

Untersuchungen zum molekularen Mechanismus der
Schmerzrezeption, insbesondere biochemische
Charakterisierung der thermosensitiven
Vanilloid-Rezeptoren TRPV1 und TRPV2

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Dipl.-Biochem. Ricarda Jahnel
am Institut für Chemie-Biochemie

Berlin, 2004

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ferdinand Hucho (AG Neurochemie) am Institut für Chemie-Biochemie des Fachbereiches Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin angefertigt.

Dekan: Prof. Dr. Hartmut Hilger, FB Biologie, Chemie, Pharmazie

Prodekan: Prof. Dr. Hans-Ulrich Reißig (Chemie)

1. Gutachter: Prof. Dr. Ferdinand Hucho, FB Biologie, Chemie, Pharmazie

2. Gutachter: PD Dr. Shiao Oei, FB Biologie, Chemie, Pharmazie

Datum und Ort der Disputation: 15. Februar 2005, Berlin

Für Pia

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGEN	VI
1 EINLEITUNG: NOZIZEPTION UND SCHMERZ	1
1.1 Mechanismen der Nozizeption	1
1.1.1 Periphere und zentrale Mechanismen der Schmerzentstehung	4
1.1.2 Periphere und zentrale Sensibilisierung	5
1.1.3 Modulation durch Interneurone	6
1.1.4 Rezeptortypen und rezeptorvermittelte Effekte	8
1.2 Calciumkanäle und Schmerz	10
1.2.1 Calcium als Botenstoff	10
1.2.2 Spannungsabhängige Calciumkanäle	10
1.2.3 Spannungsunabhängige Calciumkanäle	12
1.3 Die Familie der TRP-Kanäle	13
1.3.1 Struktur von TRP-Kanälen	14
1.3.2 Funktionelle Eigenschaften der TRP-Kanäle	15
1.4 Thermosensitive TRP-Kanäle	16
1.4.1 Hitzerezeptoren: Der Vanilloid-Rezeptor 1 (TRPV1) und das Vanilloid-Rezeptor-ähnliche Protein 1 (TRPV2)	18
1.4.2 Wärmerezeptoren: TRPV3 und TRPV4	22
1.4.3 Kälterezeptoren: TRPM8 und TRPA1	23
1.5 Zielsetzung der Arbeit	25
2 ERGEBNISSE	27
2.1 Proteom-Ansatz zur Detektion schmerzregulierter Genprodukte	27
2.1.1 Subzelluläre Fraktionierung und Charakterisierung der Präparate	28
2.1.2 2D-IEF/SDS-PAGE der Subfraktionen aus dorsalen Rückenmark-hälften von Kontrolltieren und Ratten aus Schmerzmodellen	33
2.2 Klonierung und Charakterisierung des Vanilloid-Rezeptor 1 (VR1, TRPV1) der Ratte	40
2.2.1 Klonierung von TRPV1 aus Ratten-DRG in pcDNA3.1(+)	40

2.2.1.1	Herstellung von GFP-gekoppelten TRPV1-Konstrukten und Deletionsmutanten von TRPV1	43
2.2.2	Expression und Lokalisation von TRPV1 in F11- und HEK293- Zellen	44
2.2.2.1	Analyse der Lokalisation von TRPV1-Deletionsmutanten	48
2.2.3	Untersuchung der Glycosylierung von TRPV1 in transfizierten F11- und HEK293-Zellen	52
2.2.4	Untersuchung der Quartärstruktur von TRPV1 in transfizierten F11- und HEK293-Zellen	56
2.3	Klonierung und Charakterisierung des Vanilloid Rezeptor-ähnlichen Proteins 1 (VRL-1, TRPV2)	62
2.3.1	Klonierung von TRPV2 aus Rattenhirn in pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO	62
2.3.2	Maus- und Ratten-TRPV2 werden endogen in F11-Zellen exprimiert	63
2.3.3	Expression und Lokalisation von heterolog exprimiertem TRPV2 der Ratte im Vergleich zu endogenem TRPV2 in F11-Zellen	67
2.3.4	Untersuchung der Glycosylierung von TRPV2 in transfizierten F11-Zellen	69
2.4	Identifizierung von TRPV1- und TRPV2-Interaktionspartnern durch Pull-Down-Experimente	74
2.4.1	Klonierung und Expression C- und N-terminaler Sequenzen von TRPV1 und TRPV2 als MBP-Fusionsproteine	74
2.4.2	Affinitätschromatographie (Pull-Down-Assay) zur Entdeckung potentieller Interaktionspartner	75
3	DISKUSSION	79
3.1	Proteom-Ansatz zur Identifizierung schmerzregulierter Genprodukte	79
3.1.1	Subzelluläre Fraktionierung von Rattenrückenmark und 2DE	80
3.1.2	Grenzen der klassischen Proteomanalyse für Membranproteine	82
3.1.3	Alternativen zur klassischen Proteomanalyse	83
3.1.4	Schlussfolgerungen und Konsequenzen	85
3.2	Biochemische Charakterisierung der thermosensitiven TRP-Kanäle TRPV1 und TRPV2	85
3.2.1	F11-Zellen als heterologes Expressionssystem	86
3.2.2	Glycosylierung, Lokalisation und Quartärstruktur von TRPV1 und TRPV2 in F11- und HEK293-Zellen	87

