

4 Zusammenfassung

Zur Identifizierung schmerzregulierter Proteine in Schmerzmodellen wurde ein Proteom-Ansatz basierend auf der Auftrennung der Proteine durch die klassische zweidimensionale Gelelektrophorese (IEF/SDS-PAGE) sowie durch die für Membranproteine geeignete 16-BAC/SDS-PAGE in Kombination mit der MALDI-Massenspektrometrie etabliert. Für die bearbeitete Fragenstellung wurden die Grenzen dieser Methoden beschrieben. Aus dorsalen Rückenmarkhälften von Ratten (Kontrolltiere und Tiere aus Schmerzmodellen) wurde die Synaptosomenmembran-Fraktion mit dem Fokus auf membrangebundene Proteine untersucht. Der Vergleich der Proteinmuster nach 2DE lieferte zwar Differenzspots, die aber nicht reproduzierbar dargestellt werden konnten. Außerdem waren besonders integrale Membranproteine der Plasmamembran auf den IEF/SDS-2D-Gelen stark unterrepräsentiert. Mit Hilfe der gesammelten Daten konnte eine provisorische Rattenrückenmark-Proteinkarte mit über 30 Proteinen für den pH-Bereich 3-10 erstellt werden.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die biochemische Charakterisierung der an der Nozizeption beteiligten Rezeptoren TRPV1 und TRPV2. Die codierenden Sequenzen von *Trpv1* und *Trpv2* wurden in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1(+) inseriert. Als neuronales Expressionssystem wurde die F11-Fusionszelllinie aus Hinterwurzelganglienzellen der Ratte und der Neuroblastom-Zelllinie N18TG2 der Maus etabliert. Die F11-Zellen exprimieren endogen sowohl TRPV1 der Ratte als auch TRPV2 der Maus. Die Existenz beider Kanäle in derselben Zelle wurde mittels Einzelzell-RT-PCR nachgewiesen.

Nach heterologer Expression von TRPV1 und TRPV2 in F11- und HEK293-Zellen konnte gezeigt werden, dass beide Kanäle eine N-Glycosylierung sowohl vom High-Mannose-Typ als auch komplexe Glycosylierung aufweisen. Die Glycosylierungsstellen wurden für TRPV1 an der Aminosäure Asn 604 und für TRPV2 an Asn 571 und 572 identifiziert. Sie befinden sich zwischen den membrandurchspannenden Helices TM5 und TM6 auf der extrazellulären Seite und bestätigen die vorgeschlagene Topologie der Kanäle, in der N- und C-Terminus cytoplasmatisch lokalisiert vorliegen. Die Glycosylierung hat keinen Einfluss auf die

subzelluläre Lokalisation der Kanäle. TRPV1 und TRPV2 sind in transfizierten F11-Zellen überwiegend an der Plasmamembran und in Neuriten-artigen Ausläufern lokalisiert. In HEK293-Zellen befindet sich TRPV1 überwiegend an intrazellulären Membranen. Fehlt der cytoplasmatische N-Terminus oder ist dieser an GFP gekoppelt, so ist die Lokalisation von TRPV1 an die Plasmamembran gestört. Eine Eingrenzung der die Lokalisation determinierenden Sequenz steht noch aus.

Mit Hilfe eines zweidimensionalen Systems aus Blauer Nativer PAGE und SDS-PAGE konnte der TRPV1-Signalkomplex als Homotetramer dargestellt werden. Der Komplex lässt sich aber zusätzlich bei einem höherem Molekulargewicht detektieren, was auf assoziierte Proteine hinweist. Die Identifizierung potentieller Interaktionspartner von TRPV1 und TRPV2 durch MBP-Fusionsproteine der cytoplasmatisch lokalisierten C-Termini ergab für TRPV1 bisher Aktin, für TRPV2 Aktin, β -Tubulin und P450-(Cytochrom)-Oxidoreduktase. β -Tubulin wurde inzwischen als direkter Interaktionspartner von TRPV1 identifiziert und verifiziert. Die Ca^{2+} -abhängige Interaktion der beiden Proteine wurde ausführlich von C. Goswami untersucht. Weitere potentielle Interaktionspartner, identifiziert im Rahmen der Pull-Down-Experimente, werden momentan analysiert.