

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid-Gellösung (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
<i>N</i> -Arachidonoyl-dopamin (NADA)	Sigma, Taufkirchen
<i>N</i> -Arachidonoyl-ethanolamin (Anandamid)	Sigma, Taufkirchen
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Sigma, Taufkirchen
Ampicillin	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Aprotinin	Sigma, Taufkirchen
1,2-Bis-(2-aminophenoxy)-ethan- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure (BAPTA)	Sigma, Taufkirchen
2',7'-Bis-(2-carboxyethyl)-5,6-carboxyfluorescein-	Molecular Probes, Leiden,
Acetomethylester (BCECF/AM)	NL
Bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris-(hydroxymethyl)-methan (Bis-Tris)	AppliChem, Darmstadt
Bis-[tris-(hydroxymethyl)-methylamino]-propan (Bis-Tris-Propan)	AppliChem, Darmstadt
Borsäure	Merck, Darmstadt
bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
Cäsiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Cäsiumhydroxid	Sigma, Taufkirchen
Cäsiummethansulfonat	Sigma, Taufkirchen
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
(E)-Capsaicin	Calbiochem, Merck Biosciences, Schwalbach
Desoxycholat (Natriumsalz)	Sigma, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol	Sigma, Taufkirchen
Ethanol	J.T. Baker, Deventer, NL
Ethidiumbromid (1 %)	Roth, Karlsruhe

---

<i>N</i> -Ethoxycarbonylmethyl-6-methoxyquinolinium (MQAE <sup>+</sup> )	Molecular Probes, Leiden, NL
Ethylendinitrilo-tetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethylenglykol-bis-2-aminoethyl- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure (EGTA)	Sigma, Taufkirchen
fötales Kälberserum	Gibco BRL, Eggenstein
Fura 2/AM	Molecular Probes, Leiden, NL
Geneticin (G418)	Sigma, Taufkirchen
Glucose	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Gibco BRL, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	ICN, Eschwege
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
L-Histidin	Roth, Karlsruhe
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe
Icilin	Tocris, Grünberg
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma, Taufkirchen
Kollagenase (Typ III)	Sigma, Taufkirchen
Leupeptin	Sigma, Taufkirchen
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Manganchlorid	Merck, Darmstadt
MEM Earle's-Medium	PAN, Aidenbach
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
6-Methoxy- <i>N</i> -ethylquinolinium (MEQ <sup>+</sup> )	Molecular Probes, Leiden, NL
6-Methoxy- <i>N</i> -(3-sulfopropyl)-quinolinium (SPQ <sup>+/-</sup> )	Molecular Probes, Leiden, NL
<i>N</i> -Methyl-D-glucamin (NMDG <sup>+</sup> )	Sigma, Taufkirchen
Monensin	Sigma, Taufkirchen
2-Morpholino-ethansulfonsäure (MES)	Sigma, Taufkirchen
Natriumborat	Merck, Darmstadt

Natriumchlorid	Merk, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	AppliChem, Darmstadt
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Nervenwachstumsfaktor (nerve growth factor, NGF)	Sigma, Taufkirchen
Nigericin	Sigma, Taufkirchen
Nonidet P-40	Sigma, Taufkirchen
1-Oleoyl-2-acetyl- <i>s,n</i> -glycerol (OAG)	Calbiochem, Schwalbach
Penicillin	Serva, Heidelberg
Pferdeserum	Gibco BRL, Eggenstein
4 $\alpha$ -Phorbol-12, 13-didecanoat (4 $\alpha$ -PDD)	Sigma, Taufkirchen
Poly-L-Lysin	Biochrom, Berlin
Pyronin Y	Sigma, Taufkirchen
Ru360	Calbiochem, Schwalbach
Ruthemiumrot	Calbiochem, Schwalbach
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Streptomycin	Serva, Heidelberg
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamid (TEMED)	Bio-Rad, München
Tris-(2-hydroxyethyl)-amin (Tetraethylammonium, TEA <sup>+</sup> )	Sigma, Taufkirchen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
Trysin/EDTA-Lösung	Biochrom, Berlin
Trypsin (Typ I)	Sigma, Taufkirchen
Trypton	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Zitronensäure	Merck, Darmstadt

### ***3.1.2. Enzyme und Reaktionssysteme***

Restriktionsendonukleasen	New England Biolab., Beverly, USA
T4-DNA Ligase	New England Biolab., Beverly, USA
Expand High Fidelity PCR-System	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
DYEnamic ET terminator, cycle sequencing kit	Amersham Biosciences, Freiburg
QuickChange, site-directed mutagenesis kit	Stratagene, La Jolla, CA, USA

### 3.1.3. Antikörper

monoklonaler anti-Flag-M2 Antikörper	Sigma, Taufkirchen
monoklonaler anti-GFP Antikörper	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
anti-Kaninchen-IgG, POD-gekoppelt	Sigma, Taufkirchen
anti-Maus-IgG, POD-gekoppelt	Sigma, Taufkirchen

### 3.1.4. Vektoren und Plasmide

#### *Vektoren*

pcDNA3	Invitrogen, Leek, NL
pcDNA3.1-V5/His-TOPO	Invitrogen, Leek, NL
pcDNA3-FLAG	AG Michael Schaefer, Berlin
pcDNA3-YFP	AG Michael Schaefer, Berlin
pcDNA3-CFP	AG Michael Schaefer, Berlin
pcDNA3-NYFP	AG Michael Schaefer, Berlin
pcDNA3-NCFP	AG Michael Schaefer, Berlin
pEYFP-C1	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
pECFP-C1	BD Biosciendes Clontech, Heidelberg
pcDNA3-Citrine	Roger Tsien, AG Michael Schaefer, Berlin

Der Vektor pcDNA3-FLAG wurde von mir im Rahmen meiner Diplomarbeit angefertigt.

#### *Plasmide*

pcDNA3-TRPV1 bis -TRPV6	AG Michael Schaefer, Berlin
-------------------------	-----------------------------

### 3.1.5. Zellen

#### *Kompetente Bakterien*

TOP 10	Invitrogen, Karlsruhe
XL1-blue, supercompetent cells	Stratagene, La Jolla, CA, USA

#### *Eukaryotische Zelllinien*

HEK293	American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA
--------	--

### 3.1.6. Sonstige Materialien

1 kb-DNA-Standard	Gibco BRL, Rockville MD, USA
Nucleobond AX	Macherey-Nagel, Düren

---

Qiagen-Tip 100	Qiagen, Hilden
Glasplättchen	Menzel, Braunschweig
FuGene 6 transfection reagent	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Protein A-Sepharose CL-4B	Sigma, Taufkirchen
BenchMark prestained protein ladder	Invitrogen, Leek, NL
Hybond ECL-Nitrocellulose-Membran	Amersham Pharmacia, Freiburg
Chemiluminescence detection kit	Applichem, Darmstadt
Röntgenfilm X-OMAT	Kodak, Rochester, USA

### ***3.1.7. Medien, Puffer, Lösungen***

#### ***3.1.7.1. Zellkultur***

##### ***Medium für die HEK293-Zelllinie:***

MEM Earle's-Medium mit	
fötalem Kälberserum	10 %
Glutamin	4 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml

##### ***Medium für die primär kultivierten DRG-Neurone (MEM-Medium):***

MEM Earle's-Medium mit	
Pferdeserum	10 %
Glucose	28,2 mM
NaHCO <sub>3</sub>	16 mM
Penicillin	5 U/ml
Streptomycin	5 µg/ml
NGF	50 ng/ml

#### ***3.1.7.2. Medien für Bakterienkulturen***

##### ***LB-Flüssigmedium:***

Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l
in H <sub>2</sub> O; pH 7,4	

***LB-Agarplatten:***

Agar-Agar	1,5 %
in LB-Flüssigmedium	

***SOB-Medium:***

Trypton	20 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	0,5 g/l
KCl	2,6 mM
in H <sub>2</sub> O; pH 7,0	

***SOC-Medium:***

MgCl <sub>2</sub> (sterilfiltriert)	20 mM
Glucose (sterilfiltriert)	20 mM
in hitzesterilisiertem SOB-Medium	

Die Antibiotika wurden den hitzesterilisierten Medien in einer Endkonzentration von 75 µg/ml (Ampicillin) oder 50 µg/ml (Kanamycin) zugesetzt.

