

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Charakterisierung und Kalibration genetisch kodierter pH-Sensorproteine

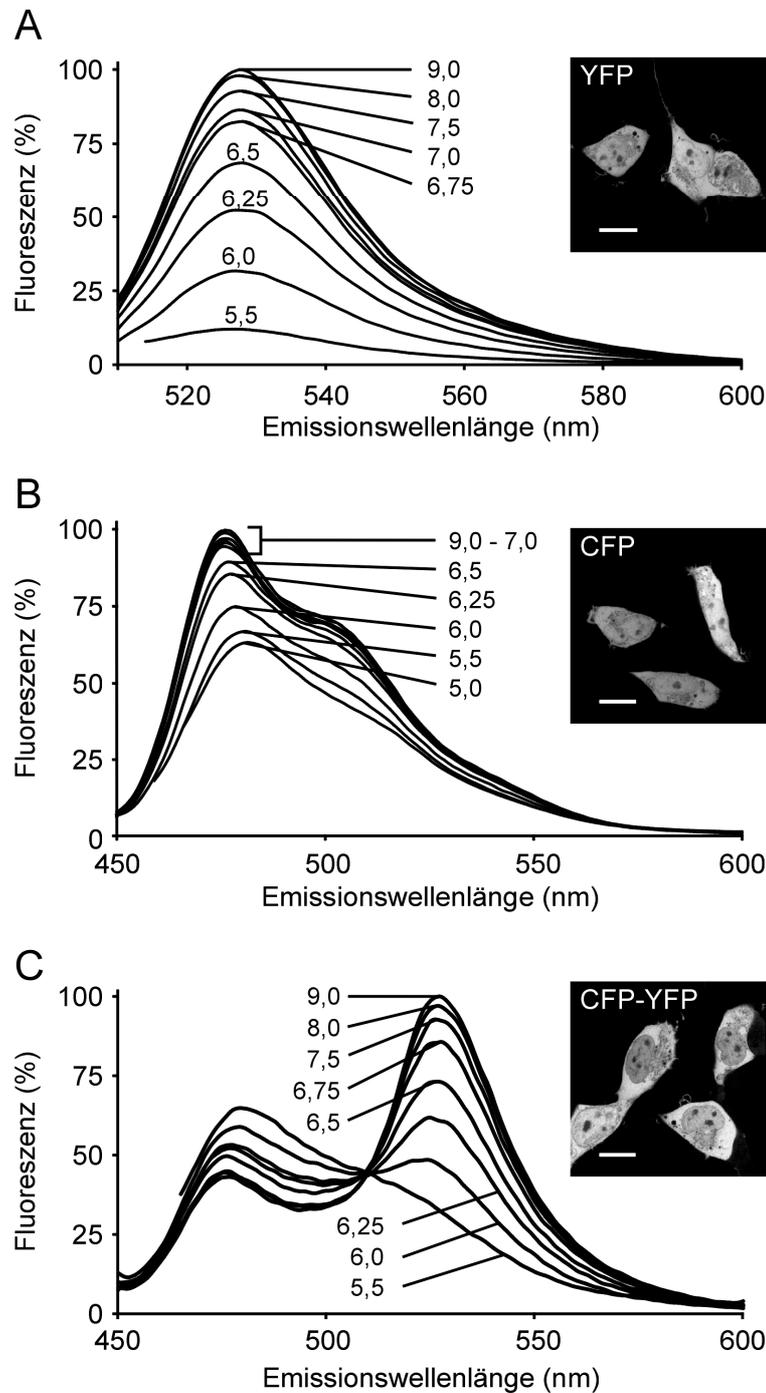
Um die Identifikation von transfizierten Zellen mit einem pH-Detektorsystem verbinden zu können, nutzten wir die unterschiedliche pH-Sensitivität der cyan (CFP) bzw. gelb fluoreszierenden Proteine (YFP oder Citrine) und konstruierten Expressionsplasmide, die intramolekular verbundene CFP-YFP- oder CFP-Citrine-Tandemproteine kodieren. Der intrazelluläre pH konnte nun über die Bestimmung des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers (FRET) zwischen den kovalent verbundenen Fluorochromen gemessen und kalibriert werden.

#### 4.1.1. Subzelluläre Lokalisation der pH Sensorproteine

Das zelluläre Verteilungsmuster der pH-Sensoren wurde einen Tag nach transients Transfektion in HEK293-Zellen mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop aufgezeichnet. Sowohl das CFP-YFP- als auch das CFP-Citrine-Tandemprotein lagen homogen im Cytosol und auch im Zellkern vor (Abb. 1C). Das Verteilungsmuster der Tandemproteine entsprach somit weitgehend dem der einzeln exprimierten Fluorochrome CFP und YFP (Abb. 1A und B).

#### 4.1.2. Spektren und Titration der extrahierten pH-Sensorproteine

Zur weiteren Charakterisierung der pH-Sensoren wurden CFP, YFP und das CFP-YFP-Tandemprotein aus stabil transfizierten Zelllinien extrahiert und ihre Emissionsspektren mit Hilfe eines Fluoreszenzspektrophotometers aufgezeichnet. Zunächst erfolgte die Titration der einzelnen Fluorochrome (CFP und YFP) in einem Universalpuffer mit niedriger Cl<sup>-</sup> Konzentration (25 mM 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 und 10 mM β-Mercaptoethanol). Das Emissionsspektrum von YFP wurde bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm aufgezeichnet und wies ein Maximum bei 535 nm auf (Abb. 1A). Bei steigenden Protonenkonzentrationen konnte bei pH 5,5 fast keine Lichtemission mehr detektiert werden. Die Titration des YFP-Fluorochroms ergab einen apparenten pK<sub>a</sub> von 6,22. Das CFP-Fluorochrom wurde bei 435 nm angeregt und wies ein Maximum bei 476 nm auf (Abb. 1B). Im Gegensatz zu der drastischen Fluoreszenzabnahme des YFP bei sinkendem pH-Wert fiel die CFP-Emission bei einem pH-Wert von 5,0 nur um 40 % seiner maximalen Inten-



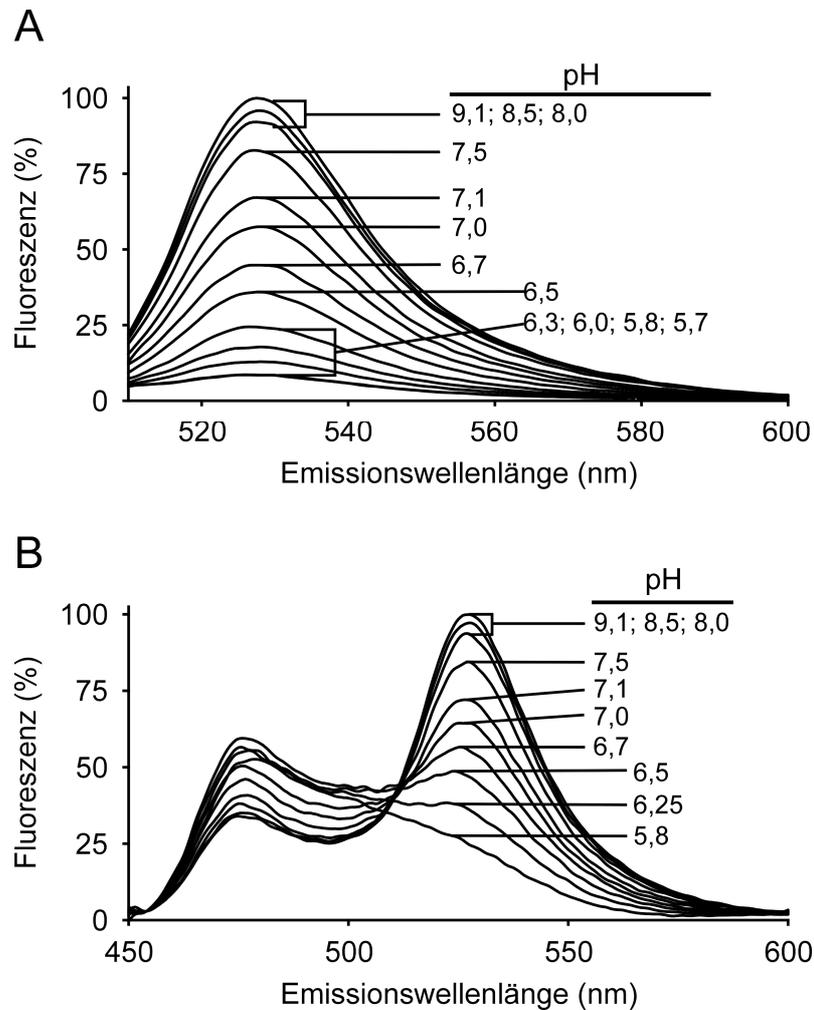
**Abbildung 1: *In vitro*-Titration der Fluorochrome in CFP, YFP und im CFP-YFP Tandemprotein bei niedrigen  $\text{Cl}^-$ -Konzentrationen**

Die Proteine wurden aus stabil transfizierten HEK293-Zellen extrahiert und in Universalpuffer mit niedriger  $\text{Cl}^-$ -Konzentration (25 mM KCl) verdünnt. Der pH wurde jeweils auf die in der Abbildung angegebenen Werte eingestellt. Dargestellt sind die Emissionsspektren von YFP (**A**), CFP (**B**) und vom CFP-YFP-Tandemprotein (**C**) nach Normierung auf die jeweils maximale Fluoreszenzintensität bei pH 9,0. YFP wurde bei 490 nm, CFP und das CFP-YFP-Tandemprotein bei 435 nm angeregt. Es ergaben sich apparente  $\text{pK}_a$ -Werte der Fluorochrome von 6,22 für YFP und 6,15 für CFP. Die Lokalisation der Fluoreszenzproteine in lebenden HEK293-Zellen wurde mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie dargestellt. Die konfokalen Bilder zeigen repräsentative Expressionen der Fluoreszenzproteine in HEK293-Zellen. Die Länge der weißen Balken entspricht 10  $\mu\text{M}$ .

sität bei pH 9 ab. Für die partielle Abschwächung der CFP-Fluoreszenzintensität konnte ein apparenter  $pK_a$  von 6,15 ermittelt werden. Wie für intramolekularen FRET erwartet, zeigte das extrahierte CFP-YFP-Tandemprotein nach Anregung bei 435 nm zwei Emissionspeaks mit Maxima bei 476 nm und 535 nm, entsprechend der Emission des FRET-Donors (CFP) und des FRET-Akzeptors (YFP) (Abb. 1C). Bei sinkendem pH-Wert des Messpuffers (9,0-5,5) kam es zu einer Abnahme der Akzeptor-Fluoreszenz mit gleichzeitigem Anstieg der Donor-Emission. Dies ist ein Beweis dafür, dass sich die intramolekular verbundenen Fluorochrome unabhängig voneinander falten, und dass bei entsprechender Anregung der pH-Sensoren FRET zwischen den Fluorochromen hervorgerufen wird. Somit stellen die fluoreszierenden Tandemproteine genetisch kodierte pH-Sensoren dar, die auf der Grundlage eines spektralen Shifts und/oder der intramolekularen FRET-Effizienzen kalibriert werden können. Für das intramolekular mit CFP gekoppelte YFP konnte nach Anregung des pH-Sensors bei 490 nm in Universalpuffer mit niedriger  $Cl^-$ -Konzentration der  $pK_a$  von 6,2 bestätigt werden. Bei höheren  $Cl^-$ -Konzentrationen (150 mM) verschob sich aufgrund der Halogenid-Sensitivität des YFP (Griesbeck et al., 2001) der  $pK_a$  von YFP auf 6,85 (Abb. 2). Um zusätzlich einen  $Cl^-$ -unabhängigen pH-Sensor zu erhalten, generierten wir ein Tandemprotein bestehend aus den Fluorochromen CFP und Citrine. Citrine ist eine Mutante des YFP (EYFP V68L/Q69M), die eine vernachlässigbare  $Cl^-$ -Sensitivität und einen im Vergleich mit YFP niedrigeren  $pK_a$  von 5,8 besitzt. Die spektralen Eigenschaften von Citrine entsprechen denen des YFP.

#### ***4.1.3. Kalibration der pH-Sensorproteine in lebenden HEK293-Zellen***

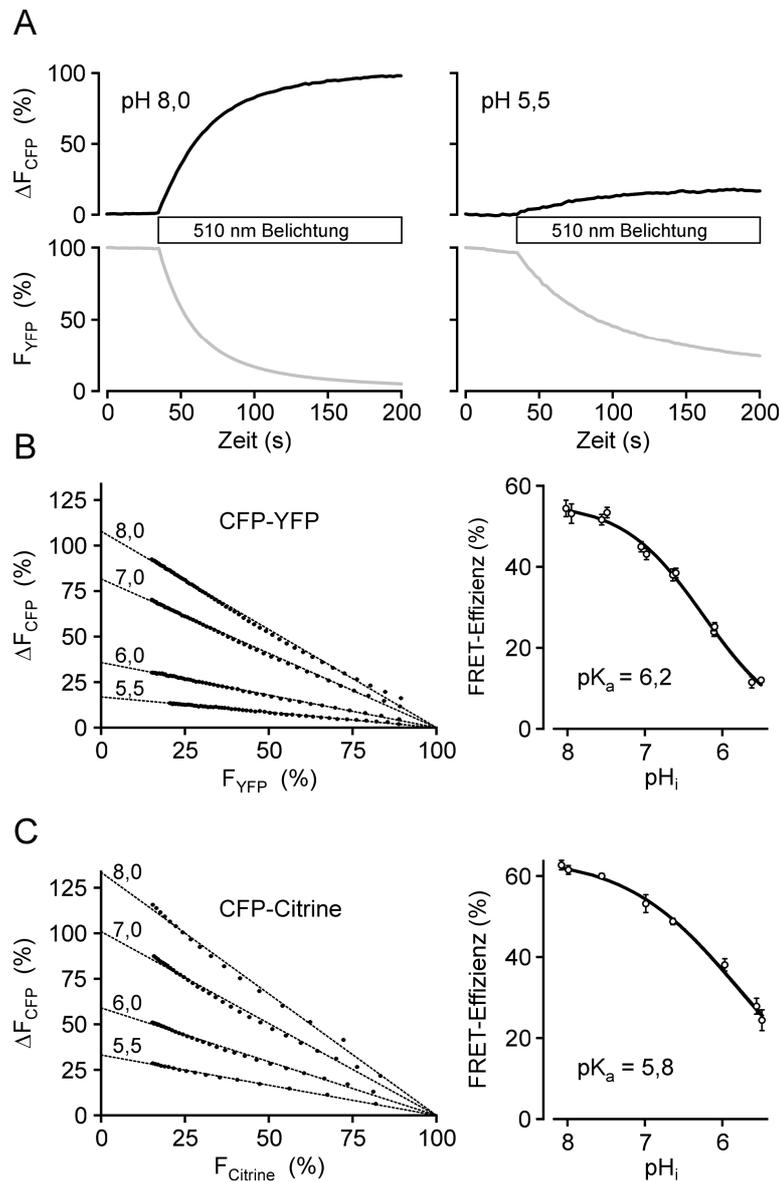
Um den intrazellulären pH auf der Grundlage des pH-abhängigen FRET zwischen den beiden intramolekular gekoppelten Fluorochromen der CFP-YFP- bzw. CFP-Citrine-Tandemproteine bestimmen zu können, mussten die pH-Sensoren zunächst in HEK293-Zellen kalibriert werden. Hierfür wurden die CFP-YFP- bzw. CFP-Citrine-Tandemproteine transient in HEK293-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden mit isotonen,  $K^+$ -basierten HBS Puffern unterschiedlicher pH-Werte umspült (128 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM  $MgCl_2$ , 1 mM  $CaCl_2$ , 5,5 mM Glucose, 0,2 % BSA, 10 mM HEPES, pH 5,5-8,0) und der intrazelluläre pH mit Hilfe des  $Na^+/H^+$ -Austauschers Monensin und dem  $K^+/H^+$ -Ionophor Nigericin mit dem extrazellulären pH ( $pH_{ext}$ ) äquilibriert. Zur Ermittlung der FRET-Effizienzen in einzelnen lebenden HEK293-Zellen wurde



**Abbildung 2: Halogenid-Sensitivität des YFP im CFP-YFP Tandemprotein**

Das YFP-Emissionsspektrum (**A**) des extrahierten CFP-YFP-Tandemproteins wurde bei Anregung des pH-Sensors bei 490 nm gemessen. (**B**) Aufzeichnung des Emissionsspektrum vom CFP-YFP-Tandemprotein bei einer Anregungswellenlänge von 435 nm. Das Protein wurde für die Messungen in Universalpuffer mit 150 mM Cl<sup>-</sup> und unterschiedlichen pH-Werten (siehe Abbildung) verdünnt. Es wurde für das YFP im CFP-YFP-Tandemprotein ein apparenter pK<sub>a</sub>-Wert von 6,85 ermittelt.

die Erholung der Donorfluorochrom-Emission während des Ausbleichens des Akzeptors bestimmt. Das Ausbleichen des Akzeptors im CFP-YFP-Tandemprotein bei einem pH von 8,0 führte zu einer Verdopplung der CFP-Fluoreszenzintensität (Abb. 3A). Unter aziden Bedingungen (pH 5,5) war die Erholung der CFP-Fluoreszenz erheblich reduziert (Abb. 3A). Das fraktionelle Bleichen des Akzeptors und die gleichzeitig stattfindende Erholung der Donoremission unterlagen einer linearen Abhängigkeit, die nach Regressionsanalyse die entsprechenden FRET-Effizienzen ergab (Abb. 3B und C). Die maximalen FRET-Effizienzen der CFP-YFP- und CFP-Citrine-Tandemproteine bei pH 8,0 betragen 56,6 % bzw. 63,1 %. Die FRET-basierte Kalibration ergab pK<sub>a</sub>-Werte und Hill-Koeffizienten *n* (in Klammern angegeben)



**Abbildung 3: FRET-basierte *in vivo*-Kalibration der CFP-YFP- und CFP-Citrine-Tandemproteine**

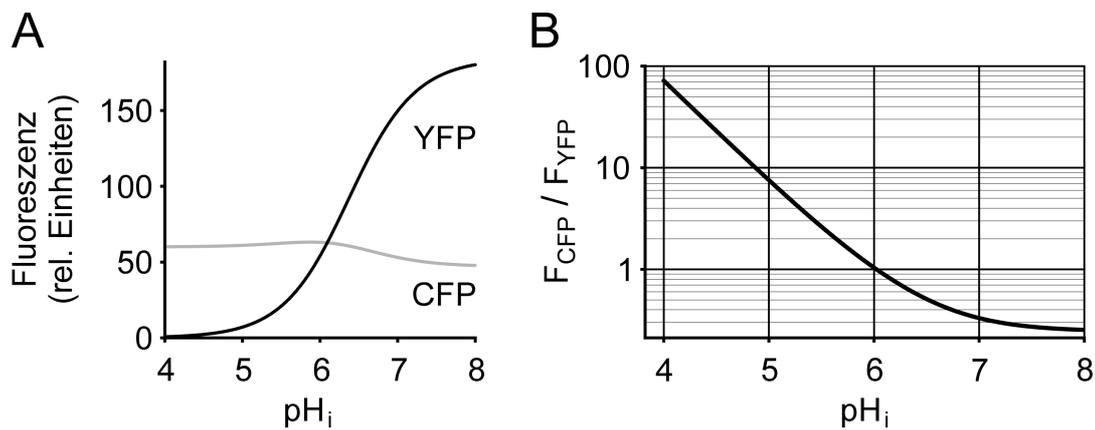
HEK293-Zellen wurden transient mit den Expressionsplasmiden der entsprechenden pH-Sensoren transfiziert und in HEPES- bzw. MES-gepufferter isotoner KCl-Lösung mittels der Ionophore Nigericin und Monensin (jeweils 10  $\mu\text{M}$ ) auf die unterschiedlichen extrazellulären pH-Werte äquilibriert. **(A)** Die FRET-Signale des CFP-YFP-Tandemproteins wurden bei pH 8,0 und 5,5 durch Aufzeichnung der CFP-Emissionänderung ( $\Delta F_{\text{CFP}}$ , schwarze Linie) während des Ausbleichens des Akzeptors ( $F_{\text{YFP}}$ , graue Linie) in intakten Zellen bestimmt. Die CFP- und YFP-Fluoreszenzen einzelner Zellen jeweils eines repräsentativen Experiments wurden gemittelt. Der Mittelwerte der hier zeitlich dargestellten CFP- und YFP-Fluoreszenzen sind auf die Intensitäten zu Beginn der Messung normiert worden. Zum Ausbleichen der YFP-Komponente wurde die Probe bei 510 nm ( $2\text{-}3\text{ W/cm}^2$ ) zwischen den einzelnen Auslesepulsen belichtet. Der Bleichvorgang ist mit einem Balken gekennzeichnet. **(B und C)** Die Korrelationen zwischen dem fraktionellen Ausbleichen des Akzeptors ( $F_{\text{YFP}}$  bzw.  $F_{\text{Citrine}}$ ) und der damit verbundenen Erholung der Donoremission ( $\Delta F_{\text{CFP}}$ ) bei unterschiedlichen Protonenkonzentrationen (pH 5,5, 6,0, 7,0 und 8,0) sind in den linken Abbildungsteilen dargestellt. Auf der rechten Seite sind die mittleren FRET-Effizienzen  $\pm$  SEM ( $n = 3\text{-}10$  unabhängige Experimente) als Funktion des intrazellulären pH ( $\text{pH}_i$ ) abgebildet. Die apparenten  $\text{pK}_a$ -Werte des jeweiligen pH-Sensors sind angegeben.

von  $6,2 \pm 0,02$  (-0.83) für das CFP-YFP- und  $5,8 \pm 0,03$  (-0,59) für das CFP-Citrine-Tandemprotein (Abb. 3B und C). Die Höhe der FRET-Effizienz korreliert mit der Fähigkeit des Akzeptors, die Donoremission zu absorbieren. Daher kann der intrazelluläre pH durch folgende Formel dargestellt werden:

$$\text{pH}_i = \text{pK}_a + \frac{1}{n} \log \left( \frac{E_{\text{max}}}{E} - 1 \right)$$

Hierbei ist  $K_a$  die Säurekonstante des Akzeptorfluorochroms,  $E_{\text{max}}$  die maximale FRET-Effizienz bei deprotoniertem Akzeptor,  $n$  der Hill-Koeffizient der Akzeptorprotonierung und  $E$  die aktuell gemessene FRET-Effizienz. Um die FRET-Effizienzen und somit die pH-Werte innerhalb der Zelle zeitaufgelöst bestimmen zu können, nutzten wir eine spektroskopische Methode, die es uns ermöglichte, den auf das YFP übertragenen Anteil der CFP-Emission zu ermitteln und hierüber die FRET-Effizienz zu bestimmen (zeitaufgelöste FRET-Messung, siehe 3.4.3.b).

