

Protonenleitfähigkeit von TRPV1 und  
Multimerisierung von TRPV-Kanaluntereinheiten

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades Dr. rer. nat.  
am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Dipl.-Biochem. Nicole Hellwig**

aus Berlin

Berlin, 2005

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Schaefer am Institut für Pharmakologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin angefertigt.

1. Gutachter            Prof. Dr. F. Hucho  
                              Institut für Biochemie  
                              Freie Universität Berlin  
                              Thielallee 63  
                              14195 Berlin

2. Gutachter:            Prof. Dr. M. Schaefer  
                              Institut für Pharmakologie  
                              Charité-Universitätsmedizin Berlin,  
                              Campus Benjamin Franklin  
                              Thielallee 67-73  
                              14195 Berlin

Datum und Ort der Disputation: 04. Juli 2005, Berlin

---

Abkürzungsverzeichnis .....	4
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>5</b>
1.1. Calcium-Homöostase.....	5
1.1.1. $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus internen Speichern.....	5
1.1.2. $Ca^{2+}$ -Influx über die Plasmamembran.....	7
1.1.3. Calcium-Retention und -Extrusion .....	8
1.2. Die Familie der TRP-Kanäle .....	10
1.2.1. Strukturelle Eigenschaften .....	11
1.2.2. Biophysikalische und regulatorische Eigenschaften .....	12
1.3. Das grün fluoreszierende Protein.....	19
1.3.1. Proteinstruktur und Fluoreszenzspektren .....	19
1.3.2. Nachweis der Proteinlokalisierung und -interaktion .....	20
1.3.3. Intrazelluläre pH- und $[Cl^-]$ -Messung mittels intrinsischer Eigenschaften der Fluorochrome .....	21
<b>2. Zielsetzung</b> .....	<b>23</b>
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>24</b>
3.1. Material .....	24
3.1.1. Chemikalien .....	24
3.1.2. Enzyme und Reaktionssysteme .....	26
3.1.3. Antikörper .....	27
3.1.4. Vektoren und Plasmide .....	27
3.1.5. Zellen.....	27
3.1.6. Sonstige Materialien .....	27
3.1.7. Medien, Puffer, Lösungen .....	28
3.2. Molekularbiologische Methoden .....	33
3.2.1. Generierung der fluoreszierenden pH-Sensoren .....	34
3.2.2. Herstellung der TRPV-Konstrukte .....	35
3.3. Zellkultur und Expression.....	39
3.3.1. Zelllinien und Kultivierung.....	39
3.3.2. Heterologe Genexpression in eukaryotischen Zellen.....	40

3.4. Fluoreszenz-Imaging.....	42
3.4.1. <i>In vitro</i> -Titration der Fluoreszenzproteine CFP und YFP und des CFP-YFP-Tandemproteins .....	42
3.4.2. BCECF- und Fura 2- Messungen .....	42
3.4.3. Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET).....	45
3.5. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.....	48
3.6. Koimmunpräzipitation und Immunoblot-Analyse.....	51
3.7. Elektrophysiologie .....	52
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>53</b>
4.1. Charakterisierung und Kalibration genetisch kodierter pH-Sensorproteine .....	53
4.1.1. <i>Subzelluläre Lokalisation der pH Sensorproteine</i> .....	53
4.1.2. <i>Spektren und Titration der extrahierten pH-Sensorproteine</i> .....	53
4.1.3. <i>Kalibration der pH-Sensorproteine in lebenden HEK293-Zellen</i> .....	55
4.2. TRPV1-induzierte intrazelluläre Ansäuerung .....	59
4.2.1. <i>Ca<sup>2+</sup>-vermittelte intrazelluläre Ansäuerung in TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen</i> .....	59
4.2.2. <i>Ca<sup>2+</sup>-unabhängiger Mechanismus der intrazellulären Ansäuerung in azidem Extrazellulärmedium</i> .....	63
4.2.3. <i>Capsaicin-induzierter Protonenstrom durch die TRPV1-Pore</i> .....	63
4.2.4. <i>TRPV1-vermittelter Protonenstrom durch Endovanilloide</i> .....	68
4.2.5. <i>Capsaicin-induzierte pH-Änderungen in nativen Nozizeptoren</i> .....	72
4.2.6. <i>Elektrophysiologische Messung des Protonenstroms durch TRPV1</i> .....	72
4.2.7. <i>Permeation von organischen Kationen durch die TRPV1-Pore</i> .....	76
4.2.8. <i>Auswirkungen der intrazellulären Ansäuerung auf TRPV1-getragene Ströme</i> .....	79
4.3. Homo- und Heteromultimerisierung von TRPV-Kanaluntereinheiten.....	81
4.3.1. <i>Subzelluläre Lokalisation von TRPV-Kanälen in HEK293-Zellen</i> .....	81
4.3.2. <i>Subzelluläre Lokalisation von koexprimierten TRPV-Kanaluntereinheiten</i> .....	83
4.3.3. <i>Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) zwischen TRPV-Kanaluntereinheiten</i> .....	85
4.3.4. <i>Koimmunpräzipitation von TRPV-Kanaluntereinheiten</i> .....	87
4.3.5. <i>Funktion und Interaktion N- oder C-terminal trunkierter TRPV1-Konstrukte</i> .....	89