***3.1.7.3 Puffer für die in vitro-Kalibration des YFP-CFP-Tandemproteins******Extraktionspuffer***

Tris	20 mM
β-Mercaptoethanol	10 mM
EDTA	1 mM
Benzamidin	1 mM
PMSF	200 mM
in H <sub>2</sub> O; pH 7,5 mit HCl	

***Universalpuffer (mit niedriger oder hoher Cl-Konzentration):***

Zitronensäure	25 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	25 mM
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	25 mM
Tris	25 mM
KCl	25 mM oder 150 mM
β-Mercaptoethanol	10 mM
in H <sub>2</sub> O; pH 5,0-9,0 entweder mit K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> oder KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	

### 3.1.7.4. Lösungen für funktionelle Messungen und in vitro-Kalibration der pH-Sensoren

#### **HBS-Puffer (mit oder ohne $\text{Ca}^{2+}$ ):**

NaCl	28 mM
KCl	6 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
HEPES	10 mM
Glucose	5,5 mM
BSA	0,2 %
entweder mit CaCl <sub>2</sub> (1 mM) oder EGTA (2 mM)	
in H <sub>2</sub> O; pH 7,4 mit NaOH	

#### **K<sup>+</sup>-basierter HBS-Puffer:**

KCl	128 mM
NaCl	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
Glucose	5,5 mM
BSA	0,2 %
HEPES	10 mM
in H <sub>2</sub> O; pH 5,5-8,0 mit HCl	

#### **MBS-Puffer (mit oder ohne $\text{Ca}^{2+}$ ):**

NaCl	128 mM
KCl	6 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
MES	10 mM
Glucose	5,5 mM
BSA	0,2 %
entweder mit CaCl <sub>2</sub> (1 mM) oder BAPTA (2 mM)	
in H <sub>2</sub> O; pH 5,5 mit HCl	

#### **KCl-Lösung:**

KCl	140 mM
MES	10 mM
BAPTA	2 mM
in H <sub>2</sub> O, pH 5,5 mit KOH	

***Pipettenlösung (intrazelluläre Lösung) für Gesamtzell- und cell-attached-Messungen:***

Cäsiummethansulfonat	110 mM
CsCl	25 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
CaCl <sub>2</sub>	3,62 mM
EGTA	10 mM
HEPES	30 mM
Mannitol bis 340 mosm/l	
in H <sub>2</sub> O, pH 7,2 mit CsOH	

***Badlösung für Gesamtzell-Messungen (Standard-Badlösung):***

NaCl	140 mM
CaCl <sub>2</sub>	2 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
Glucose	5 mM
HEPES	10 mM
Mannitol bis 340 mosm/l	
in H <sub>2</sub> O, pH 7,4 mit NaOH	

***NMDG<sup>+</sup>-Badlösung für Gesamtzell-Messungen:***

NMDG <sup>+</sup>	140 mM
EDTA	0,2 mM
HEPES oder MES oder Citrat	10 mM
Mannitol bis 340 mosm/l	
in H <sub>2</sub> O, pH 7,4 mit HCl	

***KCl-Badlösung für cell-attached-Messungen:***

KCl	140 mM
EDTA	0,2 mM
HEPES oder MES	10 mM
Mannitol bis 340 mosm/l	
in H <sub>2</sub> O, pH 7,4 mit HCl	

### 3.1.7.5. Lösungen für Membranpräparation, Solubilisierung und Immunpräzipitation

#### **PBS (Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung):**

NaCl	128 mM
KCl	2,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
in H <sub>2</sub> O; pH 7,4	

#### **hypotoner Membranpuffer:**

HEPES	50 mM
EDTA	1 mM
Leupeptin	10 mg/ml
Aprotinin	10 mg/ml
in H <sub>2</sub> O; pH 7,5 mit HCl	

#### **Solubilisierungs- und Immunpräparationspuffer (RIPA-Puffer):**

Tris	20 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
Nonidet P-40	1 %
Desoxycholat	0,5 %
SDS	0,1 %
Leupeptin	10 mg/ml
Aprotinin	10 mg/ml
in H <sub>2</sub> O; pH 7,5 mit HCl	

### 3.1.7.6. Lösungen für SDS-Page und Western-Blot

#### **3 x SDS-Probenpuffer:**

Tris-HCl	190 mM
SDS	6 %
Glycerin	30 %
Dithiotreitol	150 mM
Pyronin Y	0,01 %
Bromphenolblau	0,01 %
in H <sub>2</sub> O; pH 6,8 mit NaOH	

**4 x Sammelgelpuffer:**

Tris	500 mM
SDS	0,4 %
in H <sub>2</sub> O; pH 6,8 mit HCl	

**4 x Trenngelpuffer:**

Tris	1,5 M
SDS	0,4 %
in H <sub>2</sub> O; pH 8,8 mit HCl	

**Elektrophorese-Laufpuffer:**

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 %
in H <sub>2</sub> O	

**Transfer-Puffer:**

Tris	25 mM
Glycin	200 mM
Methanol	20 %
in H <sub>2</sub> O	

**TBS und TBS-T:**

Tris	20 mM
NaCl	137 mM
Tween-20	0,1 %
in H <sub>2</sub> O; pH 7,4 mit HCl	

**3.2. Molekularbiologische Methoden**

Die angewendeten molekularbiologischen Standardmethoden sind ausführlich im Handbuch „Molecular Cloning“ von Sambroock & Russel (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001) beschrieben.

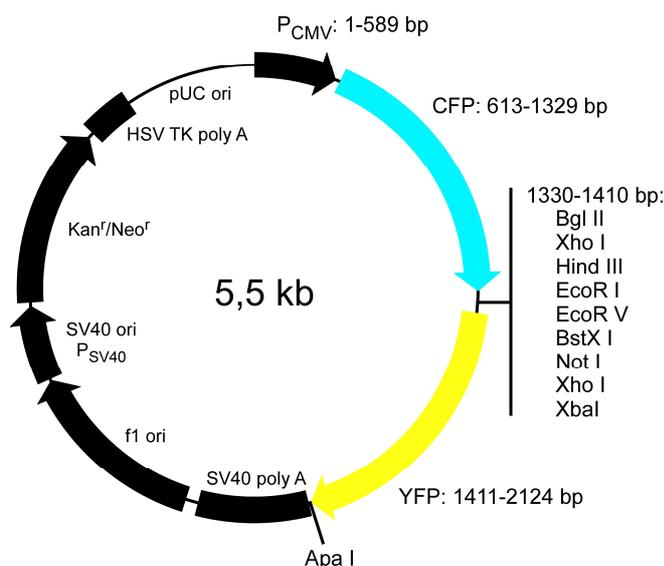
Für die heterologe Expression in Säugetierzellen wurden die Expressionsplasmide pcDNA3 und pcDNA3.1-V5/His-TOPO genutzt. Die Vektoren enthalten den Replikationsursprung ColE1 für *E. coli*, einen Polylinker mit vorgeschaltetem CMV-Promotor und nachgeschalteter Polyadenylierungssequenz, ein Neomycin-Resistenzgen, das durch den SV40-Promotor angetrieben wird, sowie ein Ampicillin-Resistenzgen. Der linearisierte Vektor pcDNA3.1-

V5/His-TOPO besitzt an beiden Enden zusätzlich 3'-Desoxythymidin-Überhänge an denen das Enzym Topoisomerase I kovalent gebunden ist. Somit ließen sich die mittels einer Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) erzeugten DNA-Fragmente über deren 3'-Desoxyadenosin-Einzelbasenüberhang innerhalb von 5 min ohne die Verwendung einer weiteren Ligase in den Vektor klonieren.

Alle hergestellten Konstrukte wurden auf ihre Identität und Korrektheit durch Sequenzierung der cDNA mit einem ABI-Prism 377-Sequenziergerät (Perkin Elmer, Norwalk, CT) überprüft.

### 3.2.1. Generierung der fluoreszierenden pH-Sensoren

Die YFP-kodierende Sequenz aus pcDNA3-YFP bzw. die Citrine-kodierende Sequenz aus pcDNA3-Citrine wurde über die EcoR I- und Apa I-Schnittstellen hinter die für das CFP kodierende Sequenz in den pECFP-C1 Vektor kloniert. Um eine 1:1 Stöchiometrie zwischen den beiden intramolekular gekoppelten Fluoreszenzproteinen CFP-YFP und CFP-Citrine zu gewährleisten, wurde dabei das Startkodon für das YFP und das Citrine entfernt. Aufgrund der gewählten Umklonierungsstrategie befindet sich zwischen den Fluorochromen ein Linker von 27 Aminosäuren, der Restriktionsstellen von den „multiple cloning sites“ beider Vektoren enthält (siehe Abb. M1). Somit umfassen die Tandemproteine CFP-YFP und CFP-Citrine insgesamt eine Länge von 506 Aminosäuren. Die Expressionsplasmide der pH-Sensoren wurden als pcDNA3-CFP-YFP und pcDNA3-CFP-Citrine bezeichnet.



**Abbildung M1: Schematische Darstellung des Expressionsplasmids pcDNA3-CFP-YFP**

Das Expressionsplasmid pcDNA3-CFP-YFP codiert für den fluoreszierenden pH-Sensor CFP-YFP-Tandem und verfügt über: einen Promotor des humanen Cytomegalievirus ( $P_{CMV}$ ), den offenen Leserahmen für das cyan und das gelb fluoreszierende Protein (CFP, YFP) mit einem dazwischen liegenden Linker bestehend aus Restriktionsstellen der verwendeten Vektoren, eine nachgeschalteten Polyadenylierungssequenz (SV40 polyA) und ein Kanamycin- und ein Neomycin-Resistenzgen ( $Kan^r/Neo^r$ ), das durch den SV40-Promotor angetrieben wird

(SV40 ori,  $P_{SV40}$ ), einen f1 Einzelstrang DNA-Ursprung (f1 ori), der den nicht-kodierenden CFP-YFP-Strang verpackt, sowie ein Polyadenylierungssignal der Thymidinkinase aus dem Herpes simplex Virus (HSV TK poly A) und einen Plasmid-Replikationsursprung (pUC).