Die pH-abhängigen Verschiebungen des CFP-YFP-Emissionsspektrums konnten auch mittels eines Laser-Scanning-Mikroskops (Carl Zeiss, LSM-META) detektiert und ausgewertet werden. Hierfür wurden zuerst die Emissionsspektren der einzelnen Fluorochrome (CFP oder YFP) nach Äquilibrierung des intrazellulären pH auf 8,0 und Anregung bei 458 nm aufgezeichnet und in einer Datenbank hinterlegt. Das Emissionsspektrum des CFP-YFP-Tandemproteins wurde bei jeder Messung mit Hilfe der gespeicherten Reinform-Spektren in die vom CFP und YFP stammenden Signale spektral zerlegt („linear unmix“, LSM Software Rel. 3.2). Aus diesen ermittelten CFP- und YFP-Intensitäten wurde ein Quotient ( $F_{\text{CFP}}/F_{\text{YFP}}$ ) berechnet und durch Vergleich mit den Werten einer Kalibrationskurve (Abb. 4B) einem pH-Wert zugewiesen. Die Berechnungsgrundlage für die Erstellung der Kalibrationskurve waren berechnete Verläufe der pH-abhängigen CFP- und YFP-Emission des pH-Sensors auf der Grundlage der zuvor experimentell ermittelten  $\text{pK}_a$ -Werte, der maximalen FRET-Effizienz bei alkalischem pH und unter Berücksichtigung einer verbleibenden Fluoreszenzemission von 60 % des protonierten CFP (Abb. 4A).



**Abbildung 4: Konfokale Kalibration des CFP-YFP-Tandemproteins**

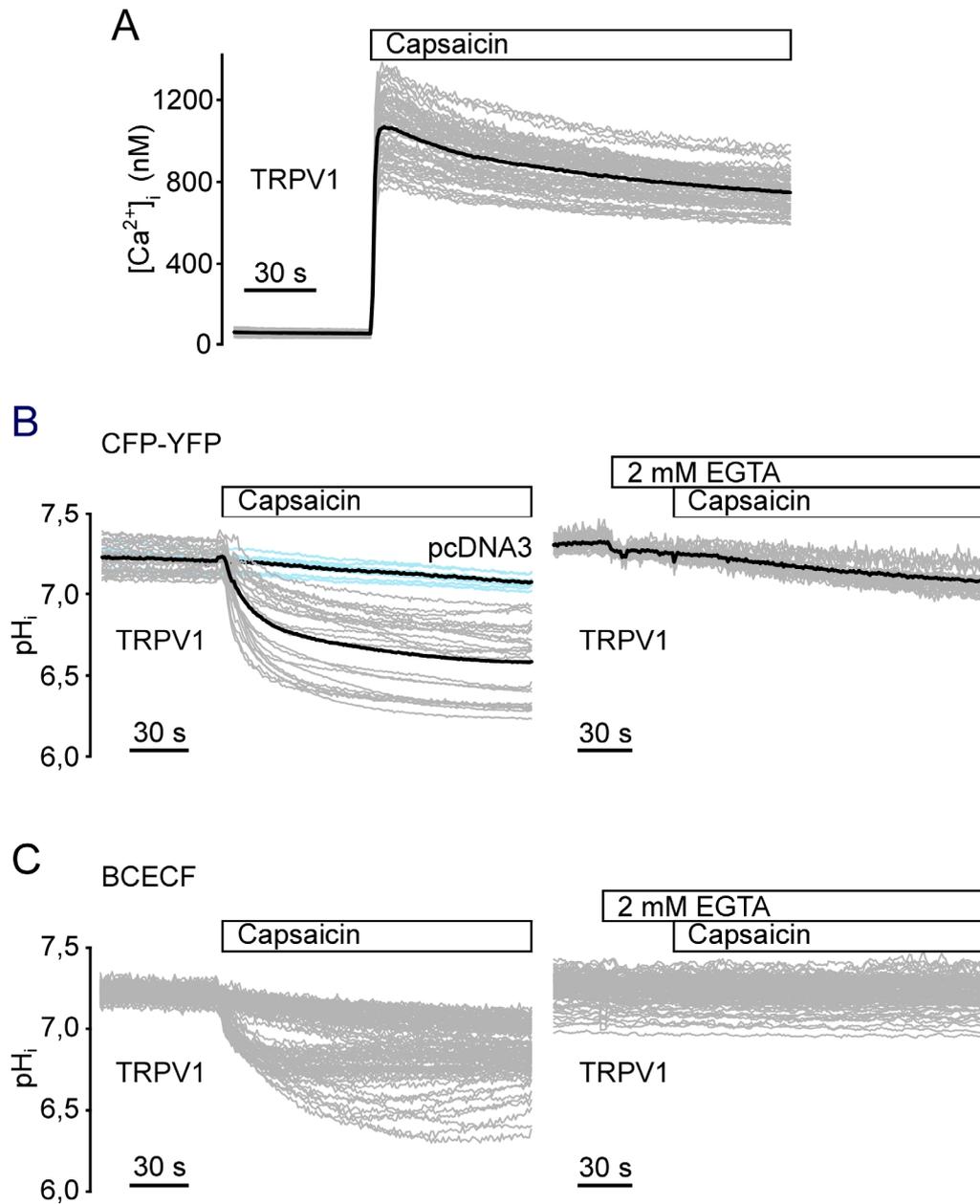
(A) Berechnete Verläufe der pH-abhängigen CFP- und YFP-Fluoreszenzemission des CFP-YFP-Tandemproteins mit den zuvor experimentell ermittelten  $pK_a$ -Werten (6,15 für CFP und 6,22 für YFP), der maximalen FRET-Effizienz (56,6 %) und einem titrierbaren Anteil der CFP-Fluoreszenzintensität von 40 %. (B) Kalibrationskurve für die konfokale Messung. Dargestellt ist der Quotient der CFP- und YFP-Fluoreszenzintensitäten des CFP-YFP-Tandemproteins über den intrazellulären pH.

## 4.2. TRPV1-induzierte intrazelluläre Ansäuerung

Die Fragestellung, in welchem Ausmaß und über welche Mechanismen die TRPV1-Aktivierung den intrazellulären pH (pH<sub>i</sub>) beeinflusst, wurde an TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen und in frisch präparierten sensorischen Neuronen aus Hinterwurzelganglien („dorsal root ganglia“, DRG) der Ratte untersucht. Für die intrazellulären pH-Bestimmungen wurden der fluoreszierende pH-Indikator 2',7'-Bis-(2-carboxyethyl)-5-(und-6)-carboxyfluorescein (BCECF) und die genetisch kodierten pH-Sensoren, das CFP-YFP- und das CFP-Citrine-Tandemprotein (siehe 4.1.), eingesetzt.

### 4.2.1. $Ca^{2+}$ -vermittelte intrazelluläre Ansäuerung in TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen

Zunächst wurden die funktionellen Eigenschaften von TRPV1 durch Fluoreszenz-Imaging an Fura 2-geladenen HEK293-Zellen untersucht, die transient mit TRPV1 und YFP kotransfiziert wurden. Das YFP diente zur Identifizierung TRPV1-exprimierender Zellen. Die Stimulation von TRPV1 mit Capsaicin (10  $\mu$ M) bei einem externen pH von 7,4 in  $Ca^{2+}$ -haltigem Puffer führte zu einem raschen, lang anhaltenden Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) von 30-70 nM auf 750-1400 nM (Abb. 5A). Bei Koexpression von TRPV1 und dem CFP-YFP-Tandemprotein konnte in fluoreszierenden Zellen eine Capsaicin-induzierte Abnahme des FRET

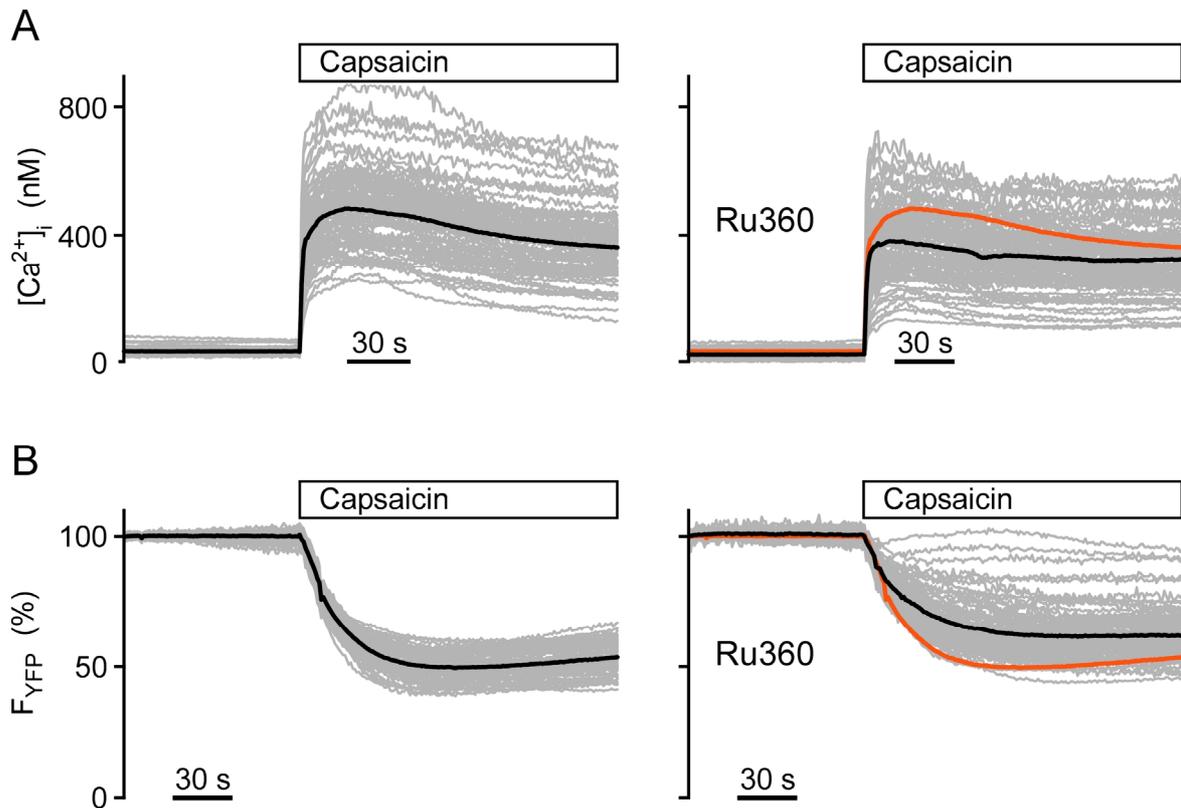


**Abbildung 5: TRPV1-vermittelte  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale und intrazelluläre Ansäuerung in HEK293-Zellen bei neutralem extrazellulärem pH**

(A) Capsaicin-induzierte  $Ca^{2+}$ -Signale in TRPV1-exprimierenden, Fura 2-geladenen HEK293-Zellen. Die Messung wurde in  $Ca^{2+}$ -haltiger (1 mM) Badlösung bei pH 7,4 durchgeführt. Die Zugabe von Capsaicin (10  $\mu$ M) ist durch einen Balken gekennzeichnet. Dargestellt ist der Zeitverlauf der  $[Ca^{2+}]_i$  in einzelnen Zellen (graue Linien) sowie deren Mittelwert (schwarze Linie). (B und C) Veränderungen des  $pH_i$  nach TRPV1-Stimulation. HEK293-Zellen wurden entweder transient mit TRPV1 bzw. pcDNA3 und CFP-YFP kotransfiziert (B) oder nach TRPV1-Transfektion mit BCECF beladen (C). Die Messung des  $pH_i$  erfolgte mittels Fluoreszenzspektroskopie (siehe Material und Methoden). Die Zellen wurden entweder in  $Ca^{2+}$ -haltigem Puffer (HBS, 1 mM  $Ca^{2+}$ , pH 7,4; linke Abbildungen), oder unter  $Ca^{2+}$ -freien extrazellulären Bedingungen (HBS, 2 mM EGTA, pH 7,4; rechte Abbildungen) mit 10  $\mu$ M Capsaicin stimuliert. Die Abbildungsteile (B und C) zeigen die  $pH_i$ -Änderungen einzelner Zellen (graue bzw. blaue Linien) sowie den daraus berechneten Mittelwert (schwarze Linie).

von  $49,5 \% \pm 0,3 \%$  auf  $40,7 \% \pm 1,0 \%$  beobachtet werden, was einer Ansäuerung des Cytosols von  $\text{pH } 7,22 \pm 0,02$  in ruhenden Zellen auf  $\text{pH } 6,69 \pm 0,05$  60 s nach Agonist-Applikation entspricht (Abb. 5B). Im Vergleich zu dem raschen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg erschien die intrazelluläre Azidifizierungskinetik etwas verzögert. In Vektor- und CFP-YFP-kotransfizierten Kontrollzellen führte Capsaicin zu keiner Veränderung des cytosolischen pH (Abb. 5B). Die TRPV1-vermittelte intrazelluläre Azidifizierung konnte durch Messungen mit dem pH-Indikator BCECF bestätigt werden. Bei diesem pH-Messverfahren war die Identifizierung von TRPV1-transfizierten Zellen nur indirekt über die unterschiedlichen Antwortmuster der HEK293-Zellen nach Zugabe von Capsaicin möglich. Während bei 40 % der Zellen keine signifikante Änderung des  $\text{pH}_i$  nach TRPV1 Stimulation zu beobachten war, kam es bei den übrigen 60 % der Zellen, was der typischen Transfektionseffizienz entspricht, im Verlauf von 1 min zu einer Abnahme des  $\text{pH}_i$  von  $7,22 \pm 0,05$  auf  $6,73 \pm 0,12$  (Abb. 5C). In untransfizierten BCECF-beladenen Kontrollzellen kam es hingegen nach Zugabe von Capsaicin zu keiner  $\text{pH}_i$ -Änderung (Daten nicht gezeigt).

In  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem extrazellulärem Medium (2 mM EGTA) bei einem pH von 7,4 blieb der intrazelluläre pH-Abfall nach TRPV1-Stimulation aus (Abb. 5B und C), was darauf hinweist, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx-Komponente und nicht der Einstrom von  $\text{Na}^+$  für den cytosolischen Anstieg der Protonenkonzentration verantwortlich ist. Aufgrund des beobachteten starken und lang anhaltenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms nach TRPV1-Stimulation in HEK293-Zellen wäre es möglich, dass es bei der Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  in die Mitochondrien zu einem Abbau des inneren mitochondrialen Membranpotentials kommt. Im Gegenzug würden keine Protonen mehr über die ATP-Synthase in die Mitochondrien geleitet bzw. sogar Protonen aus den Mitochondrien freigesetzt werden. Die mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme erfolgt hauptsächlich über den mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter (MCU), einem potentialgetriebenen Ionentransportsystem. Zur Inhibition des MCU wurden TRPV1-transfizierte HEK293-Zellen vor Beginn der Messung 20 min lang mit  $1 \mu\text{M}$  Ru360, ein über eine Oxidbrücke verbundener dimerer Rutheniumamin-Komplex, vorinkubiert (Abb. 6). Sowohl der MCU als auch TRPV1 werden durch Rutheniumrot (ammoniertes Rutheniumoxychlorid) blockiert (Moore, 1971; Reed und Bygrave, 1974; Caterina et al., 1997). Das Rutheniumrot-Derivat Ru360 ist jedoch mit einer hohen Bindungsaffinität zu Mitochondrien ( $K_D = 340 \text{ pM}$ ) und mit einer  $\text{IC}_{50}$  von  $184 \text{ pM}$  in niedrigen Konzentrationen als spezifisch für die Inhibition der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme beschrieben worden (Matlib et



**Abbildung 6: Effekt von Ru360 auf TRPV1-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{pH}_i$ -Signale**

Dargestellt sind die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (**A**) und die relative, auf den Beginn der Messung normierte YFP-Fluoreszenz (**B**) in TRPV1- und YFP-koexprimierenden HEK293-Zellen. Die Mittelwerte sind als schwarze Linie, die Verläufe der Einzelzellen als graue Linien zu erkennen. Die Aktivierung von TRPV1 mit  $10 \mu\text{M}$  Capsaicin erfolgte in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem neutralem Medium ( $1 \text{ mM}$   $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{pH}$  7,4) ohne Vorbehandlung (linke Abbildungen) oder mit Vorinkubation (20 min) und Anwesenheit von  $1 \mu\text{M}$  Ru360 (rechte Abbildungen). In den rechten Abbildungen ist der Mittelwert der Kontrollmessung ohne Ru360 der linken Abbildungen als rote Linie zum Vergleich hinterlegt.

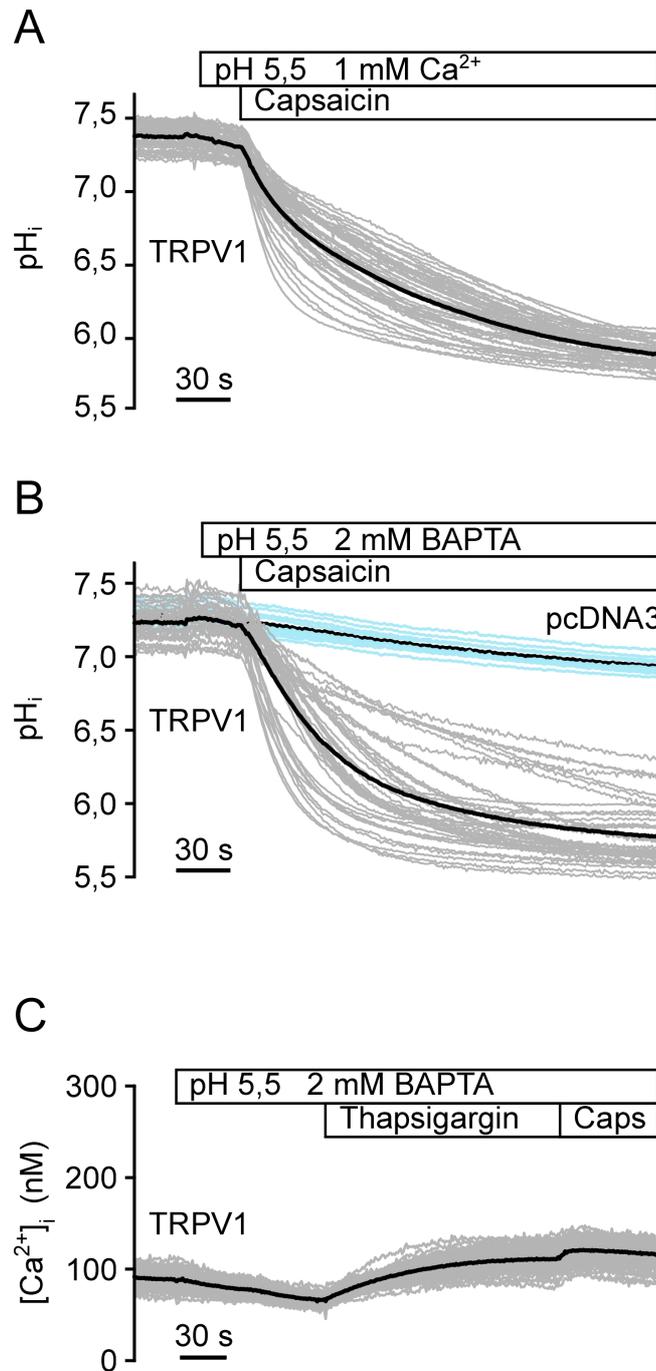
al., 1998). Nach TRPV1-Stimulation fiel jedoch im Vergleich zu Kontrollmessungen ohne Ru360-Inkubation sowohl der  $\text{pH}_i$ -Abfall, quantitativ über die Fluoreszenzabnahme des kotransfizierten YFP betrachtet, als auch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort geringer aus (Abb. 6). Somit schien in unseren Messungen Ru360 bei einer Konzentrationen von  $1 \mu\text{M}$  zu einer Beeinträchtigung der TRPV1-Aktivität zu führen. In TRPV1 und das CFP-YFP-Tandemprotein exprimierenden HEK293-Zellen konnte jedoch die intrazelluläre Ansäuerung durch eine Vorinkubation (1 min vor Zugabe von Capsaicin) mit dem mitochondrialen Entkoppler Carbonyl-Cyanid-m-Chlorophenylhydrazon (CCCP) unterbunden werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Pufferung für die  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte intrazelluläre Ansäuerung nach TRPV1-Stimulation verantwortlich ist.

#### ***4.2.2. $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängiger Mechanismus der intrazellulären Ansäuerung in azidem Extrazellulärmedium***

Die Zugabe von sauren Badlösungen (pH 5,5) führte zunächst nur zu einem geringfügigen Absinken des  $\text{pH}_i$  von 7,34 auf 7,26 innerhalb von 60 s. Eine nachfolgende Zugabe von Capsaicin (10  $\mu\text{M}$ ) hingegen induzierte sofort eine starke und anhaltende intrazelluläre Ansäuerung, wobei der  $\text{pH}_i$  60 s nach Capsaicin-Zugabe auf einen Wert von  $6,48 \pm 0,03$  fiel ( $n = 6$  unabhängige Experimente; Abb. 7A). Dieser Effekt war auch unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen vorhanden (2 mM BAPTA; Abb. 7B). Der cytosolische pH sank dabei um etwa 1,5 pH-Werte ab, entsprechend einem Konzentrationsanstieg der Protonen um das 30-fache ( $n = 5$ ). Parallele  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen in Fura 2-geladenen Zellen zeigten, dass die extrazelluläre BAPTA-Konzentration von 2 mM bei pH 5,5 ausreichend war, um einen TRPV1-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom zu verhindern (Abb. 7C). Im Vergleich zu kürzlich veröffentlichten Arbeiten über eine TRPV1-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisation aus intrazellulären Speichern (Liu et al., 2003) konnte unter den hier gewählten Bedingungen nur eine verzögerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern beobachtet werden (Abb. 8A). In Vektor-transfizierten HEK293-Zellen führte die Zugabe von 2  $\mu\text{M}$  Thapsigagin zu einer mit der Aktivierung von TRPV1 unter aziden  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen vergleichbaren Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Abb. 8B), jedoch kam es hier nicht zu einer Veränderung des  $\text{pH}_i$  (Abb. 8C). Somit existieren mindestens zwei unterschiedliche Mechanismen der TRPV1-induzierten intrazellulären Ansäuerung: Bei neutralem  $\text{pH}_{\text{ext}}$  konnte nur nach Capsaicin-vermitteltem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem extrazellulären Medium eine intrazelluläre Ansäuerung beobachtet werden. Unter sauren extrazellulären Bedingungen erfolgte jedoch die intrazelluläre Akkumulation von Protonen  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig.

