

2 Ergebnisse

2.1 Proteom-Ansatz zur Detektion schmerzregulierter Genprodukte

Das primäre Ziel des von der Firma Grünenthal GmbH (Aachen) geleitete und koordinierte BMBF-Leitprojekt „Molekulare Schmerzforschung“ lag in der Identifizierung neuer Angriffspunkte für die Behandlung chronischer und neuropathischer Schmerzen. Bereits zuvor wurden von der Firma Grünenthal schmerzregulierte Genprodukte auf mRNA-Ebene in Rattenrückenmark und Ratten-Hinterwurzelganglien (DRG, dorsal root ganglia) innerhalb eines DDRT-PCR (Differential Display RT-PCR)-Ansatzes identifiziert. Dabei kamen verschiedene Schmerzmodelle zum Einsatz: Analgesiemodelle für Akutschmerz, Endzündungs-, Neuropathie- und viszerale Schmerz sowie für Migräne. Als Grundlage für meine Arbeit wurde uns von der Firma Grünenthal Gewebe von Ratten aus einem Schmerzmodell für chronische Entzündung, dem Formalin-Modell, bereitgestellt. Hierzu wurde den Ratten jeweils 50 µl einer 5%igen Formalin-Lösung intraplanar in die rechte Hinterpfote injiziert. Als Kontrolle wurden Ratten identisch mit NaCl-Lösung behandelt. Die Entnahme von Gewebe (Rückenmark, DRG) erfolgte 6 und 24 Stunden nach Schmerzinduktion.

Zur Identifizierung und Untersuchung schmerzregulierter Proteine sollte von mir ein Proteom-Ansatz etabliert und validiert werden, der auf der Auftrennung von Gewebeproben mittels der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2DE) und der Analyse durch MALDI-Massenspektrometrie (MALDI-MS) basiert. Für die Identifizierung neuer möglicher Angriffspunkte für analgetisch wirkende Medikamente sollten nach Etablierung der Methode dorsale Rückenmarkshälften von Ratten (Kontrolltiere und Tiere aus relevanten Schmerzmodellen für Entzündungsschmerz) mit dem Fokus auf Membranproteine subzellulär fraktioniert werden. Die subzelluläre Fraktionierung dient einerseits dazu, die Komplexität der Probe zu verringern und andererseits ermöglicht sie die Detektion von Proteinen, die nach Schmerzinduktion möglicherweise das Zellkompartiment wechseln. Dadurch wird ein Zugang zur Proteintranslokation geschaffen, welche nicht in komplexen Gewebeproben detektiert werden kann. Durch Vergleich der 2DE-Proteinmuster

sollten Kandidatenproteine für schmerzregulierte Genprodukte als Differenzspots auf den Gelen erkennbar sein. Diese schmerzregulierten Proteine sollten anschließend mittels MALDI-MS identifiziert werden.

2.1.1 Subzelluläre Fraktionierung und Charakterisierung der Präparate

Für die Analysen wurde zunächst die Präparation der Postsynaptischen Dichte (PSD) erarbeitet (siehe 6.9.7). Die PSD ist ein dichtes Netzwerk aus Proteinen direkt unter der synaptischen Plasmamembran postsynaptischer Neurone. Neurotransmitter-Rezeptoren und Signalproteine werden hier an Strukturproteinen verankert^[1]. Die PSD ist besonders ausgeprägt an erregenden, Glutamat ausschüttenden Synapsen des ZNS. Die in der PSD enthaltenen Proteine sind vor allem membranassoziierte Proteine oder Membranproteine, die insbesondere bei der synaptischen Signalübertragung eine Rolle spielen^[2].