### **3.2.2. Herstellung der TRPV-Konstrukte**

Für die Herstellung aller im Rahmen dieser Arbeit angefertigten TRPV-Konstrukte lagen Plasmide von TRPV1 (Ratte) und TRPV2 bis TRPV6 (Maus) vor, bei denen zuvor mittels PCR direkt vor dem Startkodon eine optimierte ribosomale Initiationssequenz (GCCACC; Kozak, 1987) und am Ende zwischen dem letzten kodierenden Triplet und dem Stoppkodon eine Restriktionsschnittstelle (Xba I bei TRPV1, TRPV3 und TRPV4 oder Xho I bei TRPV2, TRPV5 und TRPV6) für die Umklonierung in die Fusionsvektoren eingefügt wurde. Diese Expressionsplasmide wurden als pcDNA3-TRPV1 bis -TRPV6 bezeichnet.

#### ***Trunkierte TRPV1-Konstrukte sowie cytosolische N- und C-Termini von TRPV1 und TRPV4***

Die N- und C-terminale Verkürzung von TRPV1 sowie die Herstellung der cytosolischen N- und C-Termini von TRPV1 und TRPV4 erfolgte mittels PCR, wobei an den Enden der cDNAs durch die Vorwärts-Primer eine Initiationssequenz (Kozak, 1987) mit nachfolgendem Methionin und mit den Rückwärts-Primern eine Xba I-Schnittstelle mit einem „in-frame“-liegenden Stoppkodon (siehe Primerliste) generiert wurden. Die cytosolischen N-Termini von TRPV1 und TRPV4 enden mit den Lysinen K-425 bei TRPV1 bzw. K-462 bei TRPV4 aus der konservierten Aminosäuresequenz LLX(D/T)KWX(R/K)F, die sich kurz vor dem ersten putativen Transmembransegment befindet. Die löslichen C-Termini beginnen mit dem Methionin M-682 bei TRPV1 oder M-718 bei TRPV4 aus dem konservierten LIALMMG-Motiv der TRPV-Kanäle am Ende des sechsten putativen Transmembransegments.

#### ***Chimäre TRPV-Konstrukte***

Für die Konstruktion der TRPV-Chimären aus TRPV1 und TRPV4 oder TRPV3 mussten zuerst die BsmB I-Schnittstellen in der cDNA von TRPV1 und TRPV3 durch ortsgerichtete Mutagenese entfernt werden (siehe Primerliste). Danach wurden mittels PCR cDNAs generiert, die für den cytosolischen N- oder C-Terminus oder für die Transmembransegmenten mit jeweils einem der cytosolischen Termini kodieren. Hierbei wurden durch die Primer vor dem nativen Startkodon eine Initiationssequenz (Kozak, 1987), an dem geplanten Fusionsübergang der einzelnen cDNA-Segmente eine BsmB I-Schnittstelle und vor dem nativen Stoppkodon eine Xba I-Schnittstelle eingefügt (siehe Primerliste). Nach direktonaler Klonierung in den pcDNA3.1-V5/His-TOPO Vektor konnten durch einen sequentiellen Verdau mit BsmB I und

Hind III oder Xba I die einzelnen TRPV-Segmente zu den entsprechenden Chimären zusammengesetzt werden. Um Störungen in der Sekundär- und Tertiärstruktur der TRPV-Chimären zu vermeiden, wurden für die Fusionsübergänge Bereiche mit hochkonservierten Aminosäuren ausgewählt. N-terminale Austausche wurden im LLX(D/T)KWX(R/K)F-Motiv kurz vor dem ersten putativen Transmembransegment vorgenommen. C-terminale Austausche wurden im gemeinsamen LIALMG-Motiv am Ende des sechsten putativen Transmembransegments durchgeführt. Die Übergänge, an denen die Ligation der cDNAs vorgenommen wurde, sind unterstrichen. Alle Konstrukte wurden in voller Länge sequenziert und auf die Abwesenheit PCR-bedingter Mutationen überprüft.

### ***Primerliste***

Die verwendeten Primer wurden entweder von den Firmen Sigma-ARK (Steinheim), Roth (Karlsruhe), Qiagen Operon (Hilden) oder vom Biochemisch-Technologischem Zentrum (BioTeZ) Berlin-Buch synthetisiert. Sie wurden entschützt und HPLC-gereinigt geliefert. Die Triplets in den Primern, die zu einer Mutation der cDNA führen, sind unterstrichen.

<u>Name</u>	<u>Sequenz</u>	<u>Ziel</u>
VR1-Kozak-For	5'-gcc acc atg gaa caa cgg gct agc tta gac-3'	TRPV1 mit Kozak-Sequenz
Xba-Stop-Apa	5'-g ggc cct tat tct aga tgc atg ctc gag c-3'	Xba I vor Stopkodon von TRPV1 einfügen
TRPV3-For2	5'-gcc acc atg aat gcc cac tcc aag ga	TRPV3 mit Kozak-Sequenz
TRPV3-Rev2	5'-tc tag aac cga cgt ttc tgg gaa ttc at-3'	TRPV3 Stopkodon durch Xba I ersetzen
TRPV4-GFP-For	5'-gcc acc atg gca gat cct ggt gat ggt ccc cgt gca g-3'	TRPV4 mit Kozak-Sequenz
TRPV4-GFP-Rev	5'-tc tag aag tgg ggc atc gtc cgt-3'	TRPV4 Stopkodon durch Xba I ersetzen

### *für die trunkierten TRPV1-Konstrukte*

Phospant1-For	5'-gcc acc atg cct atc atc act gtc agc t-3'	TRPV1 <sub>Δ1-73</sub>
VR1-NTerm2-For	5'-gcc acc atg gat gct gtg gct cag agt-3'	TRPV1 <sub>Δ1-118</sub>
VR1-ANK1-For	5'-gcc acc atg gcc cgg aag aca gac ag-3'	TRPV1 <sub>Δ1-179</sub>
VR1-ANK2-For	5'-gcc acc atg gac ttc ttc aag aaa acc aaa-3'	TRPV1 <sub>Δ1-233</sub>

VR1-ANK3-For	5'-gcc acc atg gat aac aca gtt gac aac ac-3'	TRPV1 $\Delta$ 1-295
V1-KozTM1Ende-For	5'-gcc acc atg aag tgg gac aga ttt gtc aag-3'	TRPV1 $\Delta$ 1-425
VR1-CTerm3-Rev	5'-tta tgc agt gct tgc atc cct-3'	TRPV1 $\Delta$ 803-838
VR1-CTerm2-Rev	5'-tta gtt gcc tgg gtc ctc gtt-3'	TRPV1 $\Delta$ 766-838
VR1-Nuc-Rev	5'-tta gtc cac cct gaa aca cca-3'	TRPV1 $\Delta$ 746-838
VR1-CTerm1-Rev	5'-tta cac ctg cag cag ctt gc-3'	TRPV1 $\Delta$ 729-838
V1-AnfTM6-Rev	5'-cta cat gag agc aat gag cat g-3'	TRPV1 $\Delta$ 682-838

*für die cytosolischen Termini von TRPV1 und TRPV4*

VR1-CTerm-For	5'-gcc acc atg ggt gag acc gtc aac-3'	TRPV1 C-Terminus
VR4-CTerm-For	5'-gcc acc atg ggt gag acc gtg gg-3'	TRPV4 C-Terminus
TRPV1-NTerm-Rev	5'-cg tct cca ctt gtc ctg tag gag tc-3'	TRPV1 N-Terminus
TRPV4-NTerm-Rev	5'-cg tct cca ctt gtc tct caa cag ttc-3'	TRPV4 N-Terminus

*für die TRPV-Chimären*

VR1-BsmBI-KO-Rev	5'-cgt ctc cca gcg <u>ctc</u> acg gag tcc tgg gat-3'	TRPV1 ohne BsmB I
V3-BsmBI-KO-For	5'-c ctg atg ggg gag <u>aca</u> gtg gag aat gtc tcc aaa gaa agt g-3'	TRPV3 ohne BsmB I
V3-BsmBI-KO-Rev	5'-c act ttc ttt gga gac att ctc cac <u>tgt</u> ctc ccc cat cag g-3'	TRPV3 ohne BsmB I
TRPV1-TM1End-For	5'-c gtc tcc aag tgg gac aga ttt gtc-3'	TRPV1 <sub>426-838</sub>
TRPV1-CTerm-For	5'-c gtc tcc atg ggt gag acc gtc aac-3'	TRPV1 <sub>683-838</sub>
TRPV1-NTerm-Rev	5'-cg tct cca ctt gtc ctg tag gag tc-3'	TRPV1 <sub>1-425</sub>
TRPV1-TM6Anf-Rev	5'-cg tct ccc cat gag agc aat gag c-3'	TRPV4 <sub>1-682</sub>
TRPV4-TM1End-For	5'-c gtc tcc aag tgg cgt aag ttt ggg-3'	TRPV4 <sub>463-871</sub>
TRPV4-CTerm-For	5'-c gtc tcc atg ggt gag acc gtg gg-3'	TRPV4 <sub>719-871</sub>
TRPV4-NTerm-Rev	5'-cg tct cca ctt gtc tct caa cag ttc-3'	TRPV4 <sub>1-462</sub>
TRPV4-TM6Anf-Rev	5'-cg tct ccc cat gag ggc gat aag c-3'	TRPV4 <sub>1-718</sub>
V3-NTerm-Rev	5'-cg tct cca ctt cgt gtg tag cag cgt atg-3'	TRPV3 <sub>1-432</sub>