3.2.2.1	Glycosylierungsstellen von TRPV1 und TRPV2	87
3.2.2.2	Einfluss der Glycosylierung auf die TRPV1-Aktivierung und Lokalisation	88
3.2.2.3	Einfluss der Glycosylierung von TRPV2	90
3.2.2.4	Subzelluläre Lokalisation von TRPV1 und TRPV2	91
3.2.2.5	TRPV1 ist Bestandteil eines Signalkomplexes	94
3.2.3	Identifikation von TRPV1- und TRPV2-Interaktionspartnern	96
3.3	Ausblick auf zu untersuchende Fragestellungen	97
3.3.1	Identifizierung unbekannter Interaktionspartner sowie ihre funktionelle Analyse	97
3.3.2	Umfassende Analyse von TRPV1-regulierenden und TRPV1-regulierten Signalwegen	98
4	ZUSAMMENFASSUNG	101
5	SUMMARY	103
6	MATERIAL UND METHODEN	105
6.1	Bakterienstämme	105
6.2	Plasmid-Vektoren	105
6.3	Reagenzien	105
6.3.1	Chemikalien	105
6.3.2	Kits und Marker	106
6.3.3	Enzyme	107
6.3.4	Oligonukleotide	108
6.3.5	Antikörper	112
6.4	Medien, Lösungen und Puffer	113
6.4.1	Medien für die Molekularbiologie	113
6.4.2	Lösungen und Puffer für die Molekularbiologie	113
6.4.3	Lösungen und Puffer für die Proteinchemie	114
6.5	Geräte und Verbrauchsmaterialien	118
6.6	Molekularbiologische Methoden	120
6.6.1	RNA-Präparation mit TRIZOL	120
6.6.2	cDNA-Synthese	121
6.6.3	Polymerase-Kettenreaktion ¹⁹⁸	121

6.6.4	RACE-PCR	122
6.6.5	RT-PCR an Einzelzellen (Single cell RT-PCR)	124
6.6.6	Konzentrationsbestimmung von gelösten Nukleinsäuren	124
6.6.7	Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA ¹⁹⁹	125
6.6.8	Gelelektrophoresen für Nukleinsäuren	125
6.6.8.1	Agarose-Gelelektrophorese	125
6.6.8.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	126
6.6.9	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	127
6.6.10	Ligation von dsDNA	127
6.6.11	TOPO TA-Klonierung	127
6.6.12	Gerichtete DNA-Mutagenese	128
6.6.13	Kompetente <i>E. coli</i> -Zellen ²⁰⁰	129
6.6.14	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	129
6.6.15	Isolierung und Analyse von Plasmid-DNA aus Bakterien ²⁰¹	130
6.6.16	Sequenzierung von DNA ²⁰²	130
6.7	Zellbiologische Methoden	132
6.7.1	Zellkultur	132
6.7.2	Transfektion von F11- und HEK293-Zellen	132
6.7.3	Indirekte Immunfluoreszenz	133
6.7.4	Particulate-Präparation aus F11- und HEK293-Zellen	133
6.8	Proteinchemische Methoden	134
6.8.1	Proteinbestimmung nach Bradford	134
6.8.2	Vernetzung von Proteinen	134
6.8.3	Gelelektrophoretische Trennmethode für Proteine	135
6.8.3.1	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ²⁰³	135
6.8.3.2	Klassische zweidimensionale Gelelektrophorese (2DE) ^{126,127}	136
6.8.3.3	Zweidimensionale BAC-Gelelektrophorese ¹²⁴	137
6.8.3.4	Blaue Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese ^{204,205}	138
6.8.3.5	Zweidimensionale Gelelektrophorese von Membrankomplexen	138
6.8.4	Immunochemische Methoden	139
6.8.4.1	Westernblot	139
6.8.4.2	Antikörper-Inkubation	140
6.8.4.3	Detektionssystem alkalische Phosphatase	140