Aus Gewebe des ZNS (Gehirn oder Rückenmark, später dorsale Rückenmarkshälften) wurden zunächst Synaptosomen gewonnen. Synaptosomen sind abgerissene, wiederverschlossene synaptische Nervenendigungen, die bei der mechanischen Zerkleinerung von Nervengewebe entstehen^[3]. Sie lassen sich durch Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation von anderen Zellbestandteilen trennen. Nach einem osmotischem Schock können aus den Synaptosomen die Synaptosomenmembranen (P3) und im Verlaufe der weiteren Präparation durch Resuspension, erneute Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation und mehrfache Tritonextraktion die reine PSD-Fraktion gewonnen werden^[4]. Es zeigte sich allerdings, dass die Präparation der PSD aus Rattenhirn nur sehr geringe Ausbeuten lieferte und die Probe extrem „klebrig“ war, was die Handhabung sehr erschwerte. Die PSD-Ausbeute aus Rückenmark war noch erheblich geringer. Für die weiteren Analysen wurde deshalb dazu übergegangen Synaptosomenmembranen (P3) zu verwenden, da sie sich in ausreichenden Mengen (500 µg Synaptosomenmembranen / 1 g Rattenrückenmark) gewinnen ließen. Eine schematische Darstellung der Präparation ist in Abb. 2.1 gezeigt. Die Anreicherung von Membranproteinen im Verlauf der Präparation wurde im Westernblot anhand des Nachweises der $\alpha 1$ -Untereinheit des NMDA-Rezeptors (α NMDA R1) und PSD-95, einem synaptischen Verankerungsprotein gezeigt (Abb. 2.2).

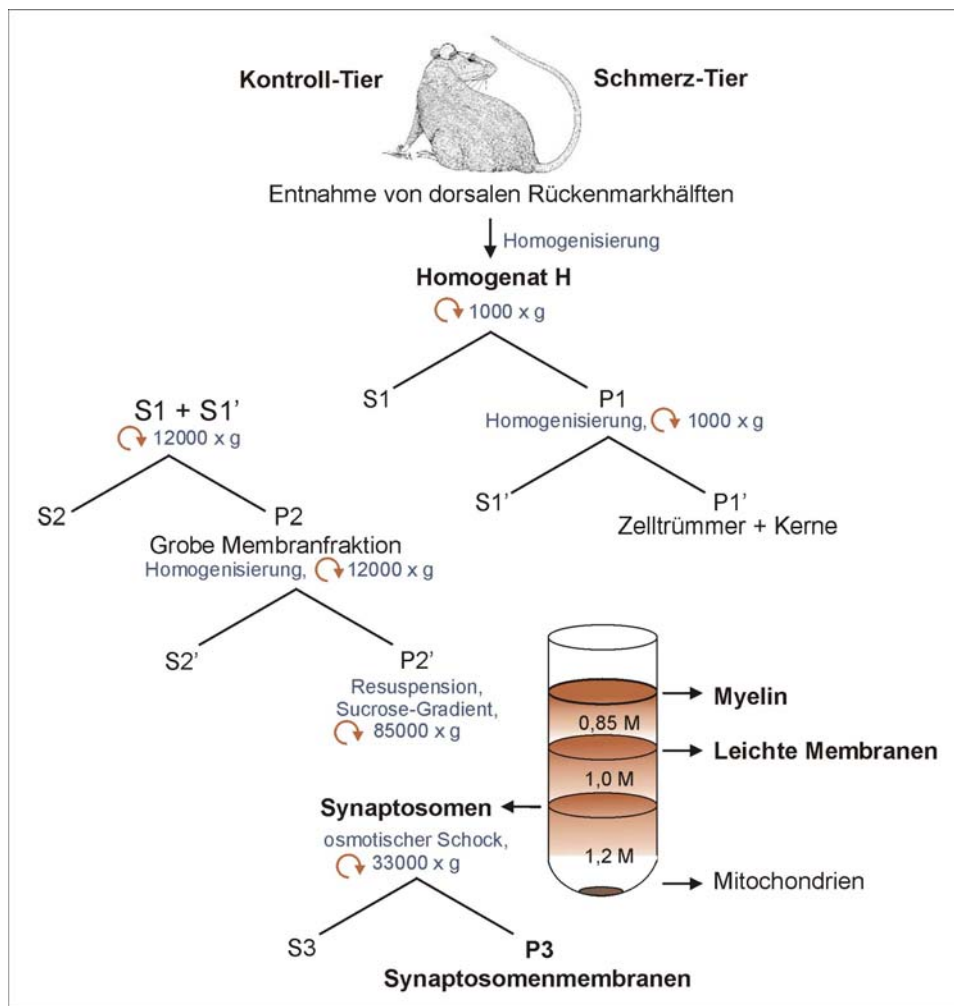


Abb. 2.1: Schema der subzellulären Fraktionierung von neuronalem Gewebe bis zu den Synaptosomenmembranen. S = Überstand (supernatant), P = Pellet.

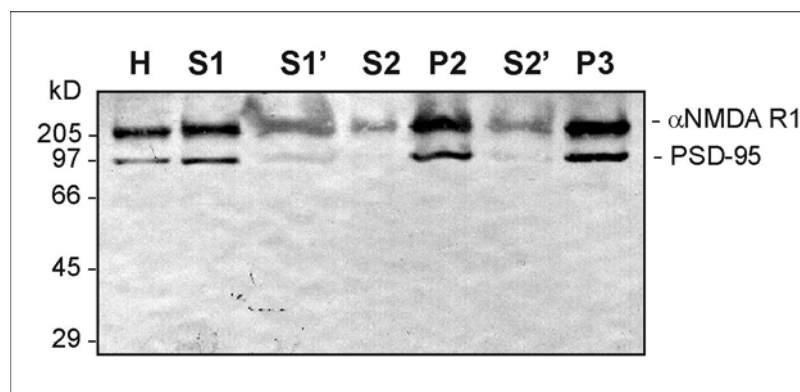


Abb. 2.2: Verlauf der subzellulären Fraktionierung von Rattenhirn. Der Westernblot mit Antikörpern gegen die NMDA-Rezeptoruntereinheit $\alpha 1$ und PSD-95 zeigt die Anreicherung der synaptischen Proteine in der Synaptosomenmembran-Fraktion P3.

Um die Präparation näher zu charakterisieren und die Darstellbarkeit von Membranproteinen in einem zweidimensionalen Gelelektrophoresesystem zu überprüfen, wurden die Synaptosomenmembranen (P3) aus Rattenhirn und Rattenrückenmark mit Hilfe der 16-BAC (16-Benzyl-dimethyl-hexadecylammoniumchlorid)-2DE aufgetrennt. Dieses System hat zwar nicht die hohe Trennleistung der klassischen 2DE, ist aber besonders für die Auftrennung von Membranproteinen geeignet^[5]. Nach Auftrennung von Synaptosomenmembranen aus Rattenhirn und Rattenrückenmark wurden die Gelstreifen der ersten Dimension (16-BAC-PAGE) horizontal auf ein SDS-Polyacrylamidgel als zweite Dimension gelegt. Alle sichtbaren Proteinspots nach Coomassie-Färbung sind bei beiden Proben gut miteinander vergleichbar. Fast alle Proteinspots aus der Rattenhirn-Probe finden sich auch in der Rattenrückenmark-Probe, allerdings in teilweise unterschiedlichen Intensitäten. Einige repräsentative Spots wurden ausgeschnitten und unter der fachkundigen Anleitung von Dr. Mathias Dreger mittels MALDI-MS analysiert (Abb. 2.3). Ein Spot, der in mehreren Experimenten nur in der Rattenhirn-Probe vorkam, konnte als die Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II α identifiziert werden. Die gut sichtbaren Spots repräsentieren Proteine, die sehr häufig in der Zelle vorkommen (cytosolische Enzyme wie Hexokinase, mitochondriale Proteine wie die Kreatinkinase oder Bestandteile des Cytoskeletts). Unter den ausgewählten Spots konnten auch synaptische Proteine (Synapsin I) nachgewiesen werden, aber keine bekannten Rezeptoren oder Ionenkanäle.