*für die TRPV<sub>NML676FAP</sub>-Mutante*

VR1-NML-FAP-For	5'-cc tac atc ctt ctg ctc <u>ttc gct ccc</u> att gct ctc atg ggt g -3'	TRPV <sub>NML676FAP</sub>
VR1-NML-FAP-Rev	5'-c acc cat gag agc aat <u>ggg agc gaa</u> gag cag aag gat gta gg-3'	TRPV <sub>NML676FAP</sub>

### ***Dominant-negative TRPV1<sub>NML676FAP</sub>-Mutante***

Eine TRPV1-Mutante, bei der im sechsten Transmembransegment die drei Aminosäuren Arginin, Methionin und Leucin (NML) an den Positionen 676, 677 und 678 gegen Phenylalanin, Alanin und Prolin (FAP) ersetzt wurden, zeigte bei intakter Vanilloidbindung keine Aktivierung durch Capsaicin (Kuzhikandathil et al., 2001). Zur Herstellung dieser dominant-negativen TRPV1<sub>NML676FAP</sub>-Mutante wurde unter Verwendung des *QuickChange site-directed mutagenesis kit* eine ortsgerichteter Mutagenese durchgeführt.

### ***Konstruktion CFP-, YFP- und FLAG-Epitop-markierter TRPV-Kanäle und -Konstrukte***

Für Untersuchungen zur Proteinexpression und -lokalisation sowie für FRET-Analysen und Immunpräzipitationsexperimente mussten die TRPV-Kanaluntereinheiten, -Chimären, und -Termini bzw. -Trunkate sowie die TRPV1<sub>NML676FAP</sub>-Mutante mit dem cyan- bzw. gelb-fluoreszierenden Protein (CFP, YFP) oder mit einem FLAG-Epitop (DYKDDDDK) fusioniert werden.

### ***C-terminale Markierung***

Die Umklonierung von TRPV1, TRPV3 bis TRPV6 aus dem pcDNA3-Vektor in die Fusionsvektoren pcDNA3-YFP, pcDNA3-CFP oder pcDNA3-FLAG wurde mit Hilfe folgender Restriktionsenzyme durchgeführt:

TRPV1, TRPV3 und TRPV4:	Hind III und Xba I
TRPV5:	Kpn I und Xho I
TRPV6:	Hind III und Xho I

Für die Umsetzung der TRPV2-cDNA in die CFP- bzw. YFP-Fusionsvektoren war zuerst ein kompletter Verdau des Expressionsplasmids pcDNA3-TRPV2 mit Xho I und ein darauffolgender partieller Verdau mit Acc65 I notwendig. Die Markierung von TRPV2 mit dem FLAG-Epitop erfolgte durch einen Doppelverdau mit Mfe I und Xho I.

Die cDNA der TRPV-Chimären, der TRPV1<sub>NML676FAP</sub>-Mutante, der löslichen C-Termini von TRPV1 und TRPV4 sowie der N-terminal trunkierten TRPV1-Konstrukte wurde über einen Hind III/Xba I-Doppelverdau in die Vektoren pcDNA3-YFP oder pcDNA3-CFP umkloniert.

### ***N-terminale Markierung***

Die Markierung des N-terminalen Endes von TRPV4 und der cytosolischen N-Termini von TRPV1 und TRPV4 mit CFP bzw. YFP erfolgte über die Restriktionsschnittstellen Hind III und Xba I. Als Fusionsvektoren wurden pcDNA3-NYFP und pcDNA3-NCFP verwendet. Die cDNA von TRPV1 und der C-terminal trunkierten TRPV1-Konstrukte wurde nach einem sequentiellen Verdau der jeweiligen Expressionsplasmide mit Hind III und Apa I in die Vektoren pcDNA3-NYFP oder pcDNA3-NCFP umgesetzt.

## **3.3. Zellkultur und Expression**

### ***3.3.1. Zelllinien und Kultivierung***

Humane embryonale Nierenzellen (HEK293-Zellen; „human embryonic kidney“) wurden in MEM Earle's-Medium mit 10 % FCS, 4 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37°C kultiviert und alle 4 bis 5 Tage im Verhältnis 1:10 umgesetzt. Zum Passagieren und Aussetzen in Kulturschälchen wurden die Zellen 2 min bei 37°C mit Trypsin/EDTA-Lösung (Biochrom, Berlin) inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden dann in frischem Medium aufgenommen und in die entsprechenden Gefäße überführt.

Männliche Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von jeweils 180-200 g wurden durch eine Überdosis Halothan getötet und die Hinterwurzelganlien („dorsal root ganglia“, DRG) aus den Lumbarsegmenten L2/L3/L4/L5 explantiert. Die Aufarbeitung der DRG erfolgte nach Moises et al. (1994). Hierbei wurden die DRG in kaltem MEM-Medium (4°C) gewaschen und dann nacheinander mit Kollagenase (Typ II, 3 mg/ml in MEM-Medium) für 50 min bei 37°C und Trypsin (Typ I, 1 mg/ml in MEM-Medium) für 10 min bei 37°C inkubiert. Nach einer mechanischen Dissoziation der DRG-Neurone wurde der enzymatische Verdau durch die Zugabe von bovinem Serumalbumin (5 %, w/v) gestoppt. Die Zellen wurden daraufhin zweimal mit MEM-Medium gewaschen und anschließend in frischem MEM-Medium mit zusätzlich 10 % Pferdeserum und 50 ng/ml Nervenwachstumsfaktor („nerve growth factor“, NGF) resuspendiert. Die Neurone wurden auf Poly-L-Lysin-beschichtete Glasplättchen ausgesetzt und nach 12-36 h den jeweiligen Experimenten unterzogen.

### **3.3.2. Heterologe Genexpression in eukaryotischen Zellen**

#### **3.3.2.1. Transiente Transfektion**

Für funktionelle Untersuchungen, subzelluläre Lokalisationsstudien, FRET-Messungen und Immunpräzipitationsexperimente wurden die pH-Sensoren und TRPV-Konstrukte in HEK293-Zellen transient exprimiert. Die Zellen wurden einen Tag vor Transfektion in Kulturschalen mit 3 cm oder 6 cm Durchmesser ausgesetzt. Dabei wurde beachtet, dass die Konfluenz der Zellen in der Kulturschale am Tag der Transfektion bei 50-70 % lag. Die Zellen wurden wie folgt transfiziert:

##### **a) für Immunpräzipitationsexperimente:**

Das Expressionsverhältnis der beiden FLAG- oder YFP-gekoppelten Proteine sollte 1:1 betragen. Die dafür erforderlichen DNA-Mengen wurden in Fluoreszenz-Imaging-Experimenten abgeleitet, bei denen CFP- bzw. YFP-markierte TRPV-Kanaluntereinheiten in HEK293-Zellen koexprimiert und über deren Fluoreszenzintensitäten das Expressionsverhältnis ermittelt wurde (Lenz et al., 2002). Entsprechend diesen Ergebnissen wurden pro 6 cm-Kulturschale 0,7-3,5 µg FLAG-markierte TRPV-cDNA und 0,2-3,5 µg YFP-markierte TRPV-cDNA mit einem Gemisch aus 200 µl MEM Earle's Medium und 8 µl FuGene6-Transfektions-Reagenz kurz geschüttelt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA/Fugene-Mischung wurde nach der Inkubationszeit tropfenweise dem Medium auf den HEK293-Zellen zugegeben. Für das Koimmunpräzipitationsexperiment mit den 3 Proteinen TRPV2-FLAG, TRPV1-YFP und TRPV2-YFP wurden 1,5 µg, 1,25 µg und 1,25 µg der jeweiligen Plasmid-cDNAs eingesetzt, entsprechend einem Expressionsverhältnis von ca. 2:1:1.

##### **b) für $Ca^{2+}$ - und pH-Messungen:**

Die Transfektion wurde mit 4 µg Plasmid-cDNA des YFP-markierten TRPV-Konstrukts oder mit einem Gemisch aus den Plasmid-cDNAs des unmarkierten Kanals (3,5 µg) und des pH-Sensors (0,5 µg) wie unter a) angegeben durchgeführt.

Für die weiteren funktionellen Versuche wurden am nächsten Tag Glasplättchen in 3 cm-Kulturschalen gelegt und die transfizierten Zellen darauf ausgesetzt.