4.3.6. Rolle der cytosolischen Termini und transmembranären Domänen bei der Assemblierung von TRPV-Kanaluntereinheiten.....	91
4.3.7. Interaktion zwischen cytosolischen TRPV1- und TRPV4-Termini .....	94
4.3.8. Funktionelle Wiederherstellung N-terminal trunkierter TRPV1-Konstrukte durch Fusion mit N-Termini anderer TRPV Isoformen.....	97
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>99</b>
5.1. TRPV1-vermittelte intrazelluläre Ansäuerung.....	99
5.1.1. Mechanismus bei neutralem extrazellulärem pH.....	100
5.1.2. Direkter Protoneneinstrom durch die TRPV1-Pore in azidem Medium.....	103
5.1.3. Modell der Protonenmigration durch die TRPV1-Pore .....	104
5.1.4. Mögliche physiologische Konsequenzen der intrazellulären Ansäuerung .....	107
5.2. Assemblierung von TRPV-Kanaluntereinheiten zu Kanalkomplexen .....	108
5.2.1. Subzelluläre Lokalisation fluoreszierender TRPV-Kanaluntereinheiten.....	108
5.2.2. Heteromere Interaktion innerhalb der TRPV-Familie.....	110
5.2.3. Determinanten der Interaktion zwischen TRPV-Kanaluntereinheiten .....	112
5.2.4. Phylogenetische Grundlagen der Heteromultimerisierung hexahelikaler Kationenäle.....	114
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	<b>119</b>
Summary .....	122
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>125</b>
Eigene Publikationen .....	146
Lebenslauf.....	147
Danksagung .....	148

## Abkürzungsverzeichnis

AEA	Anandamid, <i>N</i> -Arachidonoyl-ethanolamin
BAPTA	1,2-Bis-(2-aminophenoxy)-ethan- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure (BAPTA)
BCECF/AM	2',7'-Bis-(2-carboxyethyl)-5,6-carboxyfluorescein-Acetomethylester
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	cytosolische Ca <sup>2+</sup> -Konzentration
cDNA	komplementäre Deoxyribonukleinsäure
CFP	cyan-fluoreszierendes Protein
DAG	Diacylglycerol
DOG	1,2-Dioctanoyl- <i>sn</i> -glycerol
EGTA	Ethylenglykol-bis-2-aminoethyl- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
FCS	fötale Kälberserum
FLAG	Epitop mit der Aminosäuresequenz DYKDDDDK
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
G-Protein	regulatorisches heterotrimeres Guaninnukleotid-bindendes Protein
InsP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
kDa	Kilodalton
MEM	„minimum essential medium“
MEQ <sup>+</sup>	6-Methoxy- <i>N</i> -ethylquinolinium
MQAE <sup>+</sup>	<i>N</i> -Ethoxycarbonylmethyl-6-methoxyquinolinium
NADA	<i>N</i> -Arachidonoyl-dopamin
NMDG <sup>+</sup>	<i>N</i> -Methyl-D-glucamin
OAG	1-Oleoyl-2-acetyl- <i>sn</i> -glycerol
4 $\alpha$ -PDD	4 $\alpha$ -Phorbol-12, 13-didecanoat
pH <sub>ext</sub>	extrazellulärer pH
pH <sub>i</sub>	intrazellulärer pH
PIP <sub>2</sub>	Phosphoinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
POD	Meerrettich-Peroxidase
SDS	Natriumlaurylsulfat
SPQ <sup>+/-</sup>	6-Methoxy- <i>N</i> -(3-sulfopropyl)-quinolinium
TEA <sup>+</sup>	Tetraethylammonium, Tris-(2-hydroxyethyl)-amin
TRP	„transient-receptor-potential“
TRPC	„classical“ oder „canonical“ TRP-Kanäle
TRPV	Vanilloidrezeptor-verwandte TRP-Kanäle
YFP	gelb-fluoreszierendes Protein