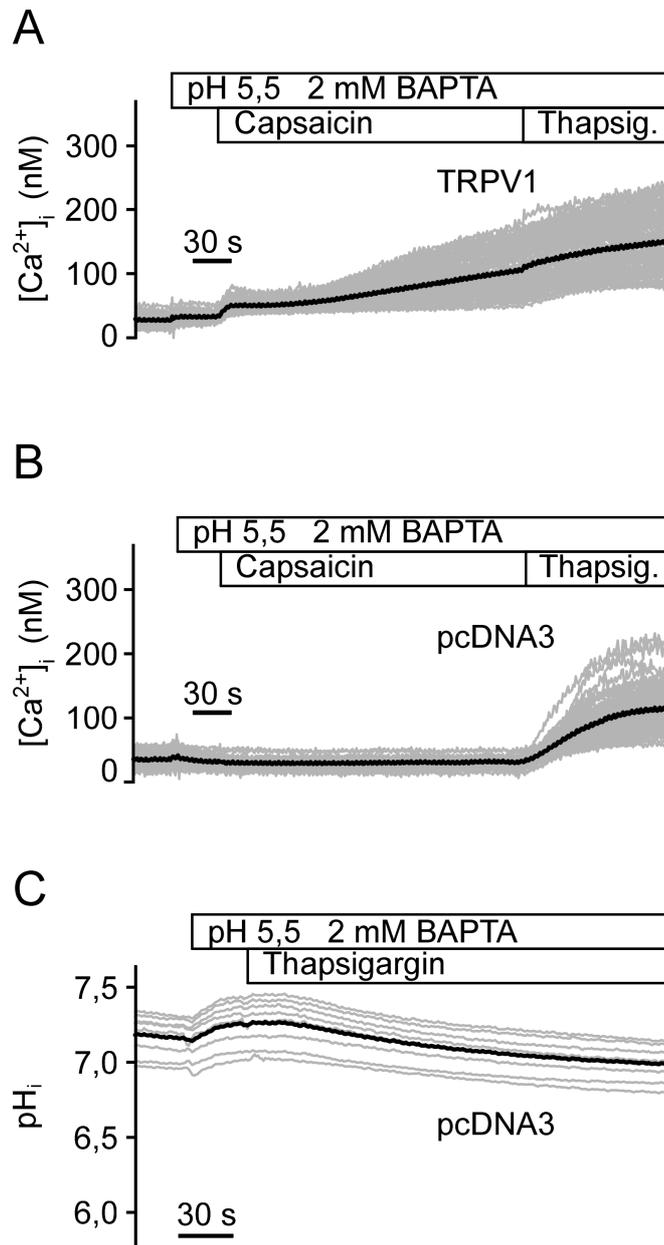
#### ***4.2.3. Capsaicin-induzierter Protonenstrom durch die TRPV1-Pore***

Bei den zuvor gewählten extrazellulären Bedingungen herrschte sowohl für die Permeation von  $\text{Na}^+$  als auch für Protonen eine nach innen gerichtete Antriebskraft. Um TRPV1 auf eine eventuelle direkte Protonenleitfähigkeit zu untersuchen, führten wir die weiteren Messungen in azider isotoner KCl-Lösung (10 mM MES, 140 mM KCl, 2 mM BAPTA; pH 5,5) durch. Unter diesen Messbedingungen sind Protonen und/oder Hydroniumionen ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) die einzigen extrazellulären Kationen, die eine in die Zelle hinein gerichtete Antriebskraft erfahren. Die



**Abbildung 7: Ca<sup>2+</sup>-unabhängige intrazelluläre Ansäuerung nach TRPV1-Stimulation in azidem extrazellulärem Puffer**

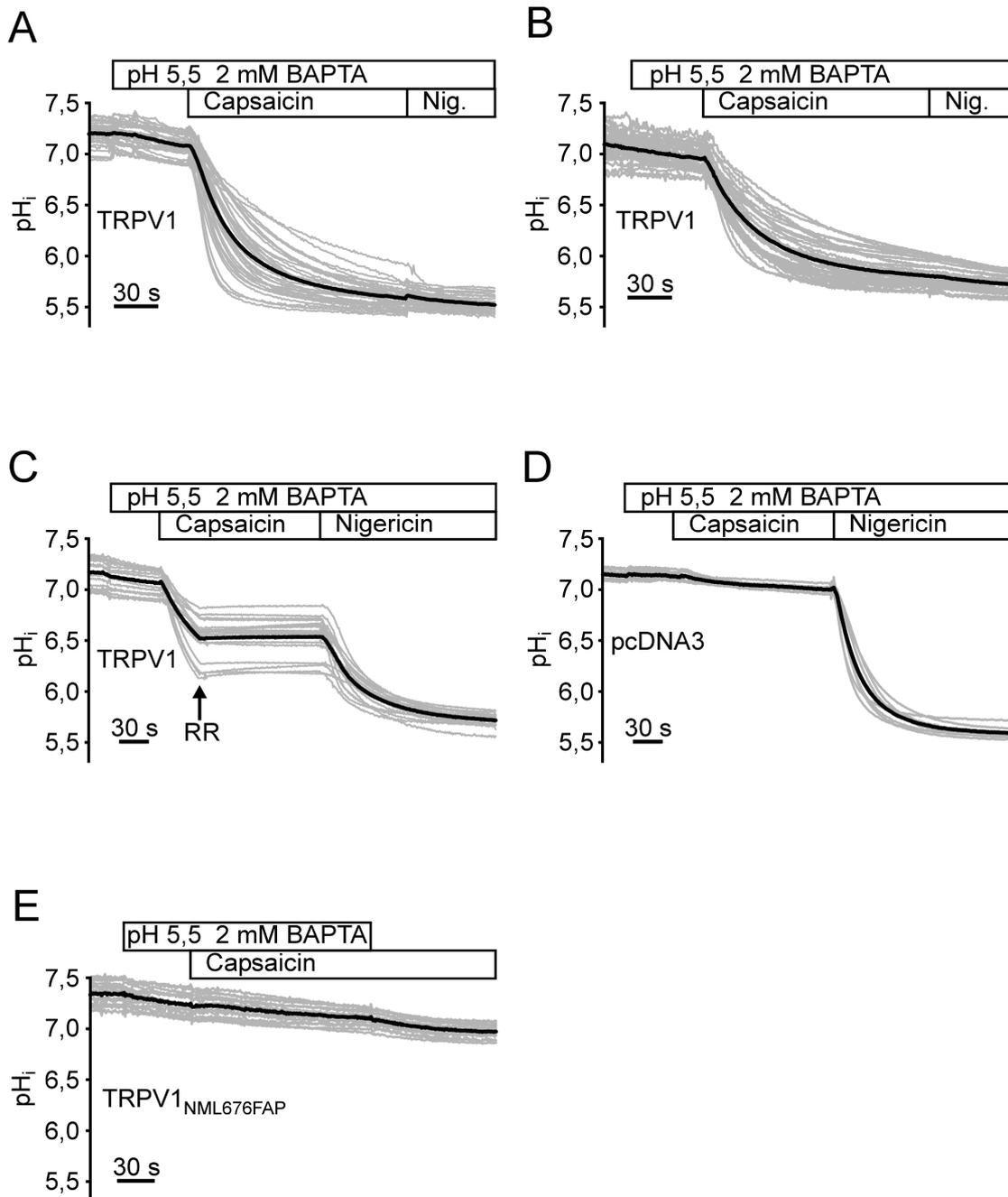
(**A** und **B**) Bestimmung des pH<sub>i</sub> in HEK293-Zellen, die TRPV1 bzw. pcDNA3 und das CFP-YFP-Tandemprotein koexprimieren. Die pH-neutrale Badlösung wurde durch einen aziden Puffer (MBS, pH 5,5) ausgetauscht, der entweder 1 mM Ca<sup>2+</sup> (**A**) oder 2 mM BAPTA (**B**) enthält. TRPV1 wurde mit 10 μM Capsaicin stimuliert. Die Werte einzelner Zellen sind mit grauen bzw. blauen Linien dargestellt, die schwarze Linie bezeichnet den Mittelwert. (**C**) Zur Überprüfung der Ca<sup>2+</sup>-Pufferkapazität des BAPTA (2 mM) im extrazellulären aziden Puffer wurde die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> von TRPV1- und YFP-exprimierenden HEK293-Zellen mittels Fura 2-Messungen bestimmt. Nach dem Auswechseln des extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-haltigen Mediums gegen die Ca<sup>2+</sup>-freie, azide Lösung (MBS, 2 mM BAPTA, pH 5,5) wurde zur Entleerung intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Speicher 2 μM Thapsigargin und dann zur TRPV1-Aktivierung 10 μM Capsaicin appliziert.



**Abbildung 8: TRPV1-vermittelte  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern**

HEK293-Zellen wurden transient entweder mit Expressionsplasmiden für TRPV1 und für das CFP-YFP-Tandemprotein (A) oder mit dem pcDNA3-Vektor und dem Expressionsplasmid für das CFP-YFP-Tandemprotein (B und C) kotransfiziert. Die  $[Ca^{2+}]_i$  (A und B) und der  $pH_i$  (C) wurden wie unter Abbildung 6 beschrieben bestimmt. Der Pufferwechsel sowie die Zugabe von Capsaicin (10  $\mu$ M) und Thapsigargin (2  $\mu$ M) sind durch Balken gekennzeichnet.

Zugabe von Capsaicin induzierte auch hier eine starke Ansäuerung mit schneller Kinetik ( $n = 5$ ; Abb. 9A). Der  $pH_i$  glied sich in wenigen Minuten dem  $pH_{ext}$  an, was die Zugabe von Nigericin am Ende jeder Messung zeigte. Da unter den gewählten extrazellulären Bedingungen (130 mM KCl) auch eine Depolarisation der Zellen hervorgerufen wurde, hätte es auch zu einem  $Cl^-$ -Einstrom über spannungsgesteuerte  $Cl^-$ -Kanäle kommen können. Aufgrund der bestehenden



**Abbildung 9: Direkter Protonen-Influx durch die TRPV1-Pore in azidem extrazellulärem Medium**

Die Messungen der Capsaicin-induzierten  $\text{pH}_i$ -Änderungen wurden an TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen durchgeführt, die entweder mit Expressionsplasmiden für das CFP-YFP-Tandemprotein (**A** und **C**) oder für das  $\text{Cl}^-$ -insensitive CFP-Citrine-Tandemprotein (**B**) und TRPV1 kotransfiziert wurden. Der Wechsel des extrazellulären Mediums zu einer aziden isotonen KCl-Lösung (pH 5,5) ist durch einen Balken gekennzeichnet. (**A** und **B**) Nach dem Pufferwechsel wurde zunächst 10  $\mu\text{M}$  Capsaicin und dann 10  $\mu\text{M}$  Nigericin appliziert. (**C**) Experiment wie unter (**A**) beschrieben, jedoch wurde TRPV1 durch die Zugabe von Rutheniumrot (10  $\mu\text{M}$ ) blockiert. (**D**) Kontrollmessung mit HEK293-Zellen, die mit leerem pcDNA3-Vektor und dem pcDNA3-CFP-YFP-Expressionsplasmid kotransfiziert waren. (**E**) Kontrollmessung mit HEK293-Zellen, die mit dem Expressionsplasmid für die dominant negative TRPV1-Mutante TRPV1<sub>NML676FAP</sub> und dem CFP-YFP-Tandemprotein kotransfiziert waren. Zum Ende der Messung wurde die Badlösung wieder zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen neutralen Puffer (1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , pH 7,4) gewechselt.

Halogenid-Sensitivität des YFP (Griesbeck et al., 2001) könnte dies eine Absenkung des intrazellulären pH vortäuschen. Da die pH-Erniedrigung auch bei Bestimmung über das Halogenid-resistente CFP-Citrine-Tandemprotein vergleichend stark ausfiel, konnten wir jedoch folgern, dass die Signale nicht durch Anstiege der intrazellulären  $\text{Cl}^-$ -Konzentration verursacht wurden, sondern tatsächlich eine Erhöhung der intrazellulären Protonenkonzentration darstellen (Abb. 9B). Von Dedov et al. (2001) konnte beobachtet werden, dass in nicht-neuronalen Zellen auch in Abwesenheit von TRPV1 hohe Capsaicin-Konzentrationen (über  $100 \mu\text{M}$ ) zu einer direkten Depolarisation der Mitochondrien führen, was auch eine Erhöhung der intrazellulären Protonenkonzentration zur Folge haben könnte. In Vektor-transfizierten Kontrollzellen erfolgte jedoch nach Capsaicin-Applikation unter den gleichen aziden isotonen Pufferbedingungen keine Änderung des  $\text{pH}_i$  (Abb. 9D). Somit konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre Ansäuerung über TRPV1 vermittelt und nicht durch eine Depolarisation der Mitochondrien nach Capsaicin-Zugabe hervorgerufen wird. In Übereinstimmung mit der Annahme, dass nach TRPV1-Aktivierung ein direkter Einstrom von Ladungsträgern durch die offene TRPV1-Pore erfolgt, konnte durch Blockade der TRPV1-Pore mit Rutheniumrot die intrazelluläre Ansäuerung im Verlauf angehalten werden (Abb. 9C). Weiterhin trat bei Expression einer dominant-negativen TRPV1<sub>NML676FAP</sub> Mutante, bei der innerhalb des sechsten Transmembransegments drei Aminosäuren, N676F, M677A sowie L678P, ausgetauscht wurden (TRPV1<sub>NML676FAP</sub>; Kuzhikandathil et al., 2001) keine Capsaicin-induzierte intrazelluläre Azidifizierung ein (Abb. 9E).

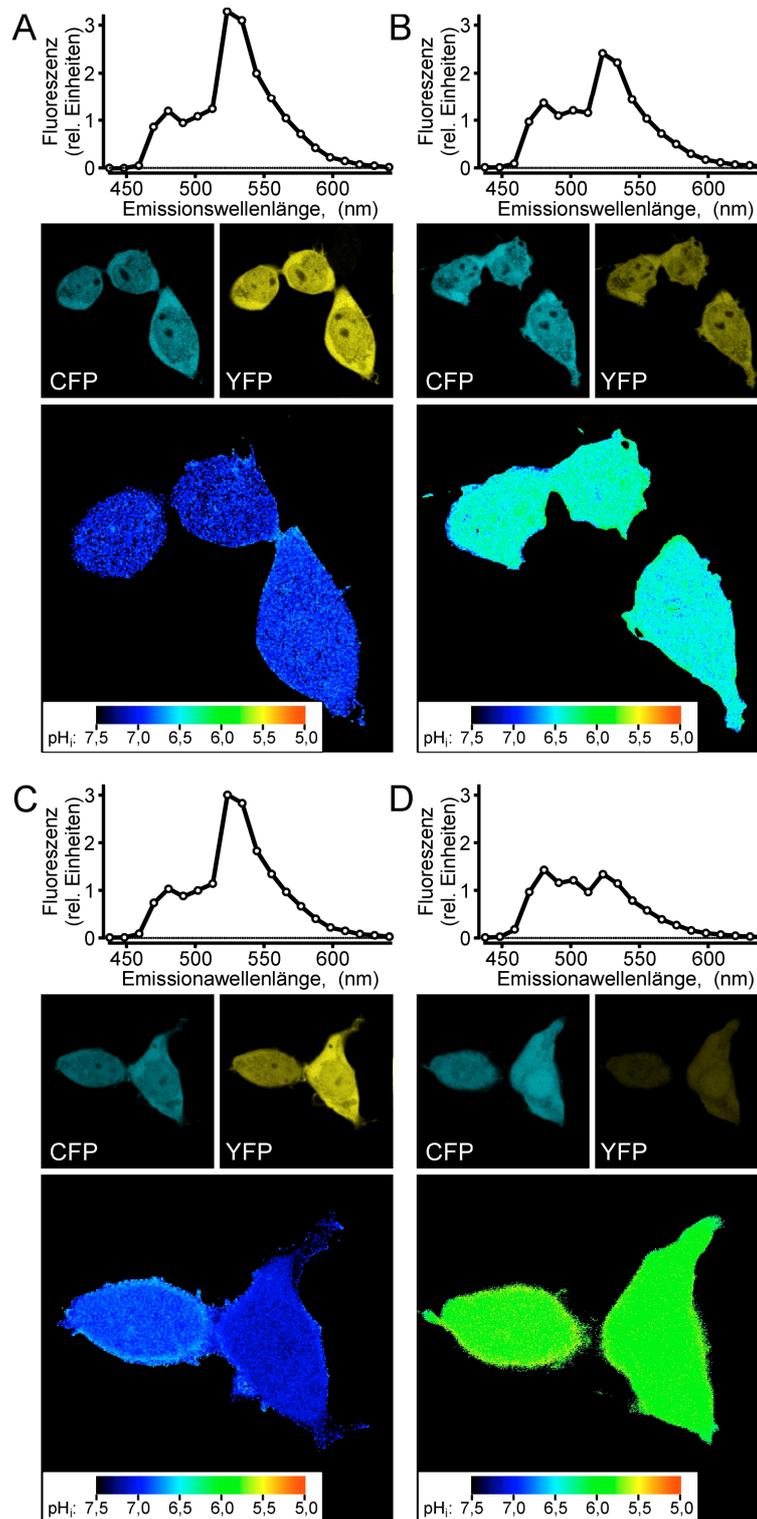
Sowohl ein direkter Protonenstrom als auch eine Permeation von protonierten schwachen Säuren oder Basen durch die Kanalpore könnten zu einer Verschiebung von Protonen aus dem extrazellulären Raum in das Cytosol führen. So wäre es z.B. möglich, dass die intrazelluläre Ansäuerung durch die Permeation von protoniertem MES verursacht wird. MES liegt im stark sauren extrazellulären Medium vorwiegend protoniert als Kation vor und könnte in dieser Form über die geöffnete TRPV1-Pore in die Zelle gelangen. Im Cytosol ist der pH im Vergleich zum extrazellulären Medium basischer, so dass das an MES gebundene Proton wieder abgegeben und so eine intrazelluläre Ansäuerung hervorgerufen werden könnte. Weder eine Reduktion der MES-Konzentration von 10 mM auf 1 mM noch eine Erhöhung auf 50 mM (bei konstantem pH 5,5) führte zu Veränderungen in Ausmaß oder Geschwindigkeit der Capsaicin-induzierten

intrazellulären Ansäuerung in TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen (Daten nicht dargestellt). Weiterhin konnte auch bei Austausch der Puffersubstanz MES gegen 2 % BSA (w/v) die Capsaicin-induzierte Ansäuerung unverändert beobachtet werden. Diese Daten deuten eher auf einen direkten Einstrom von Protonen bzw. Hydroniumionen durch die geöffnete TRPV1-Pore als auf eine Permeation des protonierten Puffers.

Mit Hilfe des spektral auflösenden, konfokalen LSM-META-Detektors und Anregung bei 458 nm (Argon-Laser) konnte sowohl unter  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen neutralen Bedingungen (Abb. 10A und B) als auch in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier azider isotoner KCl-Lösung (Abb. 10C und D) nach Zugabe von Capsaicin eine Abnahme der YFP-Fluoreszenz und gleichzeitig eine Zunahme der Donorfluoreszenz beobachtet werden. Nach Kalibration der pH-Signale zeigte sich, dass es nicht nur zu einer Absenkung des cytosolischen pH kam, sondern auch das Nukleoplasma ohne messbare Verzögerung von der Azidifizierung erreicht wurde. Somit könnten Capsaicin- und TRPV1-hervorgerufene Signale auch die transkriptionelle Regulation durch nukleäre Ansäuerung beeinflussen.

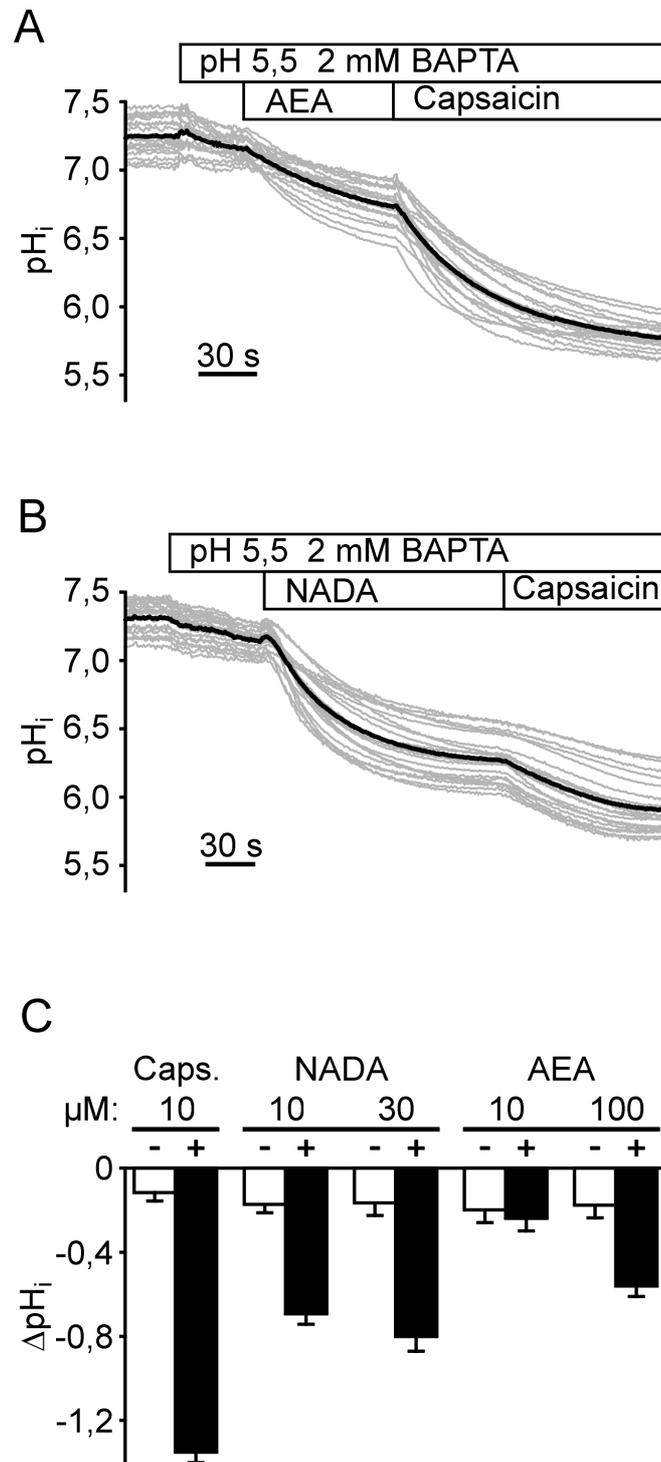
#### ***4.2.4. TRPV1-vermittelter Protonenstrom durch Endovanilloide***

Da es sich bei Capsaicin nicht um einen endogenen Liganden von TRPV1 handelt, untersuchten wir die Fähigkeit von *N*-Arachidonoyl-ethanolamin (Anandamid) und *N*-Arachidonoyl-dopamin (NADA), eine Ansäuerung durch Aktivierung von TRPV1 in HEK293-Zellen hervorzurufen. Die Messungen wurden wie zuvor beschrieben in azider isotoner KCl-Lösung durchgeführt. In Übereinstimmung mit früheren Befunden, dass Anandamid ein partieller TRPV1-Agonist mit geringer Bindungsaffinität ist (Olah et al., 2001a), wurden Konzentrationen von 10-100  $\mu\text{M}$  des Endocannabinoids benötigt, um eine signifikante Ansäuerung in TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen zu induzieren (Abb. 11A und C). Die anschließende Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  Capsaicin führte zu einer zusätzlichen Beschleunigung der Ansäuerung. NADA ist als ein mit Capsaicin vergleichbarer potenter endogener TRPV1-Aktivator beschrieben worden (Huang et al., 2002) und induzierte in unseren Messungen bei Konzentrationen zwischen 10-30  $\mu\text{M}$  einen starken Protoneneinstrom, der durch die Zugabe von Capsaicin (10  $\mu\text{M}$ ) auch nur geringfügig beschleunigt wurde (Abb. 11B und C).