***c) für FRET-Messungen:***

HEK293-Zellen wurden auf Glasplättchen in 3 cm-Kulturschalen ausgesetzt und mit 0,1-0,5 µg Plasmid-cDNA des CFP-markierten TRPV-Kanals und 1,5-1,9 µg Plasmid-cDNA des YFP-markierten TRPV-Kanals kotransfiziert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass bei allen FRET-Experimenten das molare Verhältnis der YFP- und CFP-markierten Kanäle zwischen 0,8 und 3 (YFP:CFP) lag. Das Expressionsverhältnis wurde durch den Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der koexprimierten TRPV-Kanäle mit denen des intramolekular gekoppelten und daher in 1:1 Stöchiometrie vorliegenden CFP-YFP-Tandemproteins ermittelt (Lenz et al., 2002).

***d) für Aufzeichnung der subzellulären Lokalisation:***

Auf Glasplättchen ausgesetzte HEK293-Zellen (3 cm-Kulturschale) wurden mit 2 µg YFP-markierter TRPV-cDNA oder für Kollokalisationsstudien mit einem cDNA-Plasmid Gemisch aus 1,5 µg des CFP-fusionierten TRPV-Kanals und 0,5 µg des YFP-fusionierten TRPV-Kanals wie unter a) beschrieben transfiziert.

***e) für elektrophysiologische Messungen***

Am Tag der Transfektion (1 µg Plasmid-cDNA des YFP-markierten TRPV1) lag die Konfluenz der Zellen bei 10 %-15 %. Dadurch wurde gewährleistet, dass am nächsten Tag für die Messungen vereinzelte transfizierte Zellen vorlagen.

***3.3.2.2. Herstellung stabiler Zelllinien***

Zur Herstellung der stabilen CFP-, YFP- und CFP-YFP-Zelllinien wurden HEK293-Zellen in einer 6 cm-Kulturschale mit 4 µg Plasmid-cDNA (pcDNA3-NCFP, pcDNA3-NYFP oder pcDNA3-CFP-YFP) wie zuvor beschrieben (siehe unter 3.3.2.1.) transfiziert. Zur Selektion stabil transfizierter Zellen wurde die Neomycin-Resistenz des pcDNA3-Vektors genutzt. Somit wurden die Zellen zwei Tage nach Transfektion in MEM Earle's-Medium mit 1 mg/ml Geneticin (G418) kultiviert. Zwei Tage nach Beginn der Selektion wurden sie in Verdünnungsreihen auf 10 cm-Kulturschalen ausgesetzt. Nach anderthalb bis zwei Wochen bildeten sich abgrenzbare fluoreszierende Zellklone, die mit der Pipette unter dem Fluoreszenzmikroskop aspiriert, in Selektionsmedium verdünnt und in einer 96-Kavitäten-Platte in einem Verhältnis von einer Zelle pro Kavität ausgesetzt wurden. Konnte in einer Kavität aus einer einzelnen Zelle ein Klon

heranwachsen, so wurde dieser weiter kultiviert. Bei ausreichender Zellzahl wurden die Fluoreszenzeigenschaften (Anregungsspektrum und Intensität) überprüft. Für jedes Fluoreszenzprotein wurden jeweils Zellen eines Klons mit kräftiger Fluoreszenz und eines Klons mit schwacher Expression expandiert und für die Messungen verwendet.

### **3.4. Fluoreszenz-Imaging**

#### ***3.4.1. In vitro-Titration der Fluoreszenzproteine CFP und YFP und des CFP-YFP-Tandemproteins***

Die stabil CFP, YFP, oder das CFP-YFP-Tandemprotein exprimierenden HEK293-Zelllinien wurden für die Extraktion und Titration der Fluoreszenzproteine verwendet (siehe 3.3.2.2.). Die Zellen einer konfluent bewachsenen 75 cm<sup>2</sup>-großen Zellkulturflasche wurden in PBS gewaschen (1000 x g für 10 min) und die Zellpellets in 200 µl Extraktionspuffer (siehe 3.1.7.3.) aufgenommen. Die Fluoreszenzproteine wurden durch mechanischen Aufschluß der HEK293-Zellen mit einer dünnen Kanüle (27 G) freigesetzt. Membranfragmente und die Zellkerne wurden durch Zentrifugation bei 24.000 x g für 30 min bei 4°C entfernt. Der Überstand mit dem extrahierten löslichen Protein wurde für die Messungen in Universalpuffer mit unterschiedlichen pH-Werten (siehe 3.1.7.3.) verdünnt. Der pH-Wert wurde nach jeder Messung nochmals kontrolliert. Die Emissionsspektren wurden mit einem Fluoreszenzspektrometer (Perkin Elmer LS-50B) aufgezeichnet. Die Anregungswellenlänge wurde auf 490 nm für YFP oder 435 nm für CFP und das CFP-YFP-Tandemprotein festgesetzt, jeweils mit einer Spaltbreite von 5 nm. Die Emission wurde in 1 nm-Schritten mit einer Spaltbreite von 10 nm abgetastet.

#### ***3.4.2. BCECF- und Fura 2-Messungen***

Die Messungen des intrazellulären pH und der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration erfolgten bei einem extrazellulärem pH (pH<sub>ext</sub>) von 7,4 in HBS-Puffer, bei pH<sub>ext</sub> von 5,5 in MES-Puffer oder KCl-Lösung (siehe 3.1.7.4.). Für Ca<sup>2+</sup>-freie extrazelluläre Bedingungen wurde das CaCl<sub>2</sub> je nach pH<sub>ext</sub> durch EGTA (pH 7,4) oder BAPTA (pH 5,5) ersetzt. Die Zugabe der Aktivatoren und Inhibitoren sowie der Pufferwechsel erfolgten über ein Durchflußsystem.

##### ***a) pH<sub>i</sub>-Messungen mit BCECF/AM***

Für die Messungen des cytosolischen pH in DRG-Neuronen und in TRPV1-transfizierten

HEK293-Zellen wurde der pH-Indikator 2',7'-Bis-(2-carboxyethyl)-5,6-carboxyfluorescein (BCECF) verwendet. Bei der Protonierung des Indikators bleibt das Emissionsmaximum ( $\lambda_{\text{Emax}} = 530 \text{ nm}$ ) unverändert, und auch das Absorptionsmaximum verschiebt sich nur geringfügig von 505 nm bei pH 9 auf 495 nm bei pH 6. Demgegenüber weist jedoch die Fluoreszenzintensität von BCECF eine deutliche pH-Abhängigkeit auf. Eine Erhöhung des pH führt zu einer schwachen Intensitätsabnahme der BCECF-Emission bei Anregungswellenlängen unter 440 nm (isosbestischer Punkt) und zu einer deutlichen Erhöhung der Fluoreszenzintensität bei Wellenlängen oberhalb 440 nm. Der  $\text{pK}_a$  von BCECF *in vitro* beträgt 6,97 (Rink et al., 1982; James-Kracke, 1992). Für die  $\text{pH}_i$ -Messungen wurden die nativen DRG-Neurone oder transfizierte HEK293-Zellen auf Glasplättchen ausgesetzt und in HBS-Puffer mit 0,5-0,8  $\mu\text{M}$  BCECF/AM für 30 min bei 37°C inkubiert. BCECF ist aufgrund seiner vier Carboxylgruppen nicht membrangängig. Durch die Veresterung der Carboxylgruppen des Farbstoffes (Acetoxymethylester) kann das lipophilere Molekül durch die Membran permeieren. Im Cytosol werden die Estergruppen durch ubiquitär exprimierte Esterasen wieder hydrolysiert. Die Zellen wurden anschließend in die Messkammer eines invertierten Mikroskops (Axiovert 100, Carl Zeiss, Jena) eingespannt. Weiterhin gehörte zur Ausstattung ein Monochromator (Polychrome II oder Polychrome IV, TILL-Photonics, Martinsried) mit einer Xenondampflampe und eine Peltier-gekühlte CCD-Kamera (IMAGO, Till-Photonics). Die Messungen wurden mit einem Fluor 10x/0,5-Objektiv durchgeführt. Die Fluoreszenz von BCECF wurde über einen 505 nm-Farbteiler sequentiell bei 420, 440 und 490 nm angeregt. Das Emissionslicht wurde über einen nachgeschalteten 510 nm-Langpassfilter zur Kamera geleitet. Da beim isosbestischen Punkt (440 nm) die Intensität der BCECF-Emission unabhängig von der Protonenkonzentration ist, konnten durch Messungen bei dieser Wellenlänge später Artefakte wie das Ausbleichen des Farbstoffes berücksichtigt werden. Das Hintergrundsignal wurde am Ende der Messung nach Abspülen der Zellen ermittelt und von den Daten subtrahiert.