6.8.4.4	ECL-Blot	140
6.8.4.5	Immunpräzipitation	141
6.8.5	Färbetechniken für Proteine	141
6.8.5.1	Coomassie-Färbung nach SDS-PAGE	141
6.8.5.2	Silberfärbung nach SDS-PAGE ¹⁹⁶	141
6.8.5.3	Silberfärbung für MALDI-MS ¹⁹⁷	142
6.8.5.4	Ponceau-Färbung von Proteinen auf der Blotmembran	142
6.8.6	Analyse N-glycosylierter Proteine	142
6.8.7	Subzelluläre Fraktionierung von neuronalen Gewebeproben	143
6.8.7.1	Harnstoff/Carbonat-Extraktion von Synaptosomenmembranen	144
6.8.8	Nachweis von Protein-Protein Interaktionen (TRPV1/TRPV2)	144
6.8.8.1	Proteinexpression in <i>E. coli</i> und Zellaufschluss	145
6.8.8.2	Affinitätschromatographie zur Identifizierung von potentiellen Interaktionspartnern	146
6.8.9	Identifizierung von Proteinen mittels MALDI-MS	147
6.8.9.1	Tryptischer Verdau von Proteinen in Polyacrylamidgelen	148
6.8.9.2	Vorbereitung der Proben für die MALDI-MS	149
6.8.9.3	Auswertung massenspektrometrischer Daten	150
7	LITERATURVERZEICHNIS	151
8	EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN	163
8.1	Originalarbeiten	163
8.2	Tagungsbeiträge	164
9	ANHANG	166
9.1	TRPV1- und TRPV2-Konstrukte	166
	LEBENS LAUF	168
	DANKSAGUNG	169

Abkürzungen

2DE	Zweidimensionale-Gelelektrophorese
Ac	Acetat
amp	Ampicillin
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxydisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
16-BAC	16-Benzyl-dimethyl-hexadecyl-ammoniumchlorid
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat, p-Toluidinsalz
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
β -Gal	β -Galactosidase
β -Me	β -Mercaptoethanol
BIS	<i>N, N'</i> -Methylenbisacrylamid
BK	Bradykinin
BLAST	basic local alignment search tool
BN-PAGE	Blaue Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese
bp	Basenpaar(e)
BSA	bovine serum albumine
cAMP	cyclischen Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA
CGRP	calcitonin gene-related peptide
CIP	calf intestine phosphatase
cmc	kritische micellare Konzentration
cpm	counts per minute
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
ddNTP	2', 3'-Dideoxyribonucleosid-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIC	Differential interference contrast
DMA	Dimethyladipimidat
DMF	Dimethylformamid

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
ssDNA	einzelsträngige DNA
DRG	dorsal root ganglion (Hinterwurzelganglion)
DTBP	Dimethyl-3-3'-Dithiobis[propionimidat]
DTSSP	3,3'-Dithiobis[sulfosuccinimidylpropionat]
DTT	1, 4-Dithio-D,L-threitol
EAA	excitatorische Aminosäuren
ECL	Enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamin- <i>N, N, N', N'</i> -tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	fötales Kälberserum
G-418	Aminoglycosidantibiotikum Geneticin
GABA	γ -Aminobuttersäure
GAD	Glutamat-Decarboxylase
GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
GFP	green fluorescent protein
GluDH	Glutamat-Dehydrogenase
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GluR	Glutamat-Rezeptor
HAT-Medium	hypoxanthin-, aminopterin-, thymidinhaltiges Medium
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	Meerettichperoxidase
IEF	Isoelektrische Focussierung
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
LB	Luria broth
LGCC	ligandengesteuerter Ca^{2+} -Kanal (ligand-gated Ca^{2+} -channel)
LPS	Lipopolysaccharid

LTD	long-term depression
LTP	long-term potentiation
MALDI	matrix-assisted laser desorption ionization
MBP	maltose binding protein
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
M_r	relative Molekülmasse
mRNA	Messenger-RNA
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse-Ladungsverhältnis
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NBT	Nitroblue-Tetrazoliumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGF	nerve growth factor
NK1	Neurokinin 1 (SP)-Rezeptor
NKA	Neurokinin A
NMDA	N-Methyl-D-aspartat
NPY	Neuropeptid Y
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDZ	<u>P</u> SD95, <u>D</u> isc-large, <u>Z</u> ona occludens-1 (Proteine mit PDZ-Domänen)
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid (Serinprotease-Inhibitor)
PPT-A	Preprotachykinin-A
PSD	postsynaptic density
PSD	post source decay
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	reverse transcriptase PCR

SDS	sodium dodecyl sulfate
SP	Substanz P
SPDP	N-Succinimidyl-3-[2-pyridyldithio]propionat
S-LC-SMPT	Sulfosuccinimidyl-6-[α -methyl- α -(2-pyridyldithio)toluamido]-hexanoat
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
TB	Terrific broth
TBE	Trisbase/Borsäure/EDTA-Puffer
TBS, TBS-T	tris buffered saline, TBS mit Tween
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEA	Tris/Ethanolamin-Puffer
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	time of flight
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X100	4-(2',2',4',4'-Tetramethylbutyl)-phenyldecaethylglycol
tRNA	Transfer-RNA
TRP	transient receptor potential
UV	Ultraviolett
VIP	vasoactive intestinal polypeptide
VGCC	spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanal (voltage-gated Ca^{2+} -channel)
Vol	Volumen
VR1/TRPV1	Vanilloid-(Capsaicin-)Rezeptor 1
VRL-1/TRPV2	Vanilloid-Rezeptor ähnliches Protein 1
v/v	volume per volume
WB	Western Blot
w/v	weight per volume
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid