*, 8(AUG). <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00198>
- Montell, C. (2005). The TRP superfamily of cation channels. In *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* (Vol. 2005, Issue 272). <https://doi.org/10.1126/stke.2722005re3>
- Palchevskyi, S., Czarnocki-Cieciura, M., Vistoli, G., Gervasoni, S., Nowak, E., Beccari, A. R., Nowotny, M., & Talarico, C. (2023). Structure of human TRPM8 channel. *Communications Biology*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05425-6>
- Pertusa, M., Solorza, J., & Madrid, R. (2023a). Molecular determinants of TRPM8 function: key clues for a cool modulation. *Frontiers in Pharmacology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1213337>
- Pertusa, M., Solorza, J., & Madrid, R. (2023b). Molecular determinants of TRPM8 function: key clues for a cool modulation. *Frontiers in Pharmacology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1213337>
- Quallo, T., Alkhatib, O., Gentry, C., Andersson, D. A., & Bevan, S. (2017). *G protein $\beta\gamma$ subunits inhibit TRPM3 ion channels in sensory neurons*. <https://doi.org/10.7554/eLife.26138.001>
- Ramsey, I. S., Delling, M., & Clapham, D. E. (2006). An introduction to TRP channels. *Annual Review of Physiology*, 68, 619–647. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040204.100431>
- Salzer, I., Ray, S., Schicker, K., & Boehm, S. (2019). Nociceptor signalling through ion channel regulation via GPCRs. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 10). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20102488>
- Sendetski, M., Wedel, S., Furutani, K., Hahnefeld, L., Angioni, C., Heering, J., Zimmer, B., Pierre, S., Banica, A.-M., Scholich, K., Tunaru, S., Geisslinger, G., Ji, R.-R., & Sisignano, M. (2024). Oleic

- acid released by sensory neurons inhibits TRPV1-mediated thermal hypersensitivity via GPR40. *IScience*, 27(8), 110552. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.110552>
- Sherkheli, A., & Hatt, H. (2008). Menthol derivative WS-12 selectively activates transient receptor potential melastatin-8 (TRPM8) ion channels. In *Article in Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. <https://www.researchgate.net/publication/23394465>
- Stitham, J., Midgett, C., Martin, K. A., & Hwa, J. (2011). Prostacyclin: An inflammatory paradox. *Frontiers in Pharmacology*, MAY. <https://doi.org/10.3389/fphar.2011.00024>
- Trif, C., Banica, A. M., Manolache, A., Anghel, S. A., Huțanu, D. E., Stratulat, T., Badea, R., Oprita, G., Selescu, T., Petrescu, S. M., Sisignano, M., Offermanns, S., Babes, A., & Tunaru, S. (2024). Inhibition of TRPM8 function by prostacyclin receptor agonists requires coupling to Gq/11 proteins. *British Journal of Pharmacology*, 181(9), 1438–1451. <https://doi.org/10.1111/bph.16295>
- Veldhuis, N. A., Poole, D. P., Grace, M., McIntyre, P., & Bunnett, N. W. (2015). The g protein–coupled receptor–transient receptor potential channel axis: Molecular insights for targeting disorders of sensation and inflammation. *Pharmacological Reviews*, 67(1), 36–73. <https://doi.org/10.1124/pr.114.009555>
- Venkatachalam, K., & Montell, C. (2007). TRP channels. *Annual Review of Biochemistry*, 76, 387–417. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819>
- Voets, T., O. G., & N. B. (2007). trpm8. In *Handbook of Experimental Pharmacology* (pp. 329–344).
- Wettschureck, N., & Offermanns, S. (2005). *Mammalian G Proteins and Their Cell Type Specific Functions*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2005>.-Heterotrimeric
- Zhang, M., Chen, T., Lu, X., Lan, X., Chen, Z., & Lu, S. (2024). G protein-coupled receptors (GPCRs): advances in structures, mechanisms, and drug discovery. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 9, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01803-6>
- Zhang, M., Ma, Y., Ye, X., Zhang, N., Pan, L., & Wang, B. (2023). TRP (transient receptor potential) ion channel family: structures, biological functions and therapeutic interventions for diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01464-x>
- Zhang, X. (2019). Direct Gαq Gating Is the Sole Mechanism for TRPM8 Inhibition Caused by Bradykinin Receptor Activation. *Cell Reports*, 27(12), 3672–3683.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.080>
- Zhang, X., Mak, S., Li, L., Parra, A., Denlinger, B., Belmonte, C., & McNaughton, P. A. (2012). Direct inhibition of the cold-Activated TRPM8 ion channel by Gαq. *Nature Cell Biology*, 14(8), 850–858. <https://doi.org/10.1038/ncb2529>
- Zhao, C., & MacKinnon, R. (2023). Structural and functional analyses of a GPCR-inhibited ion channel TRPM3. *Neuron*, 111(1), 81–91.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.10.002>