Für die Berechnung der cytosolischen Protonenkonzentration aus den gemessenen BCECF-Fluoreszenzen wurde das Anregungsspektrum der freien unprotonierten Form des BCECF ( $\text{BCECF}^-$ ) und der protonierten Form ( $\text{BCECF-H}$ ) aufgezeichnet. Hierfür wurde der cytosolische pH von BCECF-beladenen HEK293-Zellen mittels Nigericin ( $\text{K}^+/\text{H}^+$ -Ionophor, 10  $\mu\text{M}$ ) und Monensin ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Ionophor, 10  $\mu\text{M}$ ) in einem  $\text{K}^+$ -basierten HBS-Puffer (128 mM KCl, 10 mM

NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 5,5 mM Glucose, 0,2 % BSA, 10 mM HEPES; pH 5,0-9,0) auf die pH-Werte 9,0 und 5,0 äquilibriert. Die Anregungsspektren wurden in einer Datenbank abgelegt und dienen zur Analyse der spektralen Eigenschaften der experimentellen Daten. Die Berechnung der relativen Konzentrationen von BCECF<sup>-</sup> und BCECF-H in den Zellen erfolgte mittels multivarianter linearer Regressionsanalyse (Lenz et al., 2002). Die BCECF-Konzentrationen wurden dann wie folgt in die pH<sub>i</sub>-Werte umgerechnet:

$$\text{pH}_i = \text{pK}_a - \log \left( \frac{[\text{BCECF-H}]}{[\text{BCECF}^-]} \right)$$

$$\text{pK}_a = 6.97 \text{ (Rink et al., 1982; James-Kracke, 1992).}$$

### ***b) Ca<sup>2+</sup>-Messungen mit Fura 2***

Die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) kann mit dem fluoreszierenden Ca<sup>2+</sup>-Chelator Fura 2 unabhängig von der Farbstoffkonzentration, der Zelldicke, der Intensität des anregenden Lichtes, dem Ausbleichen des Farbstoffes oder der Kamera-Sensitivität erfasst werden (Grynkiewicz et al., 1985). Durch Bindung von Ca<sup>2+</sup> an den Indikator verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 363 nm nach 335 nm. Das Emissionsmaximum bleibt davon jedoch nahezu unbeeinflusst (512 nm; 505 nm).

Fura 2 ist auch in der Lage, mit einer Reihe anderer divalenter Kationen zu interagieren wie Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> und Cd<sup>2+</sup> (Takahashi et al., 1999). Mn<sup>2+</sup> wird zum Beispiel von einer Vielzahl von Ca<sup>2+</sup>-permeablen Ionenkanälen geleitet und bildet mit Fura 2 einen hochaffinen nichtfluoreszierenden Komplex (Mn<sup>2+</sup>-Quench). Für die Messung des Mn<sup>2+</sup>-Einstroms wird die Fluoreszenzemission am isosbestischen Punkt (358 nm) gemessen, da diese unempfindlich gegenüber Veränderungen der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> ist.

Die auf Glasplättchen ausgesetzten Zellen wurden für 30 min bei 37°C mit 3-4 μM Fura 2/AM in HBS-Puffer geladen. Die Zellen wurden anschließend mit HBS gewaschen und in die Meßkammer eines invertierten Mikroskops eingespannt. Die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Bestimmungen wurden mit dem gleichen Versuchsaufbau (Geräte, Farbteiler und Emissionsfilter) wie unter 3.4.2.a) beschrieben durchgeführt. Die Fluoreszenzfarbstoffe Fura 2 und YFP wurden alternierend bei 340 nm, 358 nm, 380 nm und 480 nm angeregt. Durch das von Lenz et al. (2002) beschriebene

Verfahren wurden aus den aufgezeichneten Fluoreszenzen die Signalanteile der einzelnen Fluorochrome separiert und die  $[Ca^{2+}]_i$  berechnet.

### **3.4.3. Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)**

Wird Licht mit geeigneter Wellenlänge in ein System eingestrahlt, kann es von Molekülen absorbiert werden und dabei Elektronen in einen angeregten Schwingungszustand versetzen. Ein angeregtes Molekül kann seine Energie dann zum Beispiel in Form von Fluoreszenz oder Phosphoreszenz wieder abgeben. Hierbei kommt es zur Emission elektromagnetischer Strahlung, deren Wellenlänge im Vergleich zur anregenden Strahlung länger ist. Weiterhin kann ein angeregtes Fluorophor (Donor) seine Energie auch strahlungslos an ein zweites Fluorophor (Akzeptor) übertragen. Bei diesem Vorgang wird die Energie mittels induktiver Resonanz transferiert. Dieser Prozeß wird daher auch als Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) bezeichnet. Voraussetzung hierfür ist, dass die Energiedifferenz zwischen dem metastabilen Zustand und Grundzustand des Donors groß genug ist, den Akzeptor anzuregen. Die Effizienz des Energietransfers ist abhängig von dem Ausmaß der Überlappung zwischen den Donor-Emissions- und Akzeptor-Absorptionsspektren, der relativen Orientierung der Donor- und Akzeptor-Übergangsdipole (räumliche Orientierung) und vor allem von der Distanz zwischen Donor und Akzeptor. Theodor Förster beschrieb 1948 theoretisch die quantenmechanischen Grundzüge des FRET und leitete daraus die Entfernungsabhängigkeit der Effizienz  $E$  des Energietransfers ab:

$$E = \frac{1}{1 + (r/R_0)^6}$$

Der Abstand  $R_0$ , bei dem die FRET-Effizienz 50 % beträgt, wird als Förster-Radius bezeichnet. Er ist abhängig von der Kombination der Fluorophore und liegt in der Regel bei Distanzen von weniger als 8 nm. Die Abstandsabhängigkeit konnte 1967 von Lubert Stryer und Richard Haugland durch Fluoreszenz-Experimente mit RNS-Fragmenten bekannter Länge bestätigt werden. Die FRET-Effizienz gibt Informationen über Proteindistanzen im sub-Nanometer-Bereich und sinkt typischerweise bei Entfernungen über 12 nm unter die Nachweisgrenze. Das Auftreten eines FRET ist somit ein sicherer Indikator für die nahe Lage zweier Moleküle.

In unseren Messungen wurde das cyan fluoreszierende Protein („cyan fluorescent protein“, CFP) als Donor und das gelb fluoreszierende Protein („yellow fluorescent protein“, YFP) als Akzeptor verwendet. Das CFP-Fluorochrom besitzt ein Absorptionsspektrum von ca. 380-475 nm ( $\lambda_{Amax} = 437$  nm) und ein Emissionsspektrum von ca. 470-530 nm ( $\lambda_{Emax} = 476$  nm). Das Absorptionsspektrum der YFP-Farbvariante umfasst den Bereich von ca. 470-515 nm ( $\lambda_{Amax} = 512$  nm). Die Emission liegt bei ca. 520-600 nm ( $\lambda_{Emax} = 535$  nm). Die FRET-Effizienz zwischen den zwei Fluorochromen CFP und YFP läßt sich durch unterschiedliche Vorgehensweisen bestimmen.

#### **a) Akzeptor-Bleichverfahren**

Für die Bestimmung der  $pK_a$ -Werte und Hill-Koeffizienten der pH-Sensoren, der FRET-Effizienz zwischen den intramolekular gekoppelten Fluorochromen und zwischen den CFP- bzw. YFP-markierten TRPV-Konstrukten wurde das Akzeptor-Bleichverfahren („acceptor photobleaching“ oder „donor unquenching“) durchgeführt.

Hierbei wird der FRET zwischen CFP und YFP durch das Ausbleichen des Akzeptors (YFP) und dem gleichzeitigen Messen der Donor-Fluoreszenz (CFP) ermittelt. Im Falle eines Energietransfers führt die Anregung des Donor über FRET zur Anregung des längerwelligen Akzeptors, wobei die Donor-Emission abnimmt. Durch das Ausbleichen des Akzeptors wird der Energie-Transfer unterbunden und es kommt zu einem Anstieg der Donor-Fluoreszenz entsprechend des zuvor an den Akzeptor abgegebenen Energieanteils. Diese Messungen erlauben eine direkte Quantifizierung der FRET-Effizienz (E) über die Formel:

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D}$$

wobei  $F_{DA}$  für die gemessene CFP-Fluoreszenz vor dem Ausbleichen des Akzeptors und  $F_D$  für die CFP-Fluoreszenz bei Abwesenheit des Akzeptors steht.  $F_D$  wurde über die Erholung der CFP-Fluoreszenzintensität während des fraktionellen Ausbleichens des Akzeptors durch lineare Regressionsanalyse und Extrapolation der CFP-Fluoreszenz bei einer YFP-Fluoreszenz von Null bestimmt.

Die Messungen wurden wie unter 3.4.2.a) beschrieben in HBS-Puffer an einem Zeiss Axiovert 100-Mikroskop mit einem Polychrom II-Monochromator und einer IMAGO CCD-Kamera durchgeführt. Für die Messungen wurden weiterhin ein halbdurchlässiger Spiegel (80 % Transmission, 20 % Reflexion), ein Plan-Apochromat 63x/1,4- oder ein F-Fluar 40/1,3-Objektiv und ein motorisiertes Lambda 10/2- Emissionsfilterrad (Sutter Instruments, Novato, CA) mit Bandpassfiltern 460-500 nm und 535-580 nm verwendet. Bei jedem Messzyklus wurde der CFP-Donor bei 410 nm für 20-60 ms und der YFP-Akzeptor bei 510 nm für 10-15 ms angeregt. Die CFP-Fluoreszenz wurde mit dem Bandpassfilter 460-500 nm gemessen. Die Aufnahme der YFP-Fluoreszenz erfolgte mit dem 535-580 nm Bandpassfilter. Das Messprotokoll begann mit 15 Zyklen in denen nur die CFP- und YFP-Emission aufgezeichnet wurde, gefolgt von 60 Zyklen bei denen zusätzlich am Ende jedes Messzyklus ein YFP-Ausbleichvorgang (2100 ms bei 512 nm) durchgeführt wurde.