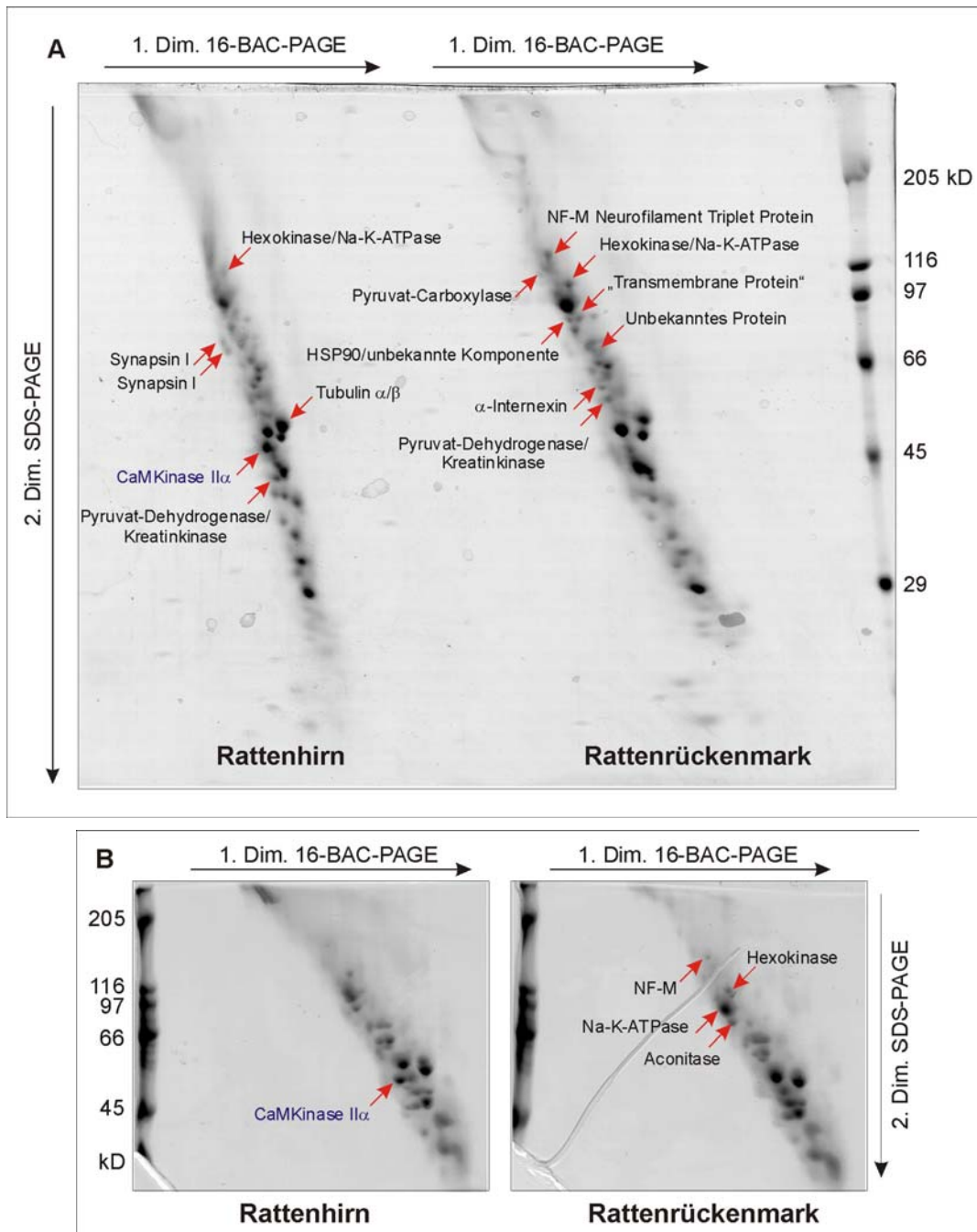


Abb. 2.3: 16-BAC-2DE von Synaptosomenmembranen aus Rattenhirn und Rattenrückenmark. Mittels MALDI-MS wurden die markierten Spots identifiziert. In zwei unabhängigen Experimenten nach Auftrennung von je 50 μ g Synaptosomenmembranen, konnte ein deutlicher Differenzspot (blau: CaMKinase II α) in Rattenhirn detektiert werden. A) Die zweiten Dimensionen wurde in einem großen (20 x 20 cm) Gel aufgetrennt. B) Auftrennung der Proben in herkömmlichen Minigelen.

Um Membranproteine noch weiter anzureichern und periphere Membranproteine sowie Cytoskelett-Proteine und mitochondriale Kontaminationen zu entfernen, wurden die Synaptosomenmembranen zur weiteren Subfraktionierung mit Harnstoff/Carbonat gewaschen und mittels 16-BAC-2DE aufgetrennt (Abb. 2.4). Diese Methode wurde von Dr. Mathias Dreger bereits erfolgreich zur Anreicherung von Kernmembranproteinen angewendet^[6]. Um zu testen, ob membranständige Rezeptoren und wichtige neuronale Proteine der Synapse angereichert worden sind, wurden alle detektierbaren Protein-Spots mittels MALDI-MS analysiert. Im Westernblot wurden außerdem die synaptischen Referenzproteine α NMDA R1 und PSD-95 nachgewiesen. Anhand der Blots war eine Anreicherung von PSD-95 im Pellet nach dem Harnstoff/Carbonat-Waschschritt zu erkennen. Das eigentliche Ziel, Membranproteine wie den α NMDA R1 mit dieser Methode anzureichern, war jedoch im Blot nicht erkennbar. Die Analyse zeigte darüber hinaus, dass beispielsweise das Cytoskelettprotein Tubulin α 1 im Pellet detektiert wurde, obwohl es eigentlich im Überstand des Harnstoff/Carbonat-Waschschrilles zu erwarten war. Der Harnstoff/Carbonat-Waschschritt ist diesen Ergebnissen nach nicht zur Anreicherung von Membranproteinen aus Synaptosomenmembranen geeignet.