**Abbildung 10: Konfokale pH<sub>i</sub>-Messung in TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen**

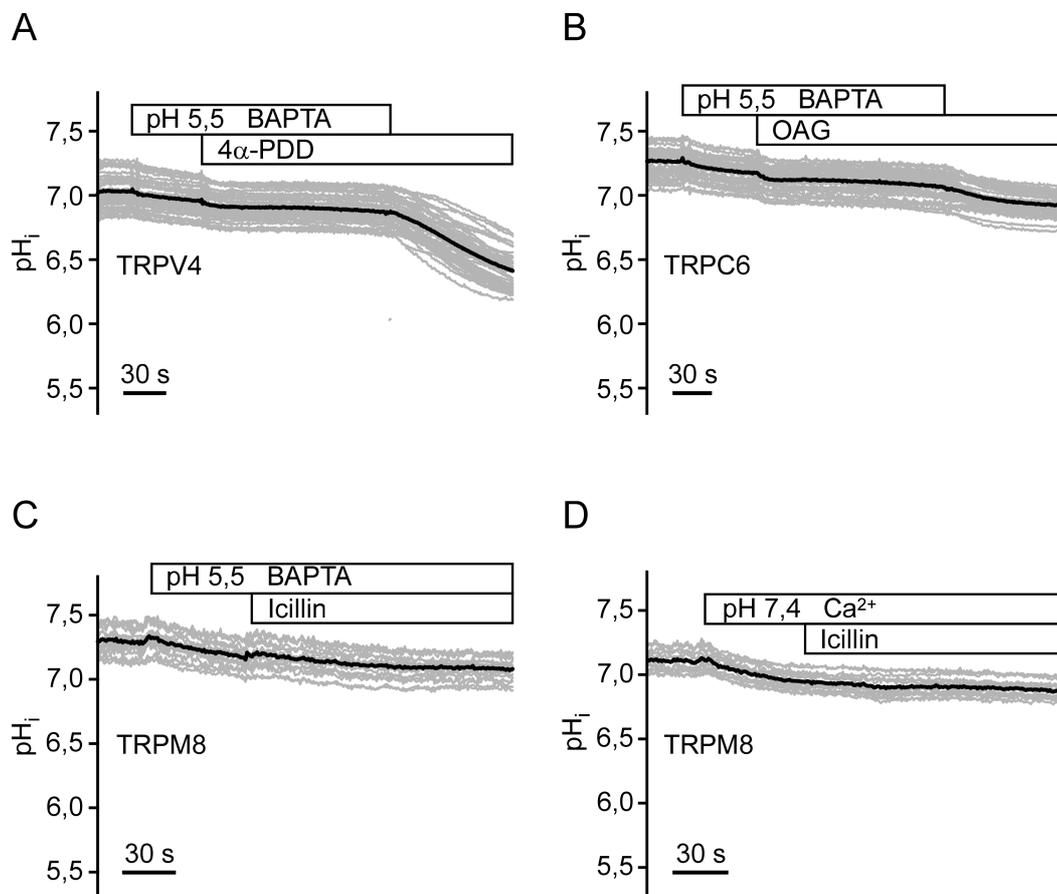
Nach transients Koexpression von TRPV1 und dem CFP-YFP-Tandemprotein in HEK293-Zellen erfolgten die Messungen sowohl in neutralem Medium (pH 7,4) in Anwesenheit von 1 mM Ca<sup>2+</sup> (A und B) als auch in Ca<sup>2+</sup>-freiem isotonem KCl-Puffer bei pH 5,5 (C und D). Die konfokalen Bilder wurden vor (A und C) und 60 s nach der Zugabe von 10 µM Capsaicin (B and D) aufgenommen. Dargestellt sind die über die Zellen gemittelten Emissionsspektren (obere Abbildungsteile), die aufgezeichneten Bilder der CFP- und YFP-Komponenten (mittlere Abbildungsteile) und eine Pixel-zu-Pixel Kalibration des pH<sub>i</sub> (untere Abbildungsteile).



**Abbildung 11: Effekt von Endovanilloiden auf den  $\text{pH}_i$  TRPV1-exprimierender HEK293-Zellen**

(A und B) TRPV1- und CFP-YFP-Tandem-exprimierende HEK293-Zellen wurden in azider isotoner KCl-Lösung (2 mM BAPTA, pH 5,5) mit 100  $\mu\text{M}$  *N*-Arachidonoyl-ethanolamin (AEA) oder 10  $\mu\text{M}$  *N*-Arachidonoyl-dopamin (NADA) stimuliert. Am Ende jedes Experiment erfolgte die Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  Capsaicin. (C) Statistische Auswertung der Capsaicin-, NADA- und AEA-induzierten intrazellulären Ansäuerung in azider isotoner KCl-Lösung. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte und Standardfehler (SEM) der  $\text{pH}_i$ -Änderungen innerhalb der ersten 60 s nach Applikation des aziden Puffers (weiße Balken) und 60 s nach Zugabe der Agonisten (schwarze Balken). Es wurden bei jeder Agonistkonzentration mehrere unabhängige Experimente durchgeführt, bei denen jeweils mindestens 10 Zellen ausgewertet wurden.

Weiterhin untersuchten wir noch andere nicht-selektive Kanäle der TRP-Familie mit bekannten direkten Aktivatoren auf eine direkte Protonen-Permeabilität. Weder die Stimulation von TRPV4 mit 4 $\alpha$ -Phorbol-12,13-didecanoat (5  $\mu$ M), noch die Aktivierung von TRPC6 durch 1-Oleoyl-2-acetyl-*s,n*-glycerol (100-200  $\mu$ M), oder die Stimulation von TRPM8 mit Icillin (20  $\mu$ M) induzierte eine vergleichbare intrazelluläre Ansäuerung in transient transfizierten HEK293-Zellen in Ca<sup>2+</sup>-freien aziden KCl-Lösungen (Abb. 12). Eine Ca<sup>2+</sup>-vermittelte intrazelluläre Ansäuerung konnte jedoch bei TRPV4-Aktivierung beobachtet werden (Abb. 12A), wobei die Kinetik der Azidifizierung im Vergleich zur TRPV1-vermittelten Ansäuerung langsamer verlief.



**Abbildung 12: Untersuchung von TRPV4, TRPC6 und TRPM8 auf Ca<sup>2+</sup>-vermittelte und Ca<sup>2+</sup>-unabhängige intrazelluläre Ansäuerung**

CFP-YFP-Tandem- und TRPV4- (A) oder TRPC6- (B) exprimierende HEK293-Zellen wurden nach Wechsel des extrazellulären Mediums zu einer Ca<sup>2+</sup>-freien aziden KCl-Lösung (2 mM BAPTA, pH 5,5) mittels der direkten Liganden 4 $\alpha$ -Phorbol-12,13-didecanoat (4 $\alpha$ -PDD; 5  $\mu$ M) und 1-Oleoyl-2-acetyl-*s,n*-glycerol (OAG; 100  $\mu$ M) aktiviert. Am Ende der Messung wurde der extrazelluläre Puffer in Anwesenheit der Agonisten wieder gegen ein Ca<sup>2+</sup>-haltiges neutrales Medium (1 mM Ca<sup>2+</sup>, pH 7,4) ausgetauscht. (C und D) TRPM8 und CFP-YFP-Tandem-exprimierende HEK293-Zellen wurden entweder in Ca<sup>2+</sup>-freier azider isotoner KCl-Lösung (C) oder in Ca<sup>2+</sup>-haltigem (1 mM) neutralem Medium (D) mit 20  $\mu$ M Icillin stimuliert.

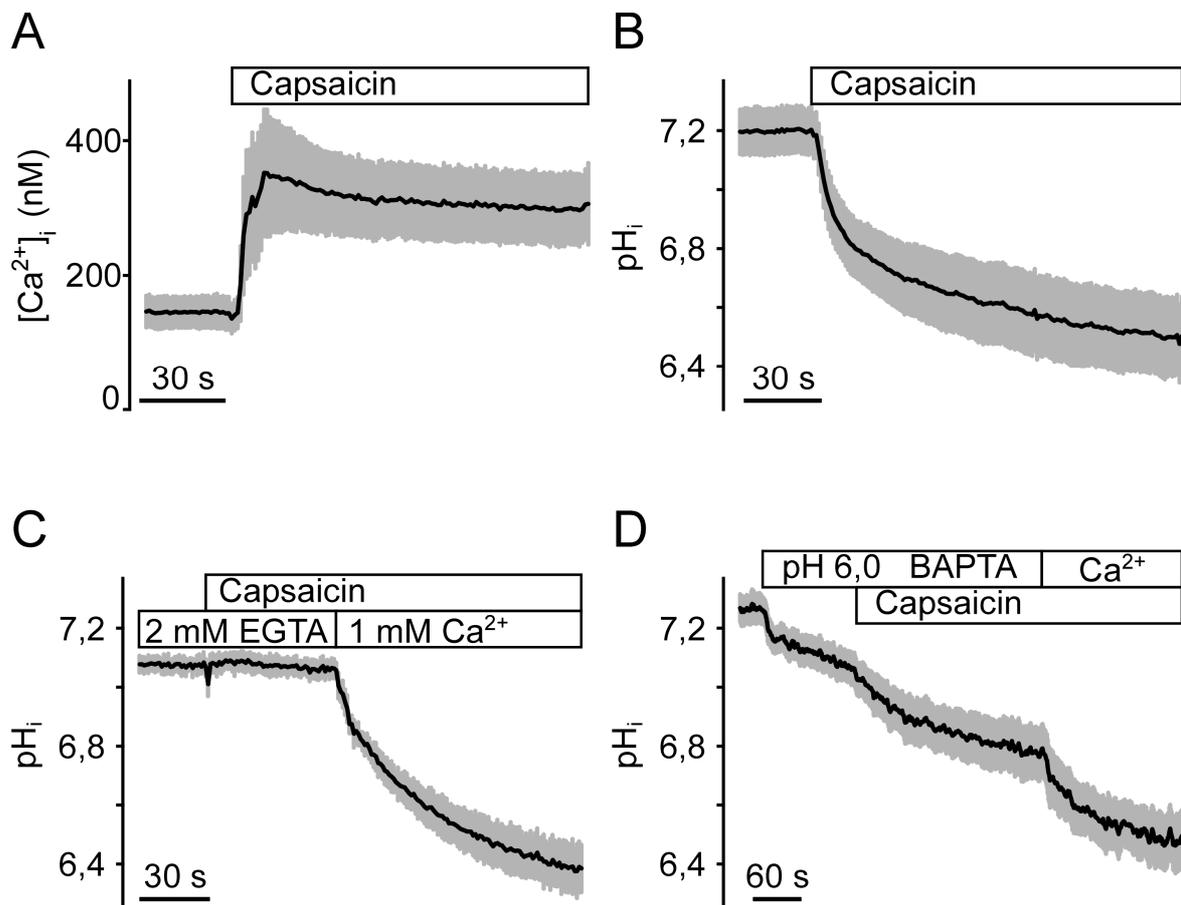
#### **4.2.5. Capsaicin-induzierte pH-Änderungen in nativen Nozizeptoren**

TRPV1 wird innerhalb der Hinterwurzelganglien („dorsal root ganglia“, DRG) in A $\delta$ - und C-Fasern, also Neuronen kleinen bis mittleren Durchmessers exprimiert (Caterina et al., 1997). In fluorometrischen Ca<sup>2+</sup>-Messungen bei neutralem pH<sub>ext</sub> (7,4) und 1 mM extrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Konzentration kam es in frisch isolierten DRG Neuronen mit kleinen bis mittleren Durchmessern nach Zugabe von Capsaicin (20  $\mu$ M) zu einem lang anhaltenden intrazellulären [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Anstieg (Abb. 13A). Bei parallelen Messungen mit dem pH-Indikator BCECF zeigte sich, wie zuvor im heterologen Expressionssystem beobachtet, auf Capsaicingabe eine deutliche Abnahme des cytosolischen pH von  $7,12 \pm 0,1$  auf  $6,7 \pm 0,1$  (n = 5 unabhängige Experimente; Abb. 13B). Dieser Effekt blieb in Ca<sup>2+</sup>-freiem extrazellulärem Medium aus, und konnte durch die Zugabe von Ca<sup>2+</sup> in das extrazelluläre Medium wieder hervorgerufen werden (von pH<sub>i</sub> =  $7,04 \pm 0,02$  bei Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> auf  $6,48 \pm 0,02$  60 s nach Zugabe von 1 mM Ca<sup>2+</sup>; Abb. 13C). Wurde der äußere pH in Analogie zur Situation im entzündeten Gewebe auf Werte um pH 6,5 bis 6,0 abgesenkt, reagierten Capsaicin-stimulierte DRG-Neurone auch in Abwesenheit von extrazellulärem Ca<sup>2+</sup> (1 mM BAPTA) auf die Zugabe von Capsaicin mit einer intrazellulären Ansäuerung (Abb. 13D). Ein späterer Wechsel zu Ca<sup>2+</sup>-haltigem Puffer (1 mM) führte zu einer weiteren Abnahme des pH<sub>i</sub> in den selben Zellen, die bereits zuvor auf Capsaicin in Ca<sup>2+</sup>-freiem Medium reagiert hatten (Abb. 13D). [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Bestimmungen in Fura 2-geladenen DRG-Neuronen zeigten, dass unter den hier angewandten aziden und Ca<sup>2+</sup>-freien Bedingungen (1 mM BAPTA, pH 6,0) kein Ca<sup>2+</sup>-Influx mehr stattfand. Diese Daten weisen darauf hin, dass auch im nativen System neben dem Mechanismus der Ca<sup>2+</sup>-abhängigen TRPV1-induzierten intrazellulären Ansäuerung auch ein direkter Protoneneinstrom über die TRPV1-Pore existiert.

Zur weiteren Charakterisierung der zu Grunde liegenden Mechanismen gingen wir wieder auf ein heterologes Expressionssystem über.

#### **4.2.6. Elektrophysiologische Messung des Protonenstroms durch TRPV1**

Bei einem pH<sub>i</sub>-Abfall von 1,5 Einheiten innerhalb von 2 min, wie dieser unter aziden extrazellulären Bedingungen in HEK293-Zellen nach TRPV1-Stimulation beobachtet werden konnte, müssten bei einem mittleren Zellvolumen von 1,5 pl (10  $\mu$ m x 20  $\mu$ m x 5  $\mu$ m) und unter Berücksichtigung einer intrazellulären Protonen-Pufferkapazität von 120 mmol/l mindestens

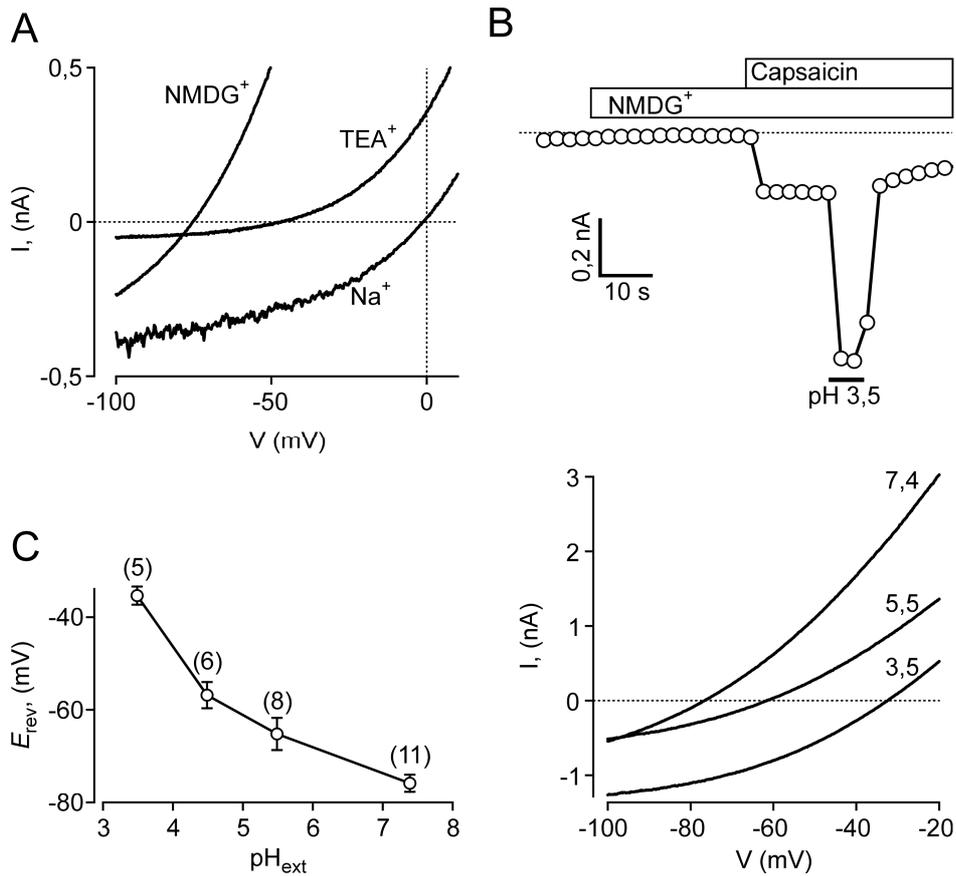


**Abbildung 13: Capsaicin-induzierte intrazelluläre Ansäuerung in nozizeptiven DRG Neuronen**

(A) Capsaicin-induzierte  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege in DRG Neuronen kleinen bis mittleren Durchmessers. Gezeigt ist der Mittelwert (schwarze Linie)  $\pm$  SD (graues Areal) einer repräsentativen Messung. (B-D) Capsaicin-induzierte  $pH_i$ -Änderungen in BCECF-geladenen DRG Neuronen. Dargestellt sind die zeitlichen Veränderungen des  $pH_i$  als Mittelwert (schwarze Linie)  $\pm$  SD (graues Areal) einer repräsentativen Messung von 4-6 unabhängigen Experimenten. (B) Die Zellen wurden in neutralem  $Ca^{2+}$ -haltigem Medium (1 mM  $Ca^{2+}$ ; pH 7,4) durch die Zugabe von 20  $\mu$ M Capsaicin stimuliert. Hier dargestellt ist der mittlere  $pH_i$  in 23 auf Capsaicin reagierenden Zellen (ca. 60 % der Neurone kleinen bis mittleren Durchmessers im Blickfeld). Diese Daten sind repräsentativ für 5 unabhängige Experimente. (C) BCECF-geladene DRG Neurone wurden in neutralem  $Ca^{2+}$ -freiem Medium (2 mM EGTA; pH 7,4) gehalten. Die Badlösung wurde dann während kontinuierlicher TRPV1-Stimulation (20  $\mu$ M Capsaicin) durch einen  $Ca^{2+}$ -haltigen Puffer (1 mM  $Ca^{2+}$ ) ersetzt. (D) DRG Neurone wurden wie angezeigt mit azidem  $Ca^{2+}$ -freiem Puffer (2 mM BAPTA, pH 6,0) umspült. Unter Anwesenheit von Capsaicin (20  $\mu$ M) wurde das extrazelluläre Medium durch eine  $Ca^{2+}$ -haltige neutrale Badlösung (1 mM  $Ca^{2+}$ , pH 7,4) ausgetauscht.

$1,62 \times 10^{11}$  Protonen pro Sekunde über die Plasmamembran fließen. Dies entspräche messbaren Einwärtsströmen von 100-200 pA. In elektrophysiologischen Messungen im Gesamtzell-Modus, bei einem Haltepotential von  $-60$  mV und Ringer-Lösung als extrazelluläres Medium, löste Capsaicin in TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen jedoch bereits so große Ströme mit Amplituden von 5-15 nA aus, dass eine zusätzliche Protonen-Influxkomponente nicht mehr

wahrgenommen werden konnte. Zusätzlich wurde der Nachweis eines direkten Protonenstroms durch die Protonen-induzierte Potenzierung von TRPV1 erschwert. Für weitere Messungen war es somit erforderlich, eine Badlösung herzustellen, in der außer  $\text{H}^+/\text{H}_3\text{O}^+$  alle weiteren durch TRPV1 permeierenden Kationen aus der Badlösung entfernt und durch nicht-permeierende Ionen ersetzt wurden. In neutralen extrazellulären Lösungen (pH 7,4), die *N*-Methyl-D-glucamin ( $\text{NMDG}^+$ ) als einzigen positiven Ladungsträger außer  $\text{H}^+/\text{H}_3\text{O}^+$  enthielten ( $\text{NMDG}^+$ -Badlösungen), aktivierte Capsaicin Ströme mit einem Umkehrpotential von  $76,2 \pm 1,9$  mV ( $n = 11$ ; Abb. 14A und B). Die relative Permeabilität von  $\text{NMDG}^+$  gegenüber  $\text{Cs}^+$  ( $P_{\text{NMDG}^+} : P_{\text{Cs}^+} = 0,05$ ) wies auf einen unvollständigen Ausschluss großer Kationen durch die TRPV1-Pore. Ebenso führten auch andere organische Kationen wie Tetraethylammonium ( $\text{TEA}^+$ ), Histidin, Bis-Tris und Bis-Tris-Propan in der Abwesenheit von extrazellulären mono- oder divalenten Metallionen zu signifikanten Einwärtsströmen (Abb. 14A). Da  $\text{NMDG}^+$  von den getesteten Substanzen die niedrigste fraktionelle Permeabilität besaß und relativ insensitive gegenüber pH-Änderungen im neutralen und sauren Bereich war, wurden bei den anschließenden Experimenten  $\text{NMDG}^+$ -Badlösungen verwendet. Wenn TRPV1 eine Protonenleitfähigkeit besitzt, müsste eine Änderung des  $\text{pH}_{\text{ext}}$  auch zu einer Änderung der Capsaicin-induzierten Ströme führen. Eine sprunghafte Erniedrigung des  $\text{pH}_{\text{ext}}$  von 7,4 auf 5,5 induzierte konsistent eine Verschiebung des Umkehrpotentials um +11 mV. Bei einem  $\text{pH}_{\text{ext}}$ -Wechsel von 7,4 auf 4,5 oder 3,5 verschob sich das Umkehrpotential um 19 mV bzw. 41 mV in Richtung positiver Werte (Abb. 14B und C; Tabelle 1). Der Austausch von  $\text{Cs}^+$  durch  $\text{NMDG}^+$  in der Pipettenlösung hatte keinen Einfluss auf die zuvor beobachteten pH-abhängigen Verschiebungen in der Strom-Spannungs-Kennlinie (Daten nicht dargestellt), was darauf hinweist, dass die Rechtsverschiebungen durch eine  $\text{H}^+/\text{H}_3\text{O}^+$ -Leitfähigkeit von TRPV1 und nicht durch eine pH-abhängige Veränderung der  $\text{NMDG}^+$ -Permeabilität gegenüber  $\text{Cs}^+$  ( $P_{\text{NMDG}^+} : P_{\text{Cs}^+}$ ) hervorgerufen wurde. Bei einem zuvor ermittelten  $P_{\text{NMDG}^+} : P_{\text{Cs}^+}$  Verhältnis von 0,05 und der Annahme, dass die unterschiedlichen Kationen unabhängig voneinander permeieren, ergaben die bei den unterschiedlichen  $\text{pH}_{\text{ext}}$  gemessenen Umkehrpotentiale Permeabilitätsquotienten für  $P_{\text{H}^+} : P_{\text{Cs}^+}$  von 87 bis 1127 (siehe Tabelle 1). Für TRPV1 konnte somit eine deutlich höhere relative Permeabilität für Protonen im Vergleich zu monovalenten Metallkationen ermittelt werden, was auf einen eigenständigen Protonen-Permeationsmechanismus durch die TRPV1-Pore hinweist.