#### ***b) zeitaufgelöste FRET-Messungen***

Für die Messung zeitlicher Veränderungen des  $pH_i$  in HEK293-Zellen, die das CFP-YFP- oder CFP-Citrine-Tandemprotein exprimieren, wurden zeitaufgelöste FRET-Messungen durchgeführt. Bei der zeitaufgelösten FRET-Messung wird für die Aufzeichnung des FRET eine preferentiell den Donor anregende Wellenlänge verwendet und die Emission über einen hauptsächlich für die Akzeptor-Fluoreszenz durchlässigen Bandpassfilter geleitet (FRET-Kanal). Zur Berechnung der FRET-Effizienz müssen die in den FRET-Kanal herüberblutenden Fluoreszenzanteile des Donors und des direkt angeregten Akzeptors berücksichtigt werden. Hierfür werden auch bei jeder Messung die reinen Donor- und Akzeptor-Fluoreszenzen aufgezeichnet.

Der FRET wurde durch Anregung bei 430 nm und Aufzeichnen der Emission mit dem 535-580 nm Bandpassfilter gemessen (FRET-Kanal). Die Aufzeichnung der reinen CFP- und YFP- bzw. Citrine-Fluoreszenzen erfolgte bei 430 nm Anregung und mit dem Bandpassfilter 460-500 nm (CFP) und bei 500 nm-Anregung mit dem 535-580 nm Bandpassfilter (YFP). Die über den FRET-Kanal ermittelten Fluoreszenzen wurden nach jeder Messung bezüglich der in den 535-580 nm Bandpassfilter hineinstrahlenden CFP-Emission und der direkten Anregung von YFP bei 430 nm korrigiert. Die Korrekturfaktoren wurden zuvor mit Zellen, die nur CFP oder nur YFP exprimieren, bestimmt. Diese Messungen ergaben, dass im FRET-Kanal 30,6 % der CFP-Emission (100 % ermittelt mit dem 460-500 nm Bandpassfilter) und 2,41 % der YFP- oder

Citrine-Fluoreszenz (100 % bei 510 nm Anregung gemessen) aufgezeichnet werden. Somit ergibt sich für die reine FRET-Fluoreszenz ( $F_{\text{FRET}}$ ):

$$F_{\text{FRET}} = F_{\text{FRET-Kanal}} - 0,306 \times F_{\text{CFP}} - 0,0241 \times F_{\text{YFP}}$$

Weiterhin mußte bei der Ermittlung der FRET-Effizienz berücksichtigt werden, dass bei den hier verwendeten Bedingungen (Quanteneffizienzen der Fluorochrome, Filtersätze, spektrale Empfindlichkeit der CCD-Kamera) die Emission über FRET 1,78-fach heller erscheint als die direkte CFP-Emission. Dieser Faktor wurde an CFP-YFP-Tandemprotein-exprimierenden HEK293-Zellen bestimmt und dadurch bestätigt, dass zum einen sowohl bei zeitaufgelösten FRET-Messungen als auch bei Durchführung des Akzeptor-Bleichverfahrens mit diesem Faktor identische FRET-Effizienzen von 51 % ermittelt wurden und zum anderen die Summe aus direkt gemessener CFP-Emission und korrigiertem FRET-Signal während des Ausbleichens des Akzeptors konstant blieb. Somit kann die FRET-Effizienz (E) wie folgt berechnet werden:

$$E = \frac{F_{\text{FRET}}}{F_{\text{FRET}} + 1.78 F_{\text{CFP}}}$$

### 3.5. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die Analyse der subzellulären Lokalisation heterolog exprimierter TRPV-Kanaluntereinheiten sowie ein Teil der Messungen der TRPV1-vermittelten intrazellulären Ansäuerung mittels des CFP-YFP-Tandemproteins erfolgten über ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510 META, Carl Zeiss, Jena), das mit einem Argon-Laser ausgestattet war. Für die Aufnahmen wurde ein Plan-Apochromat 63x/1,4- oder ein  $\alpha$ -Plan-Fluar 100x/1,45-Objektiv benutzt.

#### *a) konfokale $\text{pH}_i$ -Messungen*

HEK293-Zellen wurden transient mit Plasmiden, die für TRPV1 und das CFP-YFP-Tandemprotein kodieren, kotransfiziert (siehe 3.3.2.1). Der pH-Sensor wurde mit der 458 nm Linie eines Argon-Lasers über einen 458 nm-Hauptfarbteiler angeregt und das emittierte Licht der Wellenlängen 466-550 nm spektral über acht Photomultiplier jeweils im Abstand von 10,5 nm (Lambda-Mode des LSM META) aufgetrennt. Die konfokalen Pinholes und die

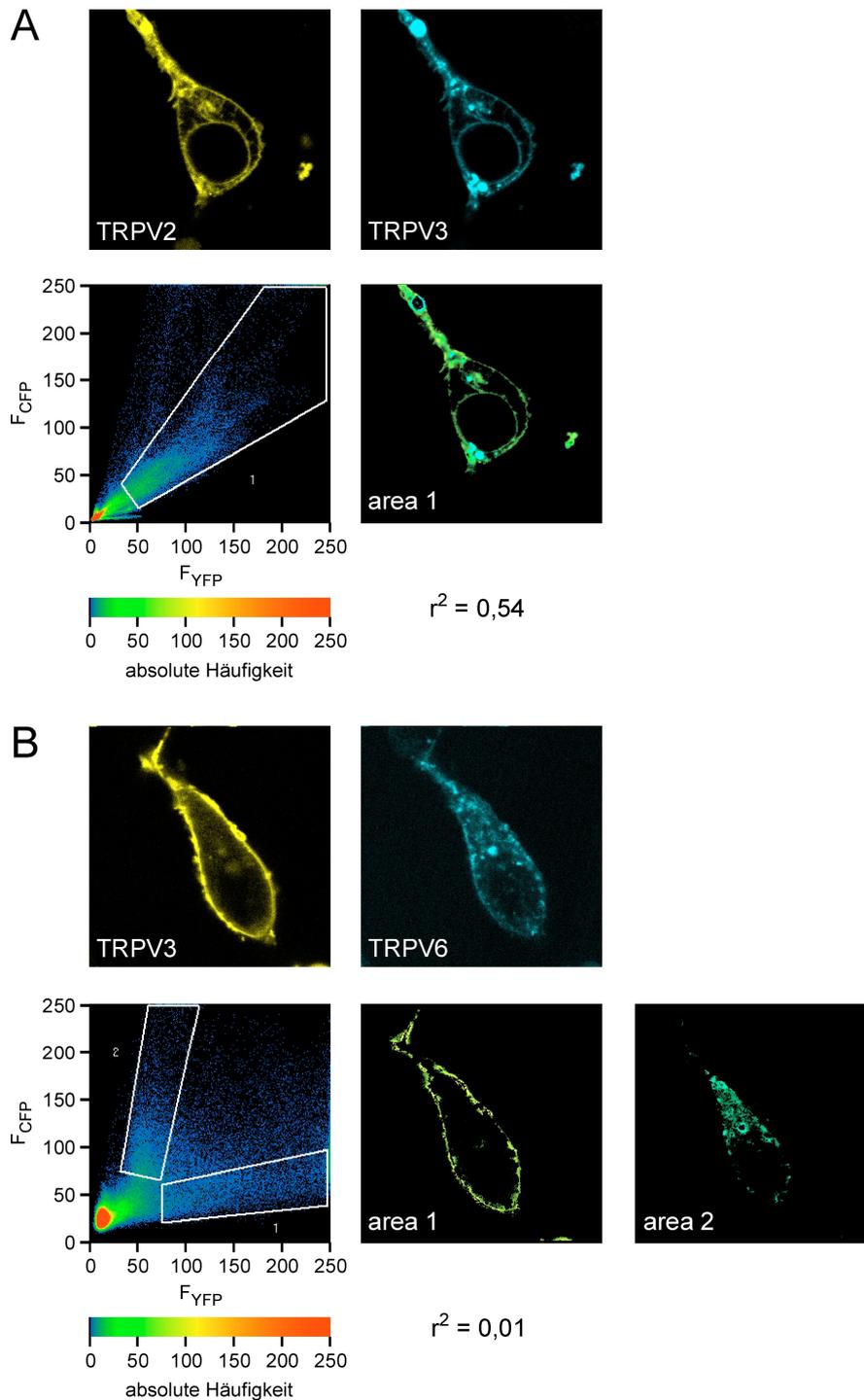
Laserintensität wurden so eingestellt, dass optische Schnitte von ca. 2 µm erreicht und die Fluorochrome während der Messung nur zu maximal 2 % geblichen wurden. Die Signale des Tandemproteins wurden mittels Regressionsanalyse mit gespeicherten Spektren der einzelnen Fluorochrome (CFP und YFP) verglichen. Somit konnten die von den beiden einzelnen Fluorochromen des CFP-YFP-Tandemproteins stammenden Fluoreszenzintensitäten bestimmt und Bilder der aktuellen Signale der einzelnen Fluorochrome angefertigt werden. Mit diesen Daten wurde das Verhältnis zwischen den CFP- und YFP-Fluoreszenzen bestimmt und mit Hilfe einer zuvor angefertigten Tabelle in  $pH_i$ -Werte umgerechnet (siehe Ergebnisse 4.1.3.).