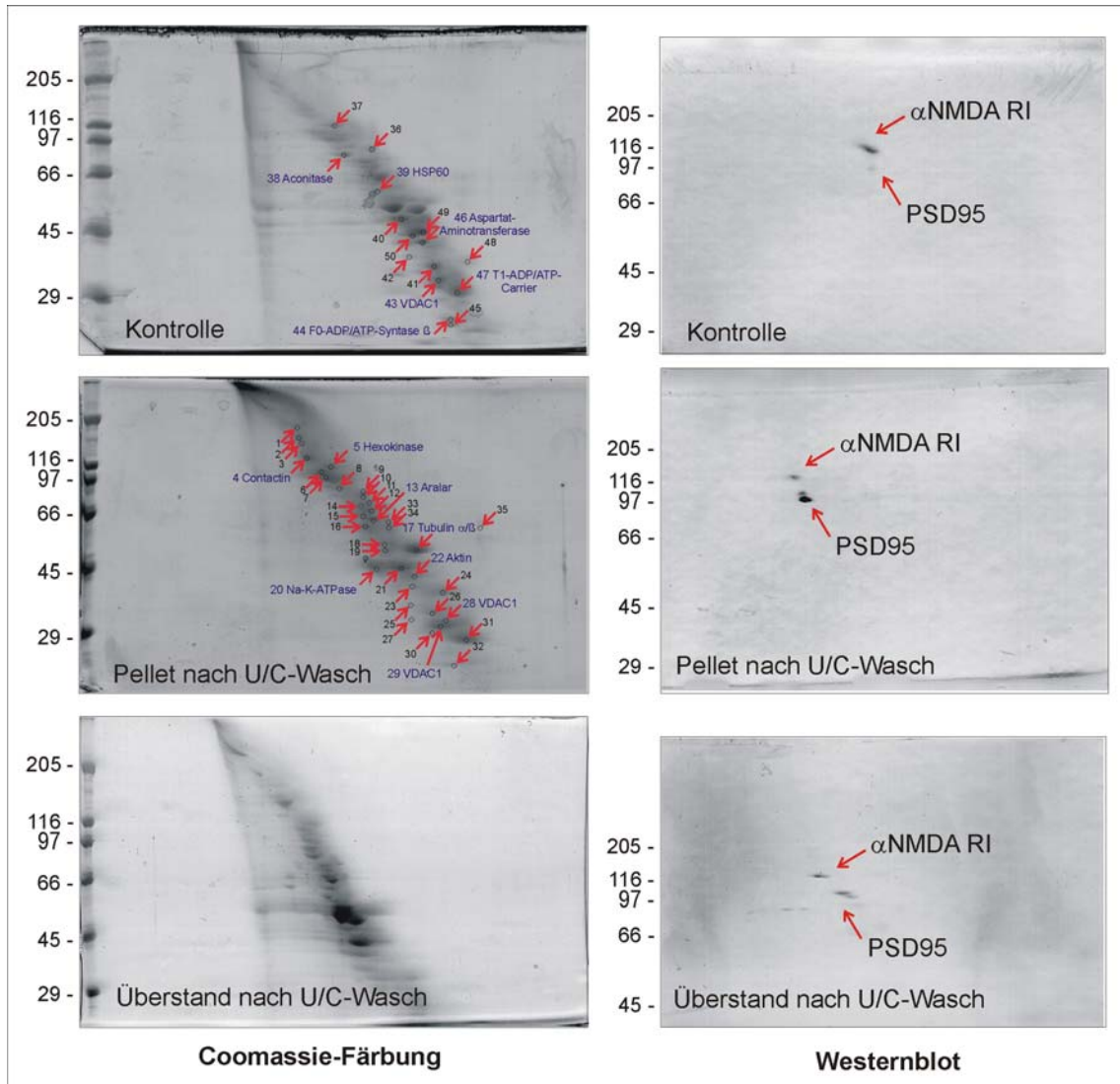


Abb. 2.4: 16-BAC-2DE von Synaptosomenmembranen aus Ratten-Rückenmarksgewebe. Links: Coomassie-G250-gefärbte Gele mit allen analysierten Proteinspots. Identifizierte Spots sind beschriftet. Rechts: Korrespondierende Westernblots. Nachweis von α NMDA R1 und PSD-95. U/C-Wasch = Harnstoff/Carbonat-Waschschritt.