**Abbildung 14: Elektrophysiologischer Nachweis von Protonenströmen durch TRPV1**

(A) I/V-Beziehung von Capsaicin-induzierten Ganzzellströmen in TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen. Extrazelluläres Na<sup>+</sup> wurde durch die organischen Kationen TEA<sup>+</sup> oder NMDG<sup>+</sup> ersetzt. TRPV1 wurde durch die Zugabe von 10 μM Capsaicin aktiviert. Auffallend sind die Verschiebungen des Umkehrpotentials und die fortbestehenden Einwärtsströme bei -100 mV. (B) Die Capsaicin-induzierten Ganzzellströme wurden bei einem Haltepotential von -60 mV in Na<sup>+</sup>- und Ca<sup>+</sup>-freiem NMDG<sup>+</sup>-Medium bei einem pH<sub>ext</sub> von 7,4 gemessen (oberer Abbildungsteil). Der pH der Badlösung wurde kurzzeitig auf 3,5 herabgesetzt. Der untere Abbildungsteil zeigt die I/V-Beziehung mit pH<sub>ext</sub>-abhängigen Verschiebungen des Umkehrpotentials Capsaicin-induzierter Ströme in extrazellulärer NMDG<sup>+</sup>-Badlösung. (C) Statistische Auswertung der Umkehrpotentiale bei unterschiedlichen extrazellulären Protonenkonzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD von 5-11 Ganzzellmessungen.

pH <sub>ext</sub> -Wechsel	$\Delta E_{rev}$	$P_H^+ : P_{Cs}^+$
von 7,4 nach 5,5	+11 mV	1127
von 7,4 nach 4,5	+19 mV	245
von 7,4 nach 3,5	+41 mV	87

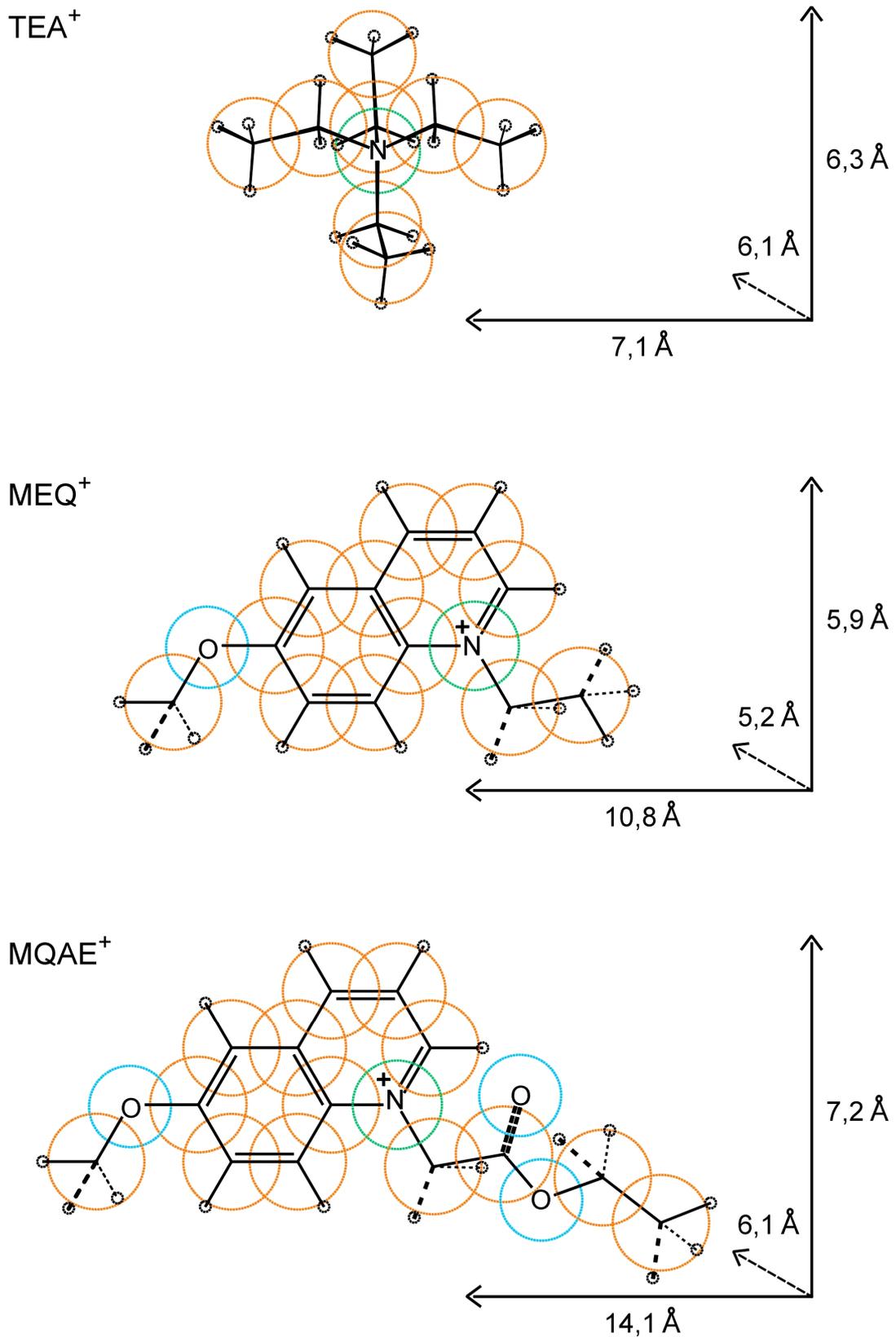
**Tabelle 1: Protonenstrom durch die TRPV1-Pore**

Die Strom-Spannungs-Kennlinien (-80 bis +80 mV) Capsaicin-induzierter Ganzzellströme in TRPV1-YFP-exprimierenden HEK293-Zellen wurden vor und nach pH<sub>ext</sub>-Wechsel der NMDG<sup>+</sup>-Badlösungen aufgezeichnet. Hier aufgelistet sind die pH-abhängigen Verschiebungen des Umkehrpotentials ( $\Delta E_{rev}$ ) sowie die relativen Protonen-Permeabilitäten gegenüber Cs<sup>+</sup> ( $P_H^+ : P_{Cs}^+$ ).

#### 4.2.7. Permeation von organischen Kationen durch die TRPV1-Pore

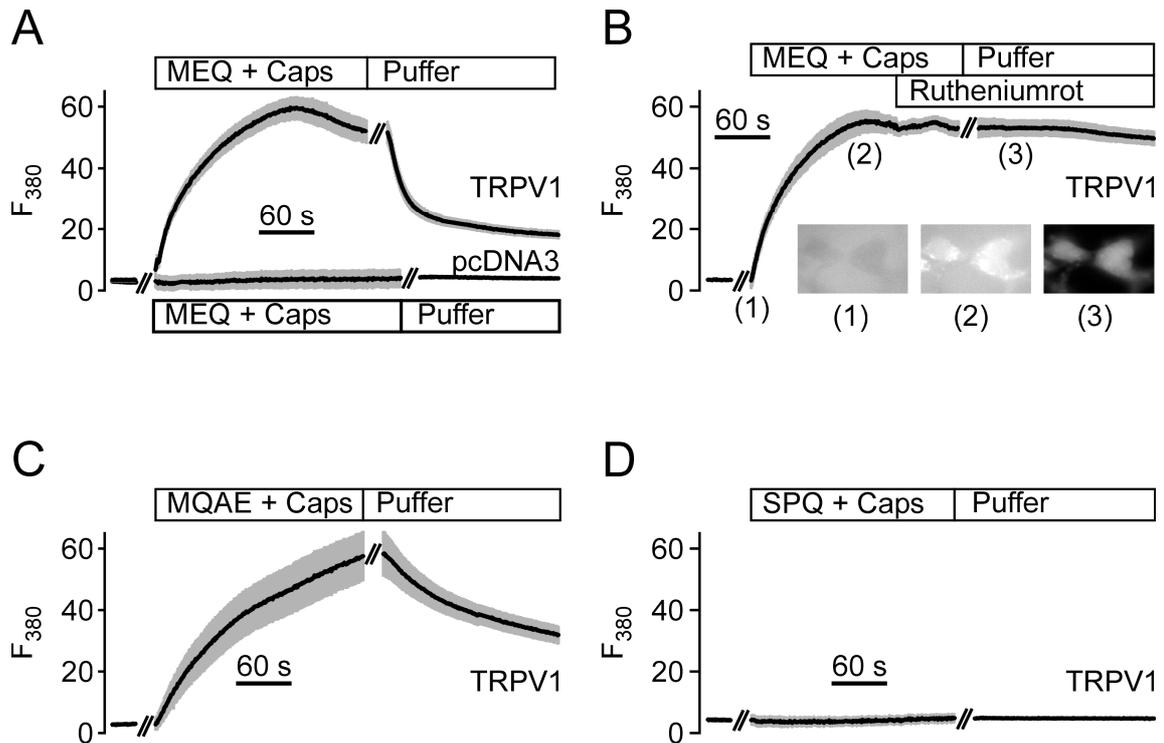
Ein Modell für den zugrunde liegenden Permeationsmechanismus war die Annahme, dass der Protonenstrom durch die offene TRPV1-Pore über eine Kette von freien Wassermolekülen getragen wird, die den intrazellulären und extrazellulären Raum miteinander verbinden. Die Protonen könnten dann innerhalb der Pore entlang der Wasserstoffbrückenbindungen von einem Wassermolekül zum nächsten weiterspringen (Grotthuss Mechanismus; von Grotthuss, 1806). In diesem Fall würde man für den aktivierten TRPV1 einen großen Porendurchmesser erwarten. Die elektrophysiologischen Daten zeigten tatsächlich, dass die TRPV1-vermittelten Kationenströme durch große organische Ionen wie  $\text{TEA}^+$  und  $\text{NMDG}^+$  getragen werden können (siehe Abb. 14A und B). Es stellte sich jedoch die Frage, ob es nur in Abwesenheit kleiner Metallkationen zu einem Einstrom von großen Kationen durch die TRPV1-Pore kommt, da bei den elektrophysiologischen Messungen eine Badlösung verwendet wurde, die keine Metallkationen enthielt (siehe 4.2.6).

Um die Poreneigenschaften von TRPV1 bezüglich der Permeation großer Kationen in Anwesenheit kleiner positiver Ladungsträger wie  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  zu untersuchen, nutzten wir das fluoreszierende Kation 6-Methoxy-*N*-ethylquinolinium ( $\text{MEQ}^+$ ), ein membranimpermeabler  $\text{Cl}^-$ -Indikator, dessen Fluoreszenz durch  $\text{Cl}^-$ -Ionen gequencht wird (Stern-Volmer-Konstante;  $K_{\text{SV}} = 145 \text{ M}^{-1}$ ). Der Einstrom von  $\text{MEQ}^+$  in das Cytosol lässt sich einfach verfolgen, da es hierbei zu einer Erholung der Fluoreszenz aufgrund der geringeren intrazellulären  $\text{Cl}^-$ -Konzentration kommt.  $\text{MEQ}^+$  besitzt einen mittleren Moleküldurchmesser von  $(5,2 \times 5,9 \times 10,8) \text{ \AA}$  und entspricht ungefähr dem von  $\text{TEA}^+$  und  $\text{NMDG}^+$  (siehe Abb. 15). In neutralem extrazellulärem Medium konnte nach Capsaicin-Applikation auch in Anwesenheit monovalenter Metallkationen ( $130 \text{ mM Na}^+$ ,  $6 \text{ mM K}^+$ ) eine Aufnahme dieses heterozyklischen, kationischen Farbstoffes selektiv in TRPV1-exprimierende Zellen beobachtet werden (Abb. 16A). In Kontrollmessungen mit untransfizierten HEK293-Zellen kam es zu keinem Capsaicin-induzierten Einstrom von  $\text{MEQ}^+$ . In Übereinstimmung mit der Annahme, dass  $\text{MEQ}^+$  in beiden Richtungen direkt durch die Kanal-Pore permeieren kann, strömte der intrazellulär geladene Farbstoff nach einem Pufferwechsel schnell in die Badlösung zurück (Abb. 16A). Die Zugabe des Porenblockers Rutheniumrot ( $10 \text{ }\mu\text{M}$ ) noch vor dem Ausspülen des extrazellulären  $\text{MEQ}^+$  stoppte den Ladungsvorgang, und auch der Ausstrom des Farbstoffes wurde unterbunden



**Abbildung 15: Ionendurchmesser von TEA<sup>+</sup>, MEQ<sup>+</sup> und MQAE<sup>+</sup>**

Dargestellt sind die Molekülstrukturen von Tetraethylammonium (TEA<sup>+</sup>), 6-Methoxy-*N*-ethylquinolinium (MEQ<sup>+</sup>) und *N*-Ethoxycarbonylmethyl-6-methoxyquinolinium (MQAE<sup>+</sup>) und ihre daraus berechneten mittleren Ionengrößen. Bindungslängen, Winkel und Atomgrößen wurden den Tabellen des CHARMM22 Parametersatzes entnommen.



**Abbildung 16: Einstrom großer organischer Kationen durch die TRPV1-Pore**

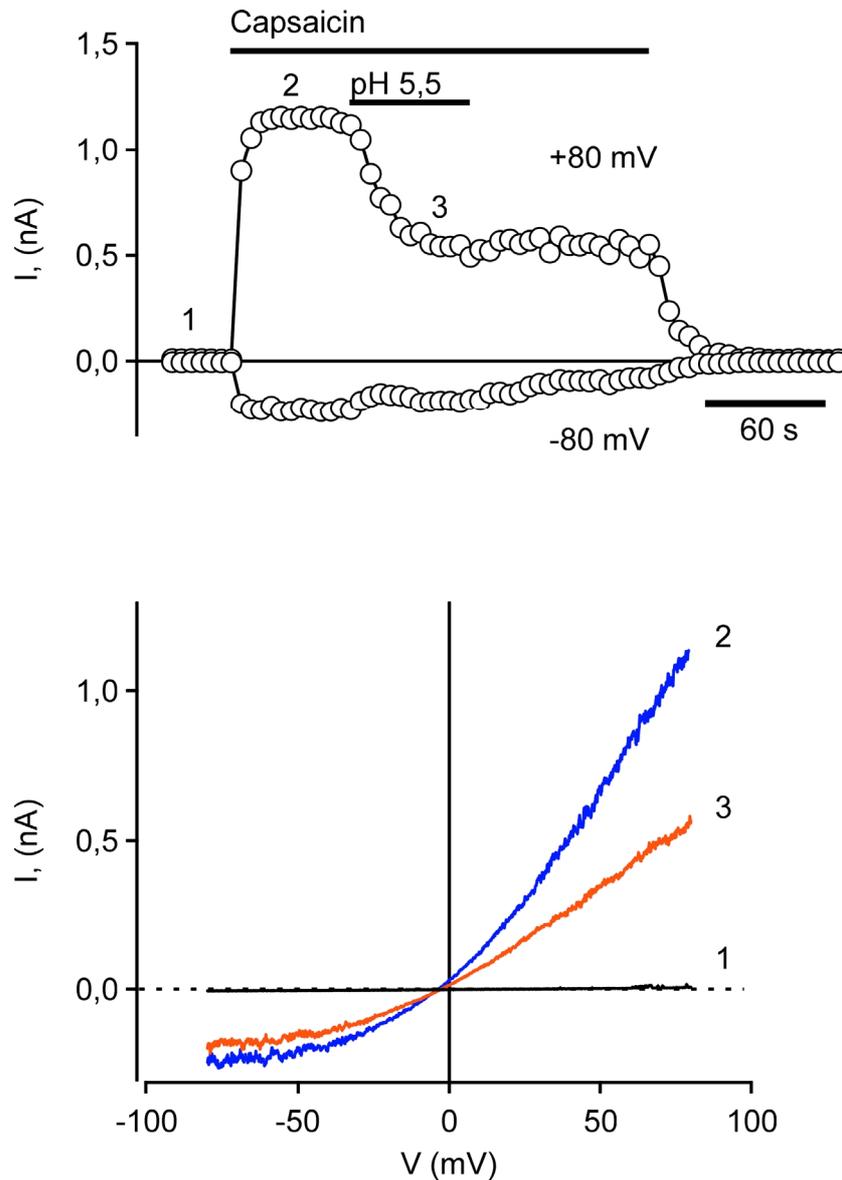
(A-D) TRPV1-exprimierende HEK293-Zellen wurden mit einer neutralen  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Lösung umspült. Die Zugabe von  $10 \mu\text{M}$  Capsaicin und  $1 \text{ mM}$  der Zell-impermeablen  $\text{Cl}^-$ -Indikatoren  $\text{MEQ}^+$  (A und B),  $\text{MQAE}^+$  (C) oder  $\text{SPQ}^{+/-}$  (D) erfolgte zum gleichen Zeitpunkt und ist durch einen Applikationsbalken gekennzeichnet. Die Fluoreszenz der Indikatoren wurde kontinuierlich während des Ladungsvorganges und des darauf folgenden Waschschrilles aufgezeichnet. Dargestellt sind die Indikator-Fluoreszenzintensitäten nach Abzug der Hintergrundsignale, die in der unmittelbaren Umgebung jeder Einzelzelle ermittelt wurden. (A)  $\text{MEQ}^+$ -Einstrom in TRPV1-transfizierten Zellen (TRPV1) und in Vektor-transfizierten Kontrollzellen (pcDNA3). (B) Die Zugabe von  $10 \mu\text{M}$  Rutheniumrot vor Entfernen des extrazellulären  $\text{MEQ}^+$  stoppte sowohl den Einstrom des  $\text{Cl}^-$ -Indikators in TRPV1-exprimierende Zellen als auch dessen Ausstrom zurück ins extrazelluläre Medium. Die Bilder zeigen eine repräsentative Gruppe TRPV1-exprimierender Zellen kurz vor der Zugabe von  $\text{MEQ}^+$  und Capsaicin (1), 3 min nach Zugabe (2) und nach Auswaschen des extrazellulären  $\text{MEQ}^+$  (3), wie im Zeitverlauf angegeben. (C) und (D) Experimente wie unter (A) beschrieben, jedoch wurden jeweils  $1 \text{ mM}$  der größeren  $\text{Cl}^-$ -Indikatoren  $\text{MQAE}^+$  (C) und  $\text{SPQ}^{+/-}$  (F) verwendet.

(Abb. 16B). Diese Daten bestätigten, dass sowohl der Einstrom als auch der Ausstrom von  $\text{MEQ}^+$  über eine geöffnete TRPV1-Pore erfolgte. Auch *N*-Ethoxycarbonylmethyl-6-methoxyquinolinium ( $\text{MQAE}^+$ ), ein Derivat des  $\text{MEQ}^+$  mit größerem Ionendurchmesser von ( $6,1 \times 7,2 \times 14,1$ ) Å (siehe Abb. 15), konnte durch Capsaicin-Applikation in TRPV1-exprimierende HEK293-Zellen geladen werden (Abb. 16C). Ein Einstrom von 6-Methoxy-*N*-(3-sulfopropyl) quinolinium ( $\text{SPQ}^{+/-}$ ), einem internen Salz von  $\text{MQAE}^+$ , konnte nicht beobachtet werden (Abb. 16D), was eine Kationen-Selektivität für die Permeation großer Moleküle durch die

TRPV1-Pore erkennen lässt. Diese Fluoreszenzexperimente zeigen, dass große Kationen auch in Anwesenheit physiologischer extrazellulärer Kationen durch die TRPV1-Pore permeieren. Somit stimmen diese Daten mit dem zuvor aufgestellten Modell überein, dass die TRPV1-Pore groß genug ist, um eine Säule aus freien Wassermolekülen aufzubauen, die den extrazellulären und intrazellulären Raum verbindet. Obwohl auch sehr große und sperrige Ladungsträger wie MQAE<sup>+</sup> von TRPV1 geleitet werden, ist die Permeation von Ionen durch die TRPV1-Pore weiterhin auf Kationen beschränkt.

#### ***4.2.8. Auswirkungen der intrazellulären Ansäuerung auf TRPV1-getragene Ströme***

Zur Klärung der Fragestellung, ob die intrazelluläre Ansäuerung einen Effekt auf die TRPV1-Aktivität in HEK293-Zellen hat, wurden Experimente an „cell-attached“-Membranflecken durchgeführt. Diese Messkonfiguration wurde gewählt, da innerhalb des von der Pipette umschlossenen Membranflecks TRPV1-Kanäle vor einer Potenzierung durch die azide Badlösung geschützt und eine Aktivierung von ASICs („acid-sensing ion channels“) vermieden wurde. Die Badlösung enthielt 140 mM KCl, um die Zellen zu depolarisieren. Unter diesen Bedingungen konnten in den Membranflecken spontane Ströme mit Amplituden entsprechend einzelner Kanalöffnungen bis hin zu makroskopischen Strömen von mehreren hundert pA gemessen werden. Diese Ströme waren durch eine TRPV1-typische auswärts gleichrichtende Strom-Spannungs-Kurve gekennzeichnet und ihr Umkehrpotential lag nahe 0 mV. Die Zugabe von Capsaicin (1  $\mu$ M) in die Badlösung erhöhte die TRPV1-Stromdichte (Abb. 17). Anschließend erfolgte in Anwesenheit von Capsaicin ein Wechsel des  $pH_{\text{ext}}$  von 7,4 auf 5,5, um eine intrazelluläre Ansäuerung zu erwirken. Die intrazelluläre Azidifizierung führte in allen Zellen zu einer Reduktion des Auswärtsstroms ( $p = 0,0018$  bei +80 mV). In einigen Zellen konnte auch eine reproduzierbare und statistisch signifikante Reduktion des Einwärtsstroms ( $p = 0,153$  bei +80 mV) beobachtet werden (Abb. 17). Auffallend war auch die nach intrazellulärer Ansäuerung auftretende konsistente Abnahme der lokalen Steigung der Strom-Spannungs-Kennlinie bei 0 mV um 25 %-40 % (Abb. 17). Eine intrazelluläre Erhöhung der Protonenkonzentration führt demnach zu einer spannungsabhängigen Blockierung von TRPV1. Effekte auf andere, in nozizeptiven Neuronen exprimierte Ionenkanäle und Signalmoleküle sind wahrscheinlich und sollen in weiteren Studien charakterisiert werden.



**Abbildung 17: Beeinflussung der TRPV1-Aktivität durch die intrazelluläre Ansäuerung**

TRPV1-Ströme in HEK293-Zellen wurden in der „cell-attached“-Konfiguration in  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -freier isotoner KCl-Badlösung aufgezeichnet. Der  $\text{pH}_{\text{ext}}$  wurde während der TRPV1-Stimulation ( $1 \mu\text{M}$  Capsaicin) von 7,4 auf 5,5 abgesenkt. Im unteren Abbildungsteil sind die Strom-Spannungs-Kennlinien (-80 bis +80 mV) vor (1) und nach (2) Capsaicin-Applikation bei  $\text{pH}_{\text{ext}}$  7,4 sowie nach dem  $\text{pH}_{\text{ext}}$ -Wechsel auf 5,5 (3) dargestellt.