### ***b) Subzelluläre Lokalisation von TRPV-Kanälen***

Für die Darstellung der subzellulären Lokalisation CFP- oder YFP-fusionierter TRPV-Kanaluntereinheiten wurden HEK293-Zellen wie unter 3.3.2.1 angegeben transfiziert. Für die YFP-markierten TRPV-Kanaluntereinheiten wurde ein 488 nm Hauptfarbteiler und ein 505 nm-Langpassfilter verwendet. YFP wurde mit der 488 nm oder 514 nm Linie des Argon-Lasers angeregt. Die mit CFP fusionierten TRPV-Kanäle wurden über einen 458 nm Hauptfarbteiler mit der 458 nm Linie des Argon-Lasers angeregt, und das emittierte Licht nach einem 460-500 nm-Bandpassfilter aufgezeichnet. Die Einstellungen der Pinholes entsprachen einer optischen Schichtdicke von ca. 0,6-0,9 µm. Als Maß für die Koloalisation unterschiedlich markierter TRPV-Kanaluntereinheiten wurde der Korrelationskoeffizient  $r^2$  bei jedem Expressionsexperiment bestimmt (siehe Abb. M2). Hierfür wurden als erstes mit Hilfe der LSM 510-Software (Carl Zeiss, Version 3.2) die CFP- und YFP-Fluoreszenzintensitäten für jeden Pixel im CFP- und YFP-Kanal bestimmt und in einem Histogramm gegeneinander aufgetragen. Mit diesen Daten wurde daraufhin der Pearson-Korrelationskoeffizient  $r$  berechnet:

$$r = \frac{\sum (K1_i - K1_{\text{Mittelwert}}) \times (K2_i - K2_{\text{Mittelwert}})}{\sqrt{\sum (K1_i - K1_{\text{Mittelwert}})^2 \times \sum (K2_i - K2_{\text{Mittelwert}})^2}}$$

wobei K1 und K2 für die Fluoreszenzintensitäten bei jedem einzelnen Pixel aus dem Kanal1 (YFP-Kanal) und Kanal2 (CFP-Kanal) steht. Der Korrelationskoeffizient  $r^2$  ist das Quadrat des Pearson- Korrelationskoeffizienten.



**Abbildung M2: Bestimmung des Korrelationskoeffizienten  $r^2$  als Maß für die Kolo­kalisierung ko­expressierter TRPV-Kanal­untereinheiten**

Die Kanal­untereinheiten TRPV2-YFP und TRPV3-CFP (A) bzw. TRPV3-YFP und TRPV6-CFP (B) wurden in HEK293-Zellen ko­expressiert. (A und B) Obere Abbildungen: Subzelluläre Lokalisation der ko­expressierten CFP- bzw. YFP-markierten TRPV-Kanal­untereinheiten mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie. Untere Abbildungen: Analyse der konfokalen Bilder bezüglich der CFP- und YFP-Fluoreszenzintensitäten. Linke untere Abbildungen: Darstellung der Pixel-Intensitäten des CFP-Kanals über denen des YFP-Kanals in einem Histogramm. Rechte untere Abbildungen: Hier sind die Pixel im CFP- bzw. YFP-Kanal gezeigt, die im Histogramm in den markierten Flächen zusammengefasst wurden.

### **3.6. Koimmunpräzipitation und Immunoblot-Analyse**

Für den immunologischen Nachweis von Interaktionen zwischen TRPV-Kanaluntereinheiten wurden Membranen transient transfizierter Zellen verwendet (siehe 3.3.2.1.).

#### ***a) Membranpräparation und Immunpräzipitation***

Die Zellen wurden mit 5 ml PBS (siehe 3.1.7.5.) gewaschen und dann in 2 ml PBS pro Schale mechanisch abgelöst und für 10 min bei 100 x g und 4°C sedimentiert. Das Zellsediment wurde in insgesamt 2 ml eiskaltem hypotonem Membranpuffer (siehe 3.1.7.5.) resuspendiert. Danach erfolgte auf Eis der mechanische Aufschluss durch eine dünne Kanüle (26 G). Die Membranen wurden bei 12.000 x g für 15 min (4°C) abzentrifugiert. Das Membranpellet wurde in 600 µl eiskaltem Solubilisierungspuffer (siehe 3.1.7.5.) aufgenommen und während einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis im Abstand von 10 min mit einer dünnen Kanüle (26 G) homogenisiert. Partikuläre Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 12.000 x g (4°C, 20 min) entfernt. 100 µl des Überstandes wurden bei -20°C bis zu dem Gellauf eingefroren. Die restlichen 500 µl wurden sofort für 5 h (4°C) mit 4 µg monoklonalem anti-FLAG-M2 Antikörper und anschließend über Nacht (4°C) mit zusätzlich 11 mg/ml Protein A-Sepharose inkubiert. Die Immunpräzipitate wurden dann dreimal mit 1 ml Solubilisierungspuffer gewaschen (12.000 x g, 7 min, 4°C).

#### ***b) SDS-Page und Elektroblob***

Die Auftrennung der Membranproteine erfolgte über ein 8 %-iges SDS-Polyacrylamidgel. Die eingefrorenen 100 µl Membranlysate wurden mit 50 µl 3-fach SDS-Probenpuffer (siehe 3.1.7.5.) und die Sepharose-Pellets mit 100 µl 1-fach SDS-Probenpuffer versetzt. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 65°C vor dem Gelauftrag denaturiert und kurz vor dem Auftragen anzentrifugiert. Der Gellauf wurde kurz nach Herauslaufen der vorgefärbten 36,6 kDa-Proteinmarkerbande gestoppt. Die aufgetrennten Proteine wurden durch Elektroblob (3 h mit 250 mA) auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen.

#### ***c) Immundetektion:***

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Blotmembran für 1 h bei 22°C mit 5 % Trockenmilch in TBS-T (siehe 3.1.7.5.) inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für je 5 min in TBS-T gewaschen und über Nacht bei 4°C mit dem ersten Antikörper

(anti-Flag-M2, 5 µg/ml oder anti-GFP, 1 µg/ml; in TBS-T mit 5 % Trockenmilch) inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen für je 5 min in TBS-T von der Membran entfernt. Danach folgte die Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten zweiten Antikörper (anti-Maus-IgG, 1:5000 oder anti-Kaninchen-IgG, 1:2.000) in TBS-T mit 5 % Trockenmilch für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Membranen wurden vor der Detektion der Peroxidase-Aktivität mit einem Chemilumineszenz-Reagenz dreimal für je 5 min in TBS-T und zuletzt einmal für 5 min in TBS gewaschen.

### **3.7. Elektrophysiologie**

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten elektrophysiologischen Messungen entstanden in Kooperation mit der elektrophysiologischen Abteilung des Hauses und wurden zum größten Teil von PD Dr. Tim Plant vorgenommen.

Der Protonenstrom durch TRPV1 in transient transfizierten HEK293-Zellen (siehe 3.3.2.1.) wurde mit Hilfe der „Patch-clamp“-Technik elektrophysiologisch charakterisiert. Alle Untersuchungen in der „whole-cell“- und „cell-attached“-Konfiguration wurden mit einem EPC7 Verstärker (HEKA, Lambrecht) durchgeführt. Die Messsignale wurden nach 1 kHz Tiefpassfilterung mit einem 8-poligen Bessel-Filter (LPF-8, Warner Instrument Corp, Hamden, CT) mit einer Abtastrate von 3 kHz digitalisiert (ITC-16, Instrutech Corp., Elmont NY, USA) und mit einer Software (Heka Pulse 7, Lambrecht) dargestellt und ausgewertet. Die Mess- und Referenzelektroden bestanden aus chloriertem Silberdraht. Die Messpipetten wurden aus Borsilikatglas in zwei Schritten mit einem Pipettenzieher (Fa. Hans Ochotzki, Homburg) gefertigt, so dass diese mit den benutzten Standardlösungen (siehe 3.1.7.4.) einen Pipettenwiderstand von 3-6 MΩ besaßen. Die Glasplättchen mit den adhärenen Zellen wurden in die Messkammer eines invertierten Mikroskops (Axiovert 10, Carl Zeiss) eingespannt und mit austauschbaren Badlösungen superfundiert. Das Klemmpotential wurde auf -60 mV eingestellt und Spannungsrampen von -80 mV bis +80 mV in 5 s-Intervallen abgeleitet. Die Zellkapazitäten betragen  $10 \pm 2$  pF.