2.1.2 2D-IEF/SDS-PAGE der Subfraktionen aus dorsalen Rückenmarkshälften von Kontrolltieren und Ratten aus Schmerzmodellen

In Vorversuchen zur zweidimensionalen Auftrennung von Gewebeproben mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) und SDS-PAGE wurden verschiedene Solubilisierungs- und Laufbedingungen für die erste Dimension getestet. Die Auftrennung der Gewebepreparate in der IEF unter Verwendung immobilisierter pH-Gradienten auf kommerziell erhältlichen Gelstreifen war dem klassischen Carrier-Ampholyt-System^[7,8] in Röhrengelen deutlich überlegen.

Aus Dorsalhorngewebe (genauer: dorsale Hälfte des Rückenmarks; zur Verfügung gestellt durch die Firma Grünenthal) wurde neben dem Gewebemogenat auch die Myelin-Fraktion und synaptische Membranen als Subfraktionen hergestellt. Eingesetzt wurde Gewebe aus jeweils 20 Kontrollratten und 20 Formalin-injizierten Ratten (24h nach der Injektion). Aus der verwendeten Gewebemenge lassen sich ca. 50 mg Homogenat, ca. 10 mg Myelin-Proteine und ca. 500 µg synaptische Membranen gewinnen. Der Fokus der Analysen lag bei der Synaptosomenmembran-Fraktion, da hier Proteine der Plasmamembran im Bereich der Synapsen zu erwarten sind. Die **Synaptosomenmembran-Fraktion** aus drei unterschiedlichen Präparationen wurde insgesamt 12× (6× Kontrolle und 6× Formalin-Injektion) zweidimensional aufgetrennt: fünf Auftrennungen erfolgten in 13 cm-IEF-Gelstreifen mit einem linearen pH-Gradienten von pH 3-10, eine mit einem linearen pH-Gradienten von pH 4-7. Die **Homogenat-Fraktion** aus den drei unterschiedlichen Präparationen wurde insgesamt 8× (4× Kontrolle und 4× Formalin-Injektion) aufgetrennt: je zwei Auftrennungen wurden in 13 cm-IEF-Gelstreifen mit einem linearen pH-Gradienten von pH 3-10 und je zwei Auftrennungen in 7 cm-IEF-Gelstreifen mit einem linearen pH-Gradienten von pH 4-7 durchgeführt. Die **Myelin-Fraktion** aus den drei unterschiedlichen Präparationen wurde insgesamt 6× (3× Kontrolle und 3× Formalin-Injektion) in 13 cm-IEF-Gelstreifen mit einem linearen pH-Gradienten von pH 3-10 aufgetrennt. Nach anschließender SDS-PAGE und Silberfärbung der Gele waren in der Myelin-Fraktion, der synaptischen Membranfraktion und (in geringerem Ausmaß) dem Gewebemogenat einige Differenzspots in den Proteinmustern aus Gewebe von Kontroll- versus Formalin-injizierten Tieren zu erkennen. Dazu gehörten Proteinspots, die im „Schmerzgewebe“ neu oder verändert auftraten oder solche, die nur im Kontrollgewebe sichtbar waren. Einige Differenzspots erschienen in verschiedenen subzellulären Fraktionen gegenüber dem Gewebemogenat angereichert. Eine Auswahl an silbergefärbten 2D-Gelen von der Homogenat- und der Synaptosomenmembran-Fraktion ist in Abb. 2.5 dargestellt. Differenzspots sind durch Pfeile markiert. Leider ließen sich diese Differenzspots nach erneuter Gewebepreparation und 2DE-Auftrennung nicht eindeutig reproduzieren. Außerdem ist die Silberfärbung als empfindlichste Färbemethode für Proteine in Gelen nicht mit einer proteolytischen Spaltung der Proteine im Gel kompatibel (Quervernetzung

durch Glutardialdehyd). Andere Färbungen (Coomassie G-250, Silberfärbung ohne Glutardialdehyd) waren aufgrund ihrer unzureichenden Empfindlichkeit nicht geeignet, die Differenzspots darzustellen, so dass eine Proteinidentifizierung mittels MALD-MS nicht möglich war.