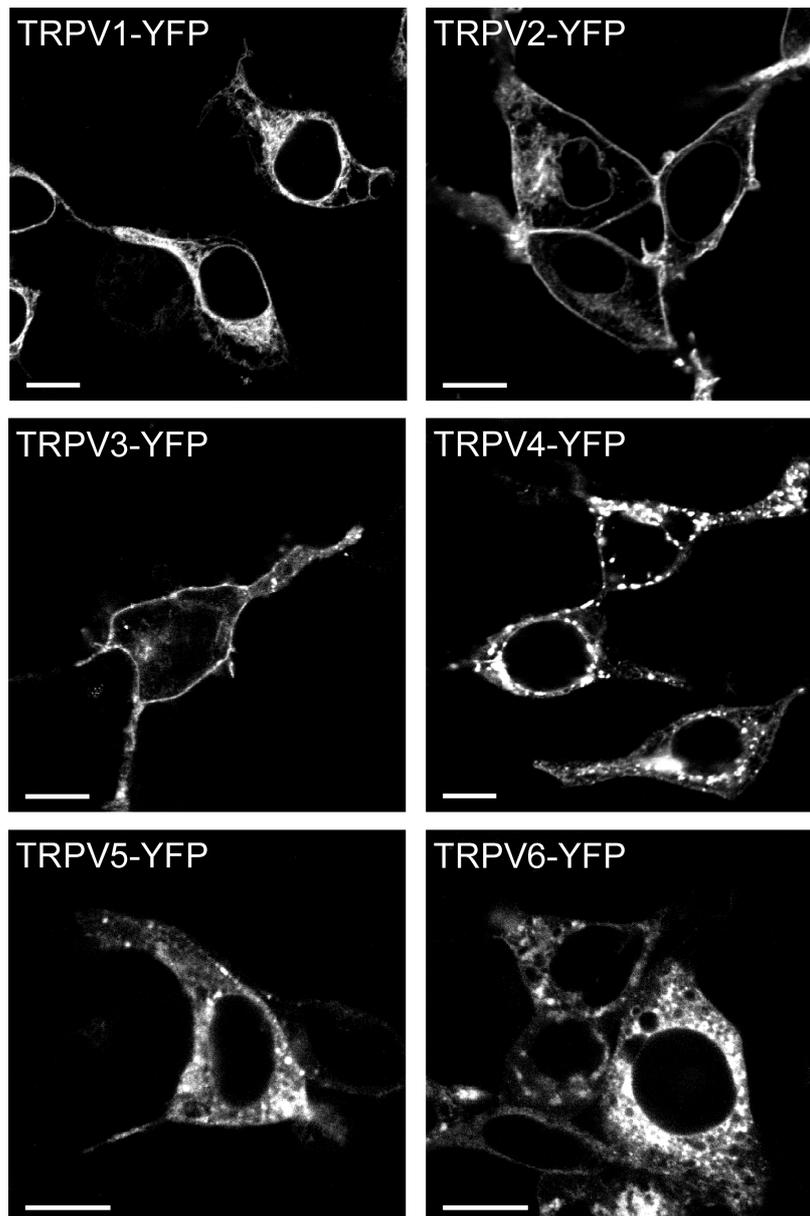
### **4.3. Homo- und Heteromultimerisierung von TRPV-Kanaluntereinheiten**

Um die Assemblierung von unterschiedlichen TRPV-Kanaluntereinheiten verfolgen zu können, wurden Fusionsproteine von TRPV1 bis TRPV6 mit den cyanen und gelben Farbvarianten des GFP und mit dem FLAG-Epitop generiert. Die Interaktionsfähigkeit zwischen den TRPV-Kanaluntereinheiten wurde über die Darstellung der subzellulären Lokalisation kotransfizierter fluoreszierender TRPV-Fusionsproteine (Kokalisation), FRET und Koimmunpräzipitation bestimmt. Weiterhin wurde mittels trunkierter TRPV1-Konstrukte, cytosolischer Termini von TRPV1 und TRPV4 sowie chimärer TRPV-Kanaluntereinheiten untersucht, welche strukturellen Determinanten zu der Affinität und Selektivität der TRPV-Kanalkomplexbildung beitragen.

Die Fusionsproteine TRPV1-YFP bis TRPV6-YFP wurden zunächst auf ihre funktionelle Integrität hin getestet. Die in elektrophysiologischen Messungen und  $[Ca^{2+}]_i$ -Bestimmungen überprüften regulatorischen und biophysikalischen Eigenschaften von TRPV1-YFP bezüglich dessen Kationenselektivität, der Strom/Spannungs-Beziehung, sowie der Aktivierung durch Capsaicin, Endovanilloide, Hitze und extrazelluläre Protonen entsprachen denen des wildtypischen TRPV1. Bei Messungen des  $Ca^{2+}$ - und  $Mn^{2+}$ -Einstroms Fura 2-geladener HEK293-Zellen konnten TRPV2-YFP und TRPV3-YFP durch Temperaturen oberhalb von 52°C bzw. 37°C aktiviert werden. TRPV4-YFP reagierte auf 4 $\alpha$ -Phorbol-12, 13-didecanoat und hypertone extrazelluläre Lösungen sowohl mit einer signifikanten Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  als auch mit einem deutlichen  $Mn^{2+}$ -Einstrom. In elektrophysiologischen Messungen im Gesamtzell-Modus zeigten TRPV5-YFP und TRPV6-YFP einen konstitutiven  $Ca^{2+}$ -Einstrom, dessen Strom-Spannungskennlinien sich nicht von denen der Wildtyp-Kanäle unterschieden. Weiterhin konnten TRPV5-YFP und TRPV6-YFP wie die Wildtyp-Kanäle durch  $La^{3+}$  und Rutheniumrot blockiert werden.

#### ***4.3.1. Subzelluläre Lokalisation von TRPV-Kanälen in HEK293-Zellen***

Zunächst wurde mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie die Expression und subzelluläre Lokalisation der einzelnen fluoreszierenden TRPV-Fusionsproteine in HEK293-Zellen bestimmt (siehe Abb. 18). Hier war zu erkennen, dass bei TRPV1 noch ein erheblicher Anteil des Proteins im endoplasmatischen Retikulum vorlag, jedoch war auch eine geringe Färbung der Plasmamembran zu erkennen. Im Gegensatz dazu zeigten TRPV2 und TRPV3 eine vorwiegend



**Abbildung 18: Expression und subzelluläre Lokalisation von heterolog exprimierten TRPV-Kanälen**

Die Kanaluntereinheiten von TRPV1-TRPV6 wurden C-terminal mit YFP fusioniert und transient in HEK293-Zellen zur Expression gebracht. Die Lokalisation der fluoreszierenden TRPV-Kanaluntereinheiten wurde 18-24 h nach Transfektion mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop bestimmt. Das Pinhole wurde so eingestellt, dass optische Schnitte von 0,6 µm Dicke erreicht wurden. Dargestellt sind jeweils repräsentative Expressionsmuster der unterschiedlichen YFP-markierten TRPV-Kanäle aus 3-5 unabhängigen Transfektionen. Die Länge der weißen Balken entspricht 10 µm.

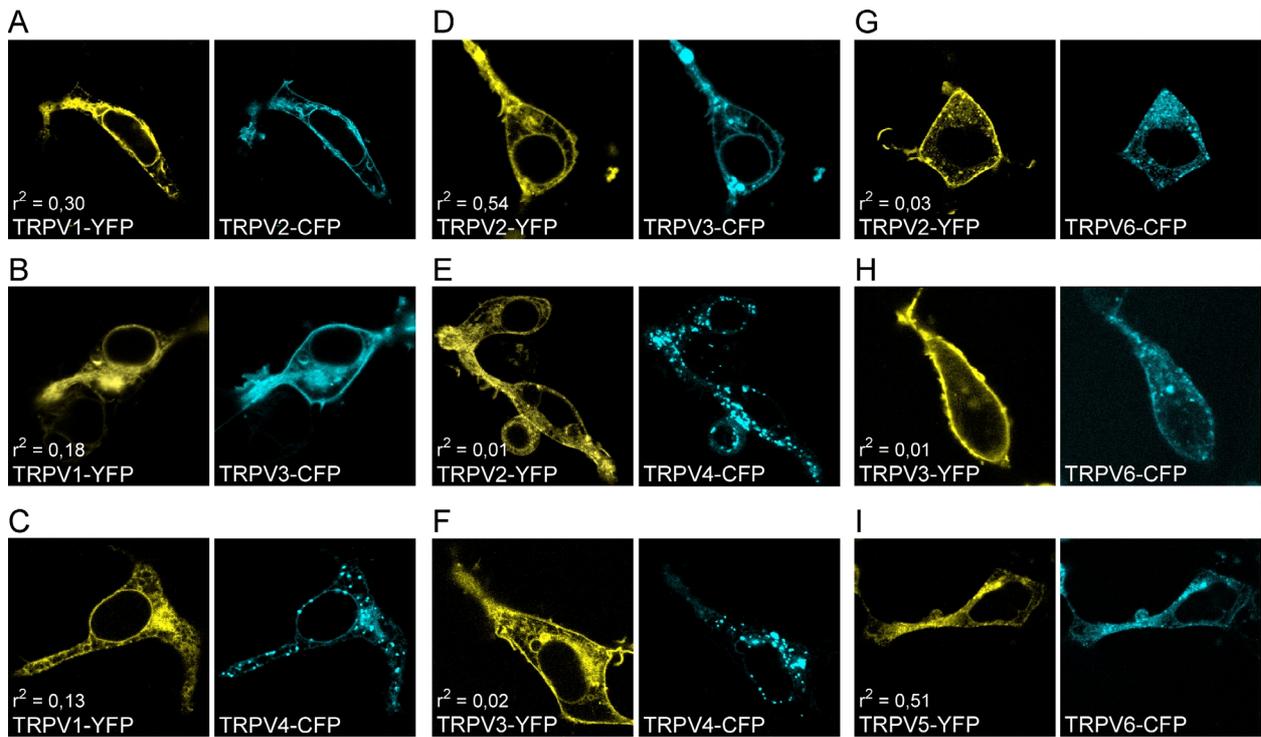
in der Plasmamembran vorliegende homogene Verteilung. Der Anteil des im endoplasmatischen Retikulum retinierten TRPV2 und TRPV3 war sowohl von der Expressionshöhe als auch von der Zeitspanne zwischen Transfektion und Fluoreszenzdetektion abhängig. Für TRPV4 war eine Cluster-artige Anordnung sowohl im endoplasmatischen Retikulum als auch in der

Plasmamembran zu erkennen. TRPV5 und TRPV6 lagen hauptsächlich in intrazellulären und vesikulären Strukturen vor. Auch bei der höchstmöglichen Auflösung konnte keine signifikante Fluoreszenz über der Plasmamembran detektiert werden. Es wäre möglich, dass für das Überleben der Zelle eine effektive Internalisierung der Kanäle von der Plasmamembran in endosomale Strukturen notwendig ist, da die heterolog exprimierten fluoreszierenden Kanaluntereinheiten TRPV5 und TRPV6 sowie die entsprechenden Wildtyp-Kanäle konstitutiv aktiv und hoch  $\text{Ca}^{2+}$ -selektiv sind.

#### ***4.3.2. Subzelluläre Lokalisation von koexprimierten TRPV-Kanaluntereinheiten***

Da die heterolog exprimierten TRPV-Kanäle unterschiedliche subzelluläre Lokalisationsmuster auswiesen, wurden die TRPV-Kanäle als YFP- bzw. CFP-Fusionsproteine in HEK293-Zellen koexprimiert, um so einen ersten Hinweis für eine mögliche Ausbildung heteromerer Kanalkomplexe zu erhalten. Bei einer Kolokalisation unterschiedlicher TRPV-Kanäle wäre eine Heteromultimerisierung möglich. Umgekehrt kann jedoch bei differentieller Lokalisation eine Heteromultimerisierung ausgeschlossen werden. Nach jedem Expressionsexperiment wurde der Korrelationskoeffizient  $r^2$  zwischen den CFP- und YFP-Fluoreszenzen bestimmt, um ein Maß für die Kolokalisation der fluoreszierenden TRPV-Kanaluntereinheiten zu erhalten (siehe unter 3.5.b). Ein Korrelationskoeffizient  $r^2$  von 0,4-1,0 weist auf eine sehr gute Kolokalisation der unterschiedlichen Proteine hin. Eine partielle Übereinstimmung der Proteinverteilungsmuster liegt bei  $r^2 = 0,1-0,4$  vor. Bei einem Korrelationskoeffizient  $r^2$  von 0-0,1 kann von einer überwiegend unterschiedlichen Lokalisation der Kanaluntereinheiten ausgegangen werden.

Bei Koexpression von TRPV1 und TRPV2 zeigte sich ein weitgehend übereinstimmendes Verteilungsmuster beider Proteine in der Plasmamembran und im endoplasmatischen Retikulum mit einem Korrelationskoeffizient  $r^2$  von 0,3 (Abb. 19A). Eine deutliche Kolokalisation war auch bei Koexpression von TRPV2 und TRPV3 zu erkennen ( $r^2 = 0,54$ ; Abb. 19D), wobei zu beachten ist, dass beide TRPV-Kanaluntereinheiten auch bei alleiniger Expression vorwiegend in der Plasmamembran vorlagen (siehe Abb. 18B und C). Weiterhin waren auch nach Kotransfektion von TRPV5 und seinem phylogenetisch nächsten Verwandten TRPV6 eine übereinstimmende Lokalisation der Proteine in vesikulären intrazellulären Strukturen zu sehen ( $r^2 = 0,51$ ; Abb. 19I). Bei einem Großteil der übrigen Kombinationen wie z.B. nach Kotransfektion von TRPV1 und



**Abbildung 19: Subzelluläre Lokalisation koexprimierter TRPV-Kanaluntereinheiten**

Jeweils eine CFP- und eine YFP-markierte TRPV-Kanaluntereinheit wurden transient in HEK293-Zellen koexprimiert und deren Verteilung in der selben Zelle mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie aufgezeichnet. Für jedes Koexpressionsexperiment wurden die CFP- und YFP-Fluoreszenzintensitäten für jeden Pixel im CFP- und YFP-Kanal bestimmt und daraus der Korrelationskoeffizient  $r^2$  als Maß für die Kollokalisierung der unterschiedlichen TRPV-Kanaluntereinheiten berechnet. Die Bilder sind repräsentativ für jeweils 3 unabhängige Transfektionen.

TRPV3 (Abb. 19B), TRPV2 und TRPV4 (Abb. 19E), TRPV3 und TRPV4 (Abb. 19F) oder TRPV3 und TRPV5 bzw. TRPV6 (Abb. 19H) war hingegen eine differentielle Anordnung der jeweiligen Proteine zu erkennen. Die TRPV-Kanaluntereinheiten behielten ihre unterschiedlichen subzellulären Lokalisationen. Bei Koexpression von TRPV1 und TRPV4 sowie von TRPV2 und TRPV5 bzw. TRPV6 lagen die Proteine in einigen Zellen kollokalisiert vor, überwiegend zeigten sich jedoch unterschiedliche Verteilungsmuster.

Die Daten aller kombinatorischen Koexpressionen von unterschiedlichen TRPV-Kanaluntereinheiten sind in der Tabelle 2 zusammengefasst. Die unterschiedlichen Lokalisationen, die bei vielen Kombinationen beobachtet werden konnten, deuten auf eine eingeschränkte Möglichkeit der Heteromultimerisierung innerhalb der TRPV-Familie.

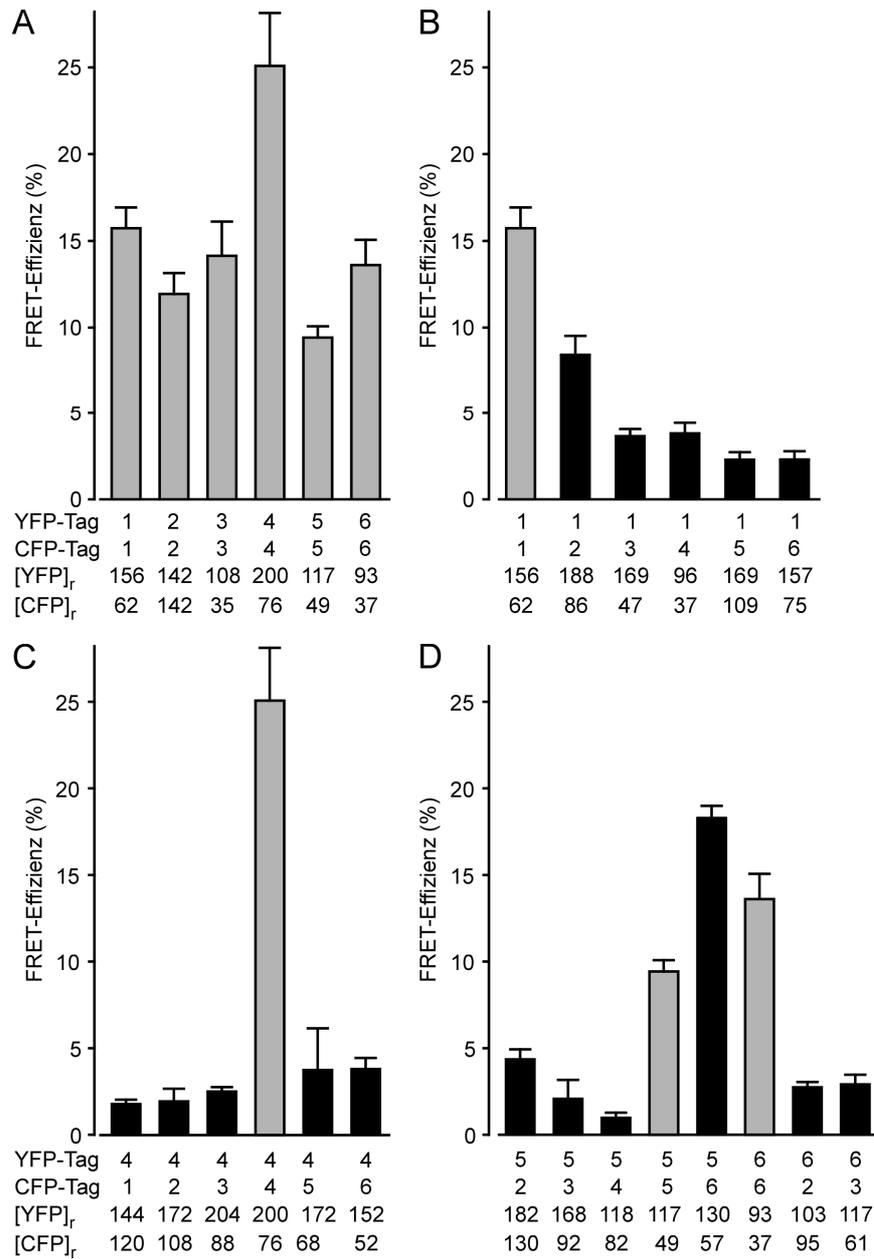
	TRPV1	TRPV2	TRPV3	TRPV4	TRPV5
TRPV2	0,31 ± 0,03				
TRPV3	0,13 ± 0,03	0,45 ± 0,02			
TRPV4	0,12 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01		
TRPV5	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,01	
TRPV6	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,52 ± 0,02

**Tabelle 2: Quantitative Analyse der subzellulären Lokalisation koexprimierter TRPV-Kanaluntereinheiten**

YFP- oder CFP-markierte TRPV-Kanaluntereinheiten wurden in HEK293-Zellen koexprimiert, und deren Verteilungsmuster mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie aufgezeichnet. Nach Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten für jeden Pixel im CFP- und YFP-Kanal wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient ermittelt. Der hier dargestellte Korrelationskoeffizient  $r^2$  ist das Quadrat des Pearson-Korrelationskoeffizienten und beschreibt die Kolo-kalisation der koexprimierten TRPV-Kanaluntereinheiten. Bei  $r^2 = 0,4-1,0$  besteht eine sehr gute, bei  $r^2 = 0,1-0,4$  eine nur partielle Kolo-kalisation der unterschiedlichen Proteine. Bei  $r^2 = 0-0,1$  liegt eine überwiegend unterschiedliche Lokalisation der verschiedenen TRPV-Kanaluntereinheiten vor. Diese Daten repräsentieren den aus 5-15 Zellen berechneten Mittelwert  $\pm$  SEM von jeweils 2-4 unabhängigen an unterschiedlichen Tagen durchgeführten Transfektionsexperimenten.

#### ***4.3.3. Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) zwischen TRPV-Kanaluntereinheiten***

Zum Nachweis einer direkten Interaktion zwischen TRPV-Kanaluntereinheiten führten wir FRET-Analysen durch. Die YFP- bzw. CFP-fusionierten TRPV1- bis TRPV6-Kanaluntereinheiten wurden in HEK293-Zellen transient im molaren Verhältnis von 2:1 bis 4:1 koexprimiert, um die Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung rein CFP-markierter TRPV-Kanalkomplexe gering zu halten. Nach 24 Stunden wurde die FRET-Effizienz durch Bestimmung der Intensitätszunahme des Donorfluorochroms während des Ausbleichens des Akzeptors ermittelt. Alle TRPV-Homomultimere zeigten einen signifikanten FRET mit Effizienzen zwischen 9,5-25 % als Zeichen einer intakten Homomultimerisierung (Abb. 20A). Bei Koexpression verschiedener fluoreszierender TRPV-Kanaluntereinheiten stellte sich heraus, dass TRPV1 nur mit TRPV2 signifikante FRET-Signale von 8,4 %  $\pm$  0,4 % erreichte (Abb. 20B). Dabei ist zu beachten, dass die FRET-Effizienz zwischen TRPV1 und TRPV2 deutlich unter den ermittelten Werten der entsprechenden homomultimeren Interaktionen mit 15,8 %  $\pm$  0,4 % für TRPV1 und 12,0 %  $\pm$  0,5 % für TRPV2 lagen. Mit anderen Vertretern der TRPV-Familie erzielte TRPV1 lediglich FRET-Effizienzen zwischen 2,3 % und 3,8 %. In kombinatorischen Koexpres-



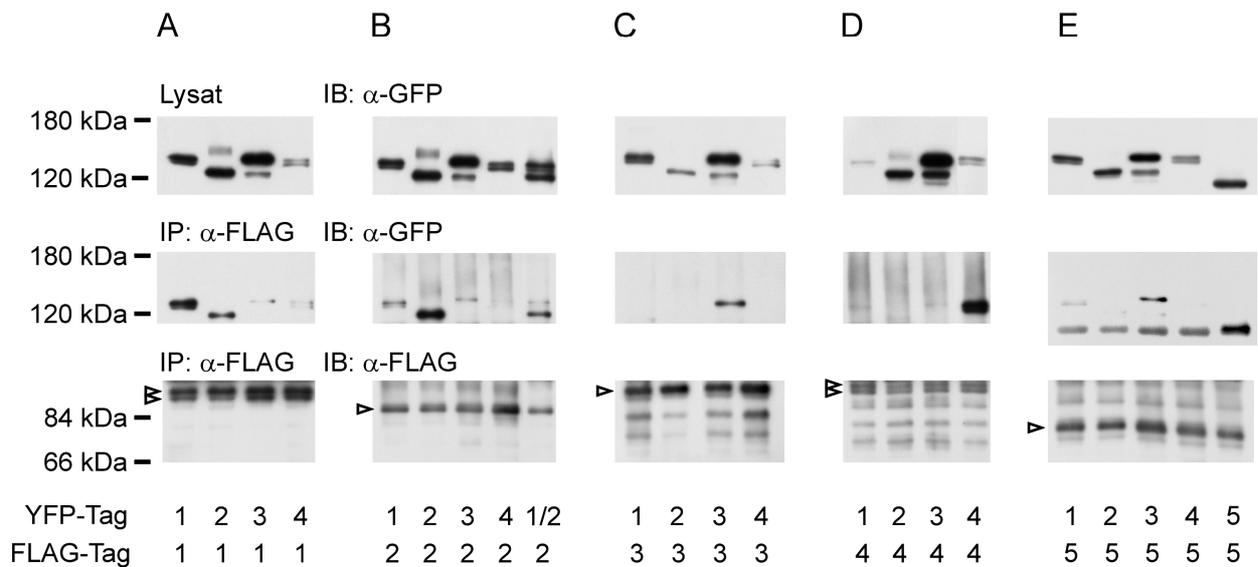
**Abbildung 20: FRET-Bestimmungen zwischen TRPV-Kanaluntereinheiten**

HEK293-Zellen wurden transient mit Expressionsplasmiden kotransfiziert, die für CFP- oder YFP-fusionierte (CFP- oder YFP-Tag) TRPV-Kanaluntereinheiten kodieren. **(A)** FRET-Messungen zwischen gleichen TRPV-Kanaluntereinheiten (Homomultimeren). **(B-D)** Für die Bestimmung der FRET-Effizienzen zwischen unterschiedlichen TRPV-Kanaluntereinheiten wurde die mit dem Akzeptor fusionierte Kanaluntereinheit (YFP-Tag) konstant gehalten und die mit dem Donor fusionierte Kanaluntereinheit (CFP-Tag) permutiert. Um bei jeder Kombination vergleichbare Expressionen der TRPV-Kanaluntereinheiten zu gewährleisten, wurden die relativen CFP- und YFP-Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Zellen bestimmt und gemittelt ( $[CFP]_r$  und  $[YFP]_r$ ). Die FRET-Effizienzen wurde über das Akzeptor-Bleichverfahren bestimmt (siehe Material und Methoden 3.4.4.a). Mit grauen Balken sind die FRET-Effizienzen bei Koexpression gleicher Kanaluntereinheiten gekennzeichnet. Die schwarzen Balken zeigen die FRET-Effizienzen bei Koexpression von unterschiedlichen TRPV-Kanaluntereinheiten. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (SEM) von jeweils mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

sionsexperimenten mit TRPV4-YFP als FRET-Akzeptor konnte nur für die homomultimere Konformation eine hohe FRET-Effizienz von  $25,0 \% \pm 1,5 \%$  nachgewiesen werden (Abb. 20C). TRPV5 erreichte nach Kotransfektion mit anderen TRPV-Kanaluntereinheiten nur mit TRPV6 signifikante FRET-Effizienzen von  $18,3 \% \pm 0,4 \%$ , die sogar über den FRET-Signalen der entsprechenden Homomultimeren lagen (Abb. 20D). Bei den übrigen kombinatorischen Expressionen lagen die FRET-Effizienzen nur zwischen  $1 \%$  und  $4,4 \%$ . Die Befunde der FRET-Bestimmungen weisen auf eine Interaktion zwischen TRPV1 und 2 und eine deutliche Heteromultimerisierung zwischen TRPV5 und 6 hin, wie sie bereits von Joost Hoenderop und Mitarbeitern (2003) durch Koimmunpräzipitation gezeigt wurde.

#### ***4.3.4. Koimmunpräzipitation von TRPV-Kanaluntereinheiten***

Um aufzuklären, ob bei den Kombinatoriken mit niedrigen FRET-Effizienzen tatsächlich keine direkten Interaktionen zwischen den TRPV-Kanaluntereinheiten vorlagen, oder ob nur die sterischen bzw. räumlichen Bedingungen zwischen den Fluorochromen für die Ausbildung von FRET nicht optimal waren, führten wir zusätzlich Koimmunpräzipitations-Experimente durch. TRPV-Kanaluntereinheiten wurden hierfür C-terminal mit einem FLAG-Epitop fusioniert und in HEK293-Zellen zusammen mit YFP-markierten TRPV-Kanaluntereinheiten in unterschiedlichen Kombinationen zur Expression gebracht. Nach Membranpräparation und Solubilisierung wurde mit einem anti-FLAG-Antikörper immunpräzipitiert. Mittels Immunoblot wurden die TRPV-Kanaluntereinheiten im Membranlysate bzw. nach Immunpräzipitation über das FLAG-Epitop bzw. die YFP-Markierung nachgewiesen. Für alle homomultimeren Kombinationen konnte eine deutliche Koimmunpräzipitation gezeigt werden (Abb. 21). Bei Koexpression von TRPV1 und TRPV2 war eine im Vergleich zu den homomultimeren Konfigurationen deutlich schwächere Immunpräzipitation zu detektieren (Abb. 21A und B). Die verschiedenen relativen Molekulargewichte von TRPV1 (95 kDa) und TRPV2 (86 kDa) führten zu sichtbar unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten im SDS-Gel. Somit war es möglich, die beiden Proteine nach Elektrophorese in einem 8 % SDS-Polyacrylamidgel voneinander zu unterscheiden und die Frage zu untersuchen, ob zwischen den homo- und heterooligomeren Interaktionen von TRPV1 und TRPV2 vergleichbare Affinitäten herrschen. Hierfür wurden TRPV1 und TRPV2 zu gleichen Teilen in einem Koimmunpräzipitations-Experiment mit TRPV2-FLAG als Interak-



**Abbildung 21: Koimmunpräzipitation von TRPV-Untereinheiten**

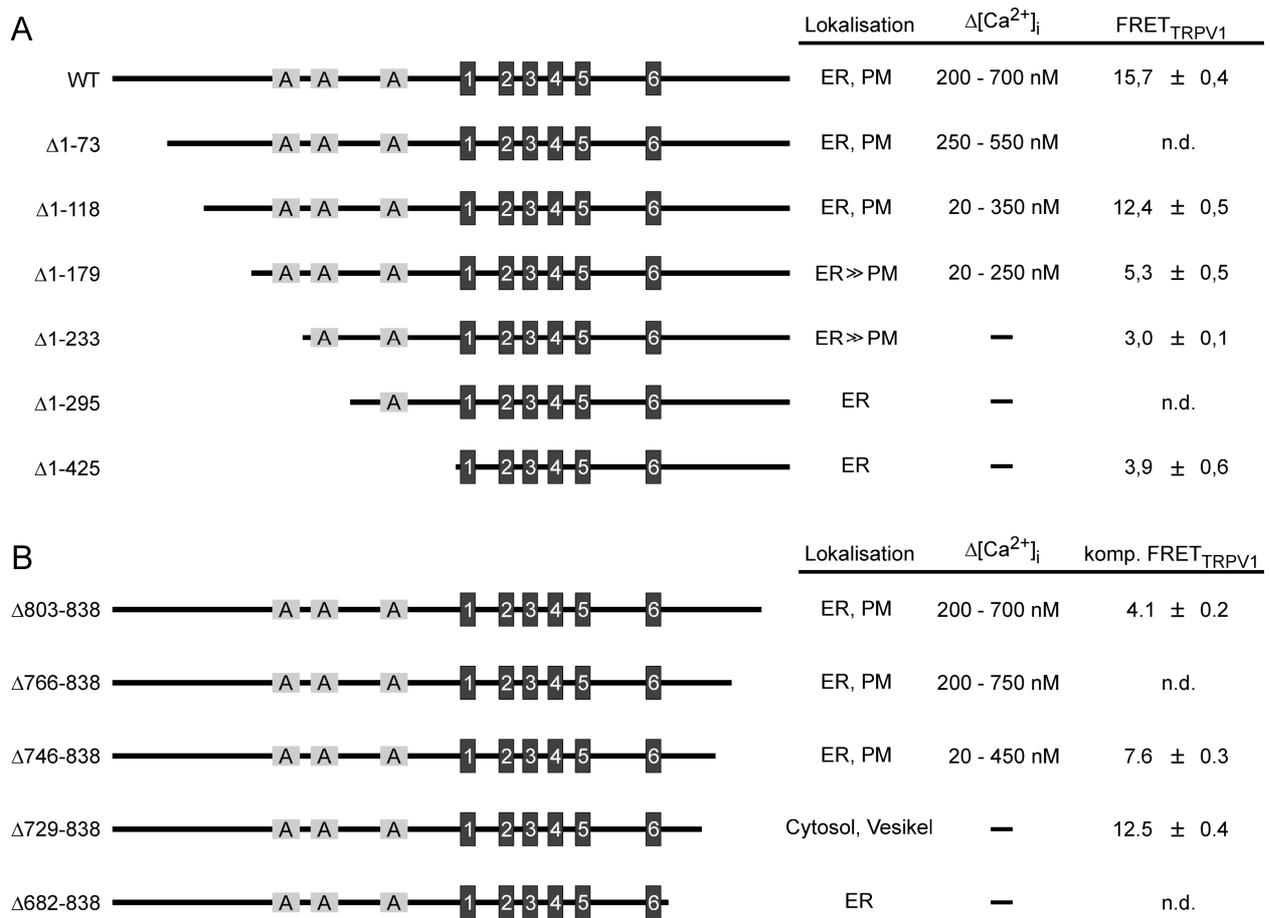
FLAG- oder YFP-markierte TRPV-Kanaluntereinheiten wurden wie angezeigt in unterschiedlichen Kombinationen in HEK293-Zellen koexprimiert. Einen Tag nach Transfektion wurden Zellmembranen präpariert, solubilisiert und die Lysate mit FLAG-Antikörpern ( $\alpha$ -FLAG) und Protein A-Sepharose immunpräzipitiert (IP). TRPV-Kanaluntereinheiten in Membranlysaten (obere Abbildungen) und Immunpräzipitaten (mittlere und untere Abbildungen) wurden über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Obere und mittlere Abbildungen: YFP-fusionierte TRPV-Kanaluntereinheiten in Membranlysaten und im Koimmunpräzipitat wurden durch anti-GFP-Immunblot (IB:  $\alpha$ -GFP) nachgewiesen. Die Ausbeute FLAG-markierter TRPV-Kanaluntereinheiten im Immunpräzipitat ist in den unteren abgebildeten Immunblots mittels FLAG-Antikörpern (IB:  $\alpha$ -FLAG) gezeigt. Die Pfeile weisen auf die erwarteten relativen Molekulargewichte der jeweiligen FLAG-markierten TRPV-Kanaluntereinheiten.

tionspartner angeboten (Abb. 21B). Beide TRPV-Kanaluntereinheiten zeigten sich im Immunpräzipitat, wobei jedoch das TRPV2-Homomultimer deutlich bevorzugt vorlag. Weiterhin waren noch für weitere Kombinatoriken schwache Interaktionen zu erkennen, wobei es sich hier um starke Proteinanreicherungen im Immunpräzipitat handelte (Abb. 21A, B und E). Bei Koexpressions-Experimenten mit TRPV3-FLAG und TRPV4-FLAG konnten jedoch keine heteromeren Interaktionen nachgewiesen werden, hier lagen ausschließlich die homomeren Kombinationen vor (Abb. 21C und D). Diese Koimmunpräzipitationsdaten zeigen in guter Übereinstimmung mit den zuvor dargestellten FRET- und Kollokalisations-Analysen, dass innerhalb der TRPV1-TRPV4-Subfamilie neben der Ausbildung von Homomultrimeren nur noch eine Interaktion zwischen TRPV1 und TRPV2 stattfindet.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass innerhalb der TRPV-Familie vorwiegend die Ausbildung von Homomultimeren bevorzugt wird und trotz phylogenetisch enger Verwandtschaft eine erstaunlich eingeschränkte Fähigkeit zur Heteromultimerisierung vorliegt. Heteromultimere konnten nur für TRPV5/TRPV6, sowie eine Interaktion TRPV1/TRPV2 nachgewiesen werden. Für die betreffenden Proteine konnte sowohl ein übereinstimmendes Verteilungsmuster beider TRPV-Kanaluntereinheiten als auch signifikante FRET-Effizienzen gezeigt werden. Weiterhin wurden diese Daten durch die Koimmunpräzipitations-Experimente unterstützt.

#### ***4.3.5. Funktion und Interaktion N- oder C-terminal trunkierter TRPV1-Konstrukte***

Nach den bisherigen Daten, die eine eingeschränkte heteromere Interaktionsfähigkeit innerhalb der TRPV-Familie zeigen, stellte sich die Frage, welche strukturellen Determinanten zu der Affinität und Selektivität der TRPV-Kanalkomplexbildung beitragen. Auf Grund früherer Arbeiten, die eine Assoziation von Untereinheiten anderer hexahelikaler Kationenkanäle wie CNG-, HCN- und spannungsgesteuerter Kaliumkanäle über deren cytosolische N- oder C-Termini beschreiben (Li et al., 1994; Liu et al., 1996; Kreusch et al., 1998; Tu et al., 1996; Zhong et al., 2002), trunkierten wir TRPV1 an verschiedenen N- und C-terminalen Positionen (siehe Abb. 22) und fusionierten ihn an den entsprechenden nativen Termini mit CFP oder YFP. Die trunkierten TRPV1-Konstrukte wurden dann auf ihre Lokalisation, Funktion und Fähigkeit zur Interaktion mit dem ungekürzten TRPV1 in HEK293-Zellen mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie, Fura 2-Messungen und FRET untersucht. Die Trunkierung des N-Terminus um 73 Aminosäuren hatte keinen Einfluß auf die Lokalisation und Funktion von TRPV1 (Abb. 22A). TRPV1-Mutanten, denen die ersten 118 oder 179 Aminosäuren fehlten, bildeten noch funktionelle Kanäle, die Capsaicin-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege fielen jedoch im Vergleich zum ungekürzten TRPV1 deutlich schwächer aus (Abb. 22A). Ebenso nahmen auch die FRET-Effizienzen zwischen den CFP-markierten trunkierten TRPV1-Konstrukten und dem YFP-markierten ungekürzten TRPV1 schrittweise ab. Ab einer Kürzung des N-Terminus von TRPV1 um die ersten 233 Aminosäuren konnte sowohl ein Funktionsverlust als auch eine geringere plasmamembranäre Lokalisation der Mutanten beobachtet werden (Abb. 22A). Bei Koexpression der CFP-markierten TRPV1 $_{\Delta 1-233}$ - oder TRPV $_{\Delta 1-425}$ -Mutante mit TRPV1-YFP



**Abbildung 22: Funktion und Assemblierungsfähigkeit N- und C-terminale trunkierter TRPV1-Kanaluntereinheiten**

Schematische Darstellung der N-terminal (**A**) oder C-terminal (**B**) verkürzten TRPV-Kanaluntereinheiten mit den 3 Ankyrin-ähnlichen Motiven (mit „A“ gekennzeichnet) und den 6 putativen Transmembransegmenten (S1 bis S6). Die Abkürzung „WT“ bezeichnet den wildtypischen TRPV1-Kanal. Die jeweils entfernten Aminosäuren sind an der linken Seite angegeben. Die Tabelle enthält eine Aufstellung folgender Daten: die über konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie nachgewiesene Lokalisation der fluoreszenzmarkierten TRPV1-Mutanten (PM = Plasmamembran, ER = Endoplasmatisches Retikulum), die Capsaicin-induzierten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstiege ( $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) und FRET-Effizienzen zwischen TRPV1-Mutanten und wildtypischem TRPV1 (**A**) oder FRET-Effizienzen von Konkurrenzexperimenten mit CFP- und YFP-markiertem TRPV1 und den jeweiligen nicht-markierten TRPV1-Mutanten (**B**).

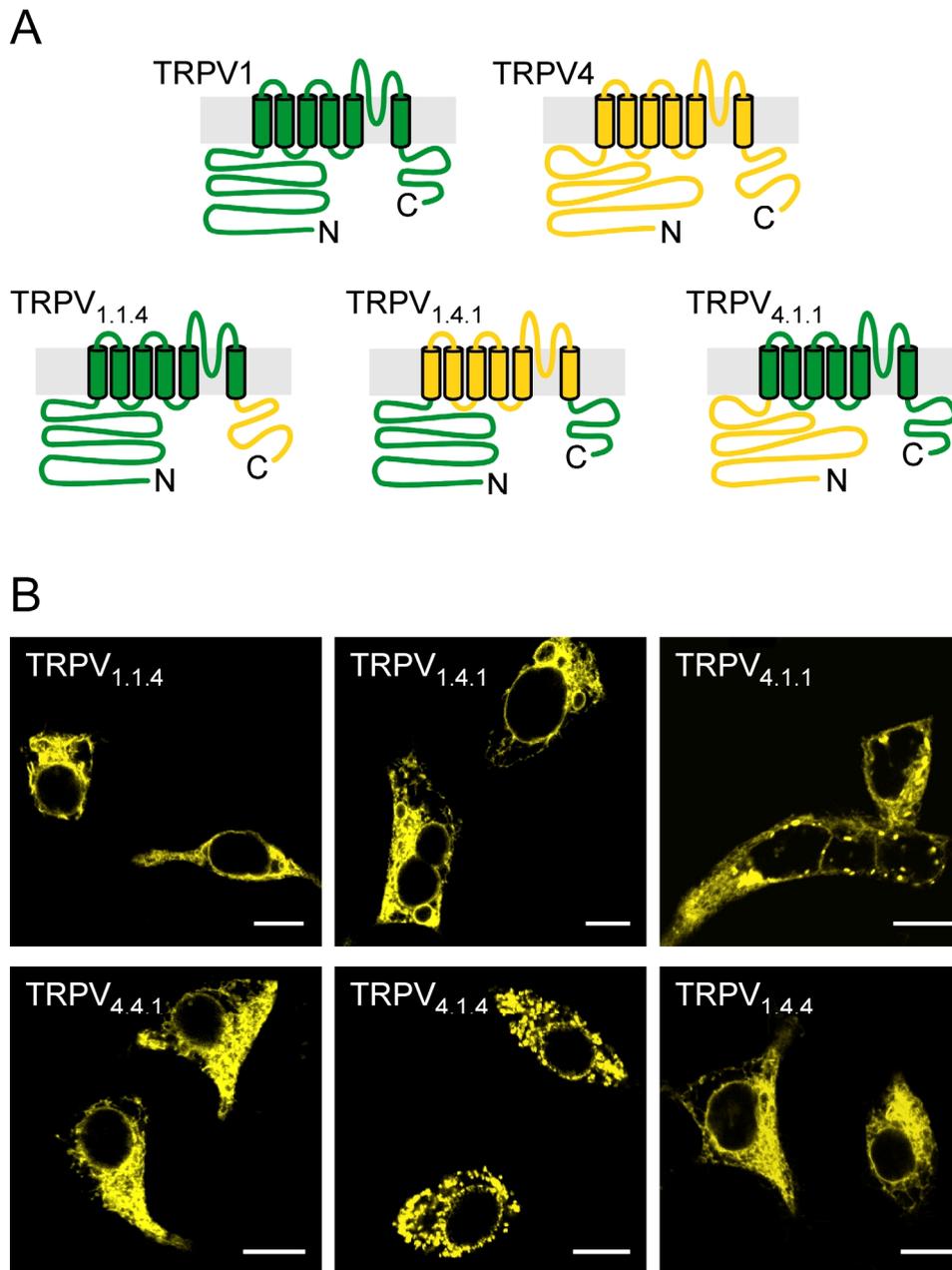
wurden nur schwache FRET-Signale erreicht, was entweder auf den Verlust der Assemblierungsfähigkeit oder auf eine Proteinstabilisierung bzw. falsche Faltung der gekürzten TRPV-Konstrukte hindeutet (Abb. 22A).

Die schrittweise Verkürzung des C-Terminus von TRPV1 führte zu ähnlichen Effekten. Auch die Trunkierung des C-Terminus um 73 Aminosäuren hatte keinen Einfluß auf die Lokalisation und Capsaicin-induzierte Kanalaktivierung, während die Capsaicin-induzierten  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege nach Beseitigung der letzten 93 oder 110 Aminosäuren von TRPV1 teilweise oder ganz aufgehoben

waren (Abb. 22B). Die Fluoreszenz eines YFP-TRPV1 $_{\Delta 729-839}$  lag in intrazellulären Vesikeln und im Cytosol vor, was auf eine proteolytische Spaltung hinweist (Abb. 22B). Das unmarkierte TRPV1 $_{\Delta 729-839}$ -Konstrukt war nicht in der Lage in kompetitiven FRET-Messungen mit CFP- und YFP-markiertem ungekürztem TRPV1 die Assemblierung der ungekürzten TRPV1-Kanaluntereinheiten zu unterbinden. Capsaicin-induzierte  $[Ca^{2+}]_i$ -Signale konnten auch bei der um den gesamten C-Terminus gekürzten TRPV1-Mutante TRPV $_{\Delta 692-838}$  nicht beobachtet werden, jedoch lag TRPV $_{\Delta 692-838}$  im Gegensatz zu der um 37 Aminosäuren längeren Mutante TRPV1 $_{\Delta 729-839}$  homogen im endoplasmatischen Retikulum vor (Abb. 22B). Beide cytosolischen Termini scheinen sowohl für die Funktion als auch die strukturelle Integrität von TRPV1 notwendig zu sein. Durch die terminalen Trunkierungen von TRPV1 könnten jedoch sowohl die Faltung und Stabilisierung innerhalb einer TRPV1-Kanaluntereinheit als auch die Interaktion zwischen unterschiedlichen TRPV1-Kanaluntereinheiten gestört werden. Somit ist eine Schlussfolgerung auf mögliche Multimerisierungs-Determinanten in den Termini von TRPV1 mittels dieser Daten noch nicht möglich.

#### ***4.3.6. Rolle der cytosolischen Termini und transmembranären Domänen bei der Assemblierung von TRPV-Kanaluntereinheiten***

Um die Beteiligung der cytosolischen N- oder C-Termini als auch der Transmembransegmente an der Assemblierung von TRPV-Kanaluntereinheiten weiter untersuchen zu können, generierten wir eine Reihe von chimären TRPV-Kanaluntereinheiten. Hierfür suchten wir uns die sehr schwach miteinander interagierenden TRPV1- und TRPV4-Untereinheiten aus, und setzten die Chimären aus den cytosolischen und transmembranären Bereichen beider Kanäle in allen möglichen Permutationen zusammen. Drei Chimären sind zur Erläuterung der Nomenklatur in der Abbildung 23 dargestellt. Bei der TRPV $_{1.4.1}$ -Chimäre z.B. sind der N- und C-Terminus von TRPV1 mit den transmembranären Segmenten von TRPV4 fusioniert worden. Diese Konstrukte wurden zur Prüfung der Expression und Lokalisation als auch für anschließende FRET-Experimente C-terminal mit CFP oder YFP fusioniert. Die Chimären TRPV $_{1.1.4}$ , TRPV $_{1.4.1}$ , TRPV $_{4.4.1}$  und TRPV $_{1.4.4}$  zeigten eine vorwiegend im endoplasmatischen Retikulum vorliegende, homoge Verteilung, wie sie auch für TRPV1 charakteristisch war (Abb. 23B). Bei TRPV $_{4.1.4}$  war eine wie auch bei TRPV4 beobachtete Cluster-artige Anordnung zu erkennen (Abb. 23B).

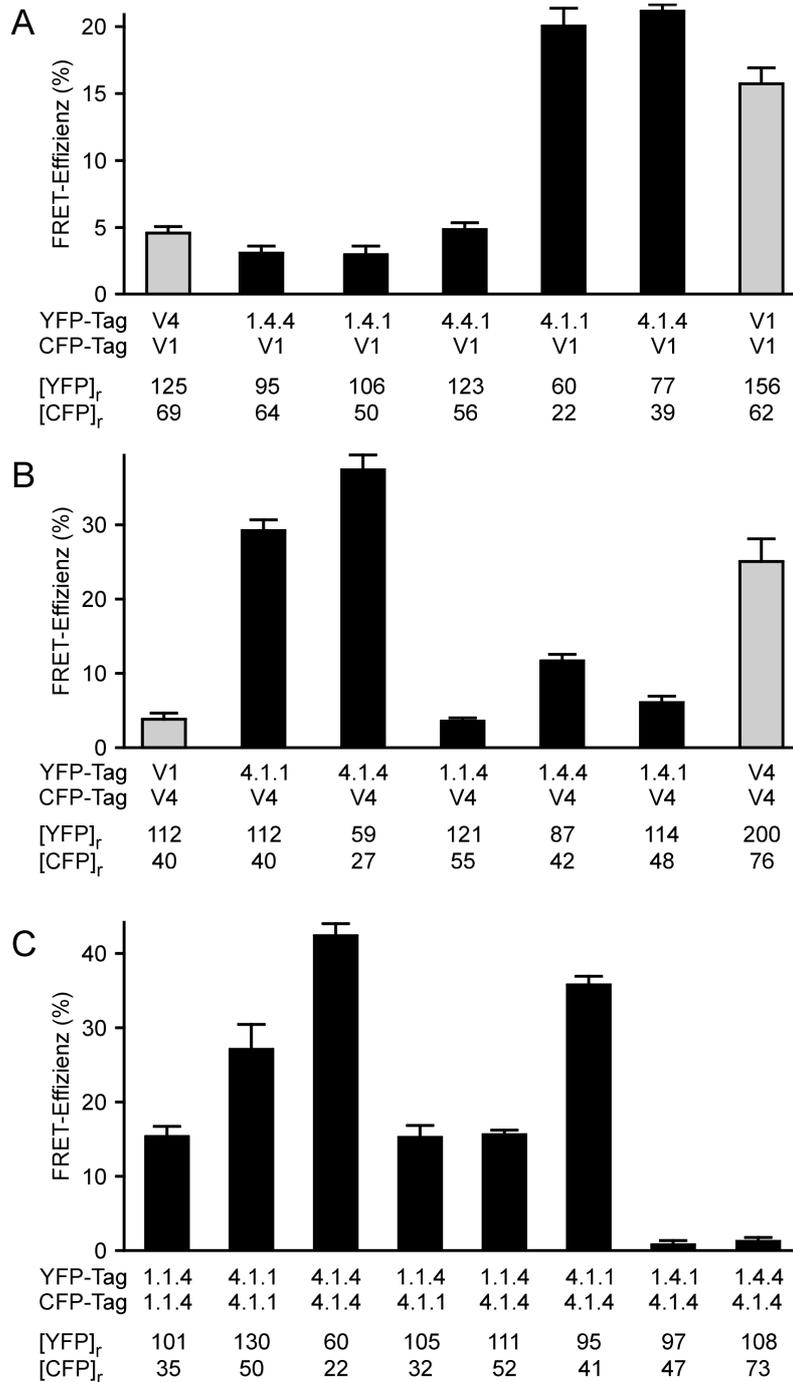


**Abbildung 23: Schematische Darstellung und subzelluläre Lokalisation chimärer TRPV-Kanaluntereinheiten**

(A) TRPV-Chimären wurden aus cytosolischen N-Termini, den Transmembransegmenten und cytosolischen C-Termini von TRPV1 (grün) und TRPV4 (gelb) mittels PCR und „in-frame“-Ligation konstruiert. (B) Die Expression und subzelluläre Lokalisation der chimären TRPV-Konstrukte in HEK293-Zellen wurde einen Tag nach Transfektion mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie aufgezeichnet. Die Länge der weißen Balken entspricht 10 µm.

TRPV<sub>4.1.1</sub> hingegen lag sowohl homogen als auch in Clustern vor (Abb. 23B).

Zu unserer Überraschung zeigten die meisten Konstrukte untereinander und bei einer Koexpression mit TRPV1 deutliche FRET-Signale (Abb. 24A und C). In der Annahme, dass die cytosolischen Termini die Assemblierung von TRPV-Kanaluntereinheiten kontrollieren, hatten



**Abbildung 24: Interaktionsfähigkeit chimärer TRPV-Kanaluntereinheiten**

HEK293-Zellen wurden transient mit Expressionsplasmiden kotransfiziert, die für CFP- oder YFP-markierte (CFP- oder YFP-Tag) TRPV1- und TRPV4-Kanaluntereinheiten (V1 und V4) oder TRPV1/4-Chimären kodieren. Die Bestimmung der FRET-Effizienz erfolgte wie bei Abbildung 3 und Abbildung 20 beschrieben nach dem Akzeptor-Bleichverfahren. Die FRET-Effizienzen bei Koexpression nicht-chimärer TRPV-Kanaluntereinheiten sind zur besseren Vergleichbarkeit mit grauen Balken dargestellt worden. (**A** und **B**) FRET-Messungen mit CFP-fusioniertem TRPV1 (A) oder TRPV4 (B) und YFP-fusionierten TRPV1/4-Chimären. (**C**) FRET-Messungen zwischen unterschiedlichen fluoreszierenden TRPV-Chimären. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (SEM) von 19-82 Zellen in 3-15 Bleichexperimenten. Die über alle Zellen gemittelten relativen CFP- und YFP-Fluoreszenzintensitäten ([CFP]<sub>r</sub> und [YFP]<sub>r</sub>) zeigen die relativen Expressionshöhen der jeweiligen TRPV-Konstrukte.

wir erwartet, dass u.a. die Interaktion zwischen TRPV<sub>4.1.4</sub> und TRPV1 gering ausfällt. Die N- oder C-Termini konnten jedoch nach Belieben durch jene von TRPV4 ausgetauscht werden, ohne dass dabei die Interaktionsfähigkeit mit TRPV1 verloren ging (Abb. 24A). Es wurden FRET-Effizienzen zwischen 15-20 % ermittelt. Daraus folgerten wir, dass bei TRPV1 der Bereich der Transmembransegmente einen wesentlichen Beitrag zur Kanalkomplexbildung leistet. Dies wurde u.a. dadurch bestätigt, dass bei Koexpression von TRPV1 und den Chimären TRPV<sub>1.4.4</sub> oder TRPV<sub>1.4.1</sub> keine signifikanten FRET-Effizienzen ermittelt werden konnten (Abb. 24A).

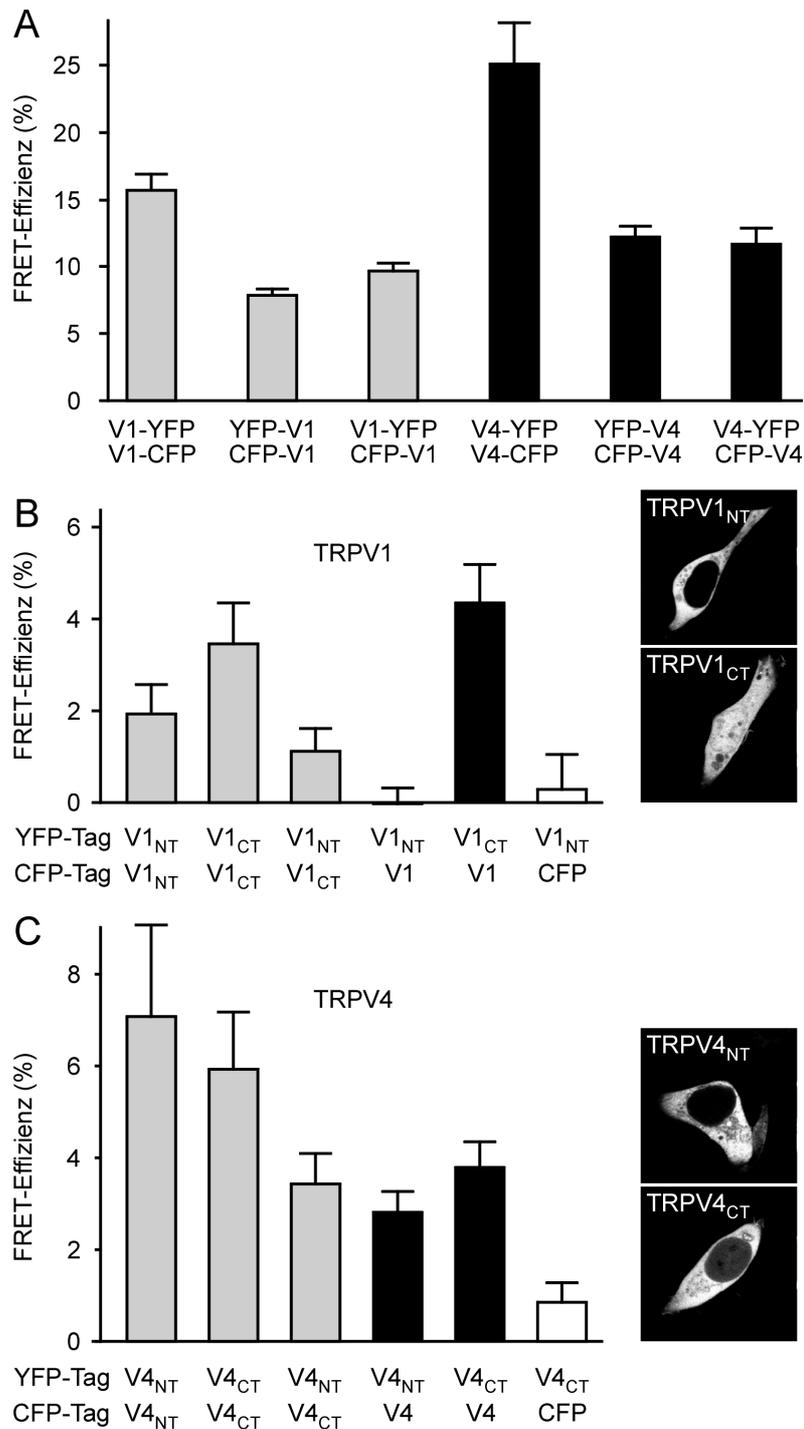
Bei TRPV4 schien hingegen nicht der transmembranäre Bereich sondern die cytosolischen Termini, insbesondere der N-Terminus entscheidend für die Assemblierung zu sein (Abb. 24B). Die selben TRPV<sub>4.1.1</sub>- und TRPV<sub>4.1.4</sub>-Konstrukte, die effizient mit TRPV1 interagierten, erreichten auch mit TRPV4 FRET-Effizienzen von  $29,3 \% \pm 1,4 \%$  und  $37,5 \% \pm 2,0 \%$  (Abb. 24B). Bei Koexpression von TRPV4 und Chimären, deren N-Terminus von TRPV1 stammten, konnten hingegen keine signifikanten oder im Vergleich zu TRPV4-Homomultimeren deutlich geringere FRET-Effizienzen ermittelt werden (Abb. 24B). Der entscheidende Beitrag bei der Interaktion der einzelnen TRPV-Kanaluntereinheiten kann demzufolge abhängig von der TRPV-Isoform entweder über die Transmembransegmente, im Falle von TRPV1, oder über die cytosolischen Termini bei TRPV4 erfolgen. Entsprechend dieser Vorstellung erreichte TRPV<sub>1.4.1</sub> mit TRPV<sub>4.1.4</sub> keine signifikanten FRET-Signale (Abb. 24C). Weiterhin konnten auch bei Koexpression von TRPV<sub>1.4.4</sub> und TRPV<sub>4.1.4</sub> keine signifikanten FRET-Effizienzen detektiert werden (Abb. 24C), was dafür spricht, dass die Assemblierung von TRPV4-Kanaluntereinheiten im wesentlichen über Interaktionsdomänen im N-Terminus gesteuert wird.

#### ***4.3.7. Interaktion zwischen cytosolischen TRPV1- und TRPV4-Termini***

Zur weiteren Prüfung der Hypothese, dass die cytosolischen Termini je nach TRPV-Isoform einen unterschiedlich hohen Beitrag zur Kanalassemblierung leisten, koexprimierten wir CFP- oder YFP-markierte cytosolische Termini von TRPV1 bzw. TRPV4 und untersuchten ihre Interaktion untereinander und mit den entsprechenden ungekürzten TRPV-Kanaluntereinheiten mittels FRET-Analysen. Die Fluoreszenzproteine wurden an die jeweiligen nativen Enden der N- oder C-Termini von TRPV1 und TRPV4 fusioniert. Die Lokalisation der fluoreszierenden

Termini wurde mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. Alle Termini zeigten eine homogene Verteilung im Cytosol, beim C-Terminus von TRPV1 (V1<sub>CT</sub>-YFP) war zusätzlich noch eine nukleäre Verteilung zu erkennen (Abb. 25B und C). Die koexprimierten N-terminal markierten TRPV1-Kanaluntereinheiten CFP-TRPV1 und YFP-TRPV1 als auch die an unterschiedlichen Enden markierten Kanaluntereinheiten TRPV1-YFP und CFP-TRPV1 erzielten FRET-Effizienzen von  $7,8 \% \pm 0,5 \%$  und  $9,7 \% \pm 0,6 \%$  (Mittelwert  $\pm$  SEM), was etwa der Hälfte der FRET-Signale zwischen den C-terminal markierten TRPV1-Kanaluntereinheiten TRPV1-YFP und TRPV1-CFP entspricht (Abb. 25A). Bei der Koexpression des YFP-markierten löslichen N-Terminus von TRPV1 (YFP-V1<sub>NT</sub>) mit dem CFP-markierten N- als auch C-Terminus von TRPV1 (CFP-V1<sub>NT</sub> oder V1<sub>CT</sub>-CFP) konnten lediglich FRET-Effizienzen von 2 % oder weniger ermittelt werden (Abb. 25B). Weiterhin konnten keine signifikanten FRET-Signale zwischen YFP-V1<sub>NT</sub> und der N-terminal mit CFP markierten TRPV1-Kanaluntereinheit CFP-TRPV1 nachgewiesen werden (Abb. 25B). Die koexprimierten CFP- oder YFP-fusionierten C-Termini von TRPV1 erzielten jedoch FRET-Effizienzen von  $3,5 \% \pm 0,9 \%$ , was auf eine Interaktion hinweisen könnte (Abb. 25B). Ebenso erreichte der C-Terminus von TRPV1 mit TRPV1-CFP FRET-Effizienzen von  $4,4 \% \pm 0,8 \%$ , was auf eine Interaktionsdeterminante im C-Terminus von TRPV1 hindeutet.

Sowohl bei der Koexpression unterschiedlich markierter N- als auch C-Termini von TRPV4 konnten signifikante FRET-Effizienzen von  $7,1 \% \pm 2,0 \%$  (zwischen V4<sub>NT</sub>-YFP und V4<sub>NT</sub>-CFP) und  $5,9 \% \pm 1,2 \%$  (zwischen YFP-V4<sub>CT</sub> und CFP-V4<sub>CT</sub>) ermittelt werden (Abb. 25C). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die FRET-Effizienzen zwischen den cytosolischen C-Termini von TRPV4 nur etwa einem Viertel der FRET-Signale entsprachen, die für die Interaktion zwischen den C-terminal markierten Kanaluntereinheiten TRPV4-YFP und TRPV4-CFP gemessen werden konnten ( $25,1 \% \pm 3,0 \%$ ; Abb. 25A). Die FRET-Effizienzen zwischen den cytosolischen N-Termini lagen jedoch etwas über der Hälfte der FRET-Signale, die für die N-terminal markierten Kanaluntereinheiten YFP-TRPV4 und CFP-TRPV4 detektiert wurden ( $12,2 \% \pm 0,9 \%$ ; Abb. 25A). Weiterhin konnten zwischen YFP-V4<sub>NT</sub> und CFP-TRPV4 FRET-Effizienzen von  $2,8 \% \pm 0,5 \%$  und zwischen V4<sub>CT</sub>-YFP und TRPV4-CFP von  $3,8 \% \pm 0,6 \%$  nachgewiesen werden. Diese Daten bestätigten die Hypothese, dass die Interaktion der TRPV4-Kanaluntereinheiten über Interaktionsdomänen in den cytosolischen Termini insbesondere dem



**Abbildung 25: Assemblierung N- und C-terminal markierter TRPV1- oder TRPV4-Kanaluntereinheiten sowie cytosolischer TRPV1- und TRPV4-Termini**

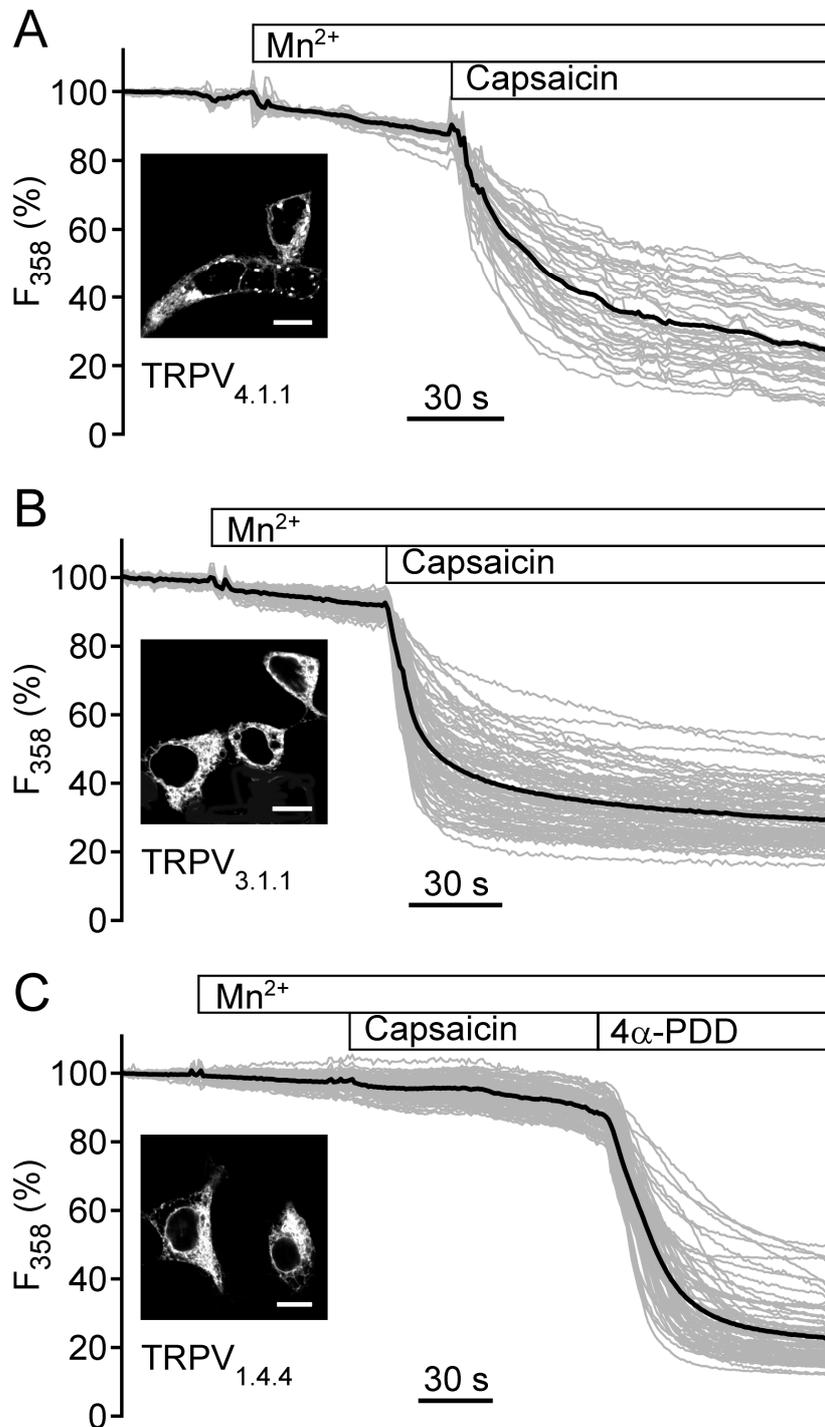
(A) TRPV1 (V1) und TRPV4 (V4) wurden jeweils an einem ihrer nativen Enden mit CFP oder YFP markiert. Die Fluoreszenzproteine einer TRPV-Isoform wurden wie gekennzeichnet in HEK293-Zellen koexprimiert und quantitativen FRET-Analysen unterworfen. (B und C) CFP- oder YFP-fusionierte cytosolische N- und C-Termini (NT, CT) von TRPV1 (B) oder TRPV4 (C) wurden in HEK293-Zellen zur Expression gebracht. Die FRET-Effizienzen wurden 16-24 h nach Transfektion ermittelt. Die konfokalen Bilder zeigen typische subzelluläre Lokalisationen YFP-markierter TRPV1- und TRPV4-Termini. Die Balken in den Abbildungen (A-C) zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SEM von mindestens 3 unabhängigen Transfektionen mit jeweils 4-15 Bleichexperimenten.

N-Terminus stabilisiert wird, während die TRPV1-Assemblierung hauptsächlich über Determinanten in den Transmembransegmenten und eine Determinante im C-Terminus vermittelt wird.

#### ***4.3.8. Funktionelle Wiederherstellung N-terminal trunkierter TRPV1-Konstrukte durch Fusion mit N-Termini anderer TRPV-Isoformen***

Wie bereits zuvor gezeigt, führte die N-terminale Trunkierung von TRPV1 zu einer schrittweisen Verringerung der Capsaicin-induzierten Kanalaktivierung und Interaktion mit TRPV1 (siehe Abb. 22). Homooligomere der TRPV<sub>4.1.1</sub>-, TRPV<sub>1.4.4</sub>- und TRPV<sub>3.1.1</sub>-Chimäre erzielten jedoch FRET-Effizienzen von  $27,1\% \pm 3,3\%$ ,  $7,3\% \pm 0,5\%$  und  $15,3\% \pm 0,5\%$ , so dass bei diesen Konstrukten von einer Assemblierung ausgegangen werden darf. Somit stellten wir uns die Frage, ob die Kanalfunktion N-terminal trunkierter Kanaluntereinheiten durch die Fusion mit N-Termini anderer, prinzipiell nicht-interagierender TRPV-Kanaluntereinheiten wieder hergestellt werden könnte. Tatsächlich reagierten sowohl TRPV<sub>4.1.1</sub>- als auch TRPV<sub>3.1.1</sub>-exprimierende Fura 2-geladene HEK293-Zellen auf die Zugabe von  $10\ \mu\text{M}$  Capsaicin in der Anwesenheit von  $250\ \mu\text{M}$   $\text{Mn}^{2+}$  mit einem beschleunigten  $\text{Mn}^{2+}$ -Einstrom (Abb. 26A und B). Weiterhin reagierten auch TRPV<sub>1.4.4</sub>-exprimierende HEK293-Zellen auf die Zugabe von  $4\alpha$ -Phorbol-12, 13-didecanoat ( $5\ \mu\text{M}$ ) mit einem ausgeprägten  $\text{Mn}^{2+}$ -Einstrom (Abb. 26C). Diese Daten zeigen, dass die cytosolischen N-Termini von nicht-interagierenden TRPV-Kanalisoformen in der Lage sind, die Ausbildung des Oligomers und die funktionelle Aktivität des Kanalkomplexes wieder herzustellen.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass TRPV-Kanäle mehr als eine Interaktionsdomäne besitzen. Sowohl die Transmembransegmente als auch die cytosolischen Termini tragen anscheinend synergistisch zu der Gesamtaffinität zwischen TRPV-Kanaluntereinheiten bei und kontrollieren die Selektivität der Homo- und Heteromultimerisierung von TRPV-Kanaluntereinheiten. Wie groß der Anteil ist, den die cytoplasmatischen und intramembranären Interaktionsdomänen zu der Assemblierung beitragen, kann je nach TRPV-Isoform unterschiedlich sein.



**Abbildung 26: Funktionelle Wiederherstellung N-terminal trunkierter TRPV-Kanaluntereinheiten**

(A-C) HEK293-Zellen wurden transient mit Expressionsplasmiden für YFP-markierte TRPV-Chimären kotransfiziert. In  $Mn^{2+}$ -Quench-Untersuchungen wurden die Zellen in Anwesenheit von 250  $\mu M$   $Mn^{2+}$  durch die Zugabe von Capsaicin (10  $\mu M$ ) oder 4 $\alpha$ -Phorbol-12, 13-didecanoat (4 $\alpha$ -PDD; 5  $\mu M$ ) in die Badlösung stimuliert. Dargestellt sind die zeitabhängigen Veränderungen der prozentualen Fura 2-Fluoreszenz am isosbestischen Punkt von einzelnen Zellen (graue Linien) sowie der Mittelwert (schwarze Linie). Diese Daten sind repräsentativ für 3 bis 4 Experimente voneinander unabhängiger Transfektionen. Die konfokalen Aufnahmen zeigen die Expression der YFP-fusionierten TRPV-Chimären in HEK293-Zellen. Die Länge der Balken entspricht 10  $\mu m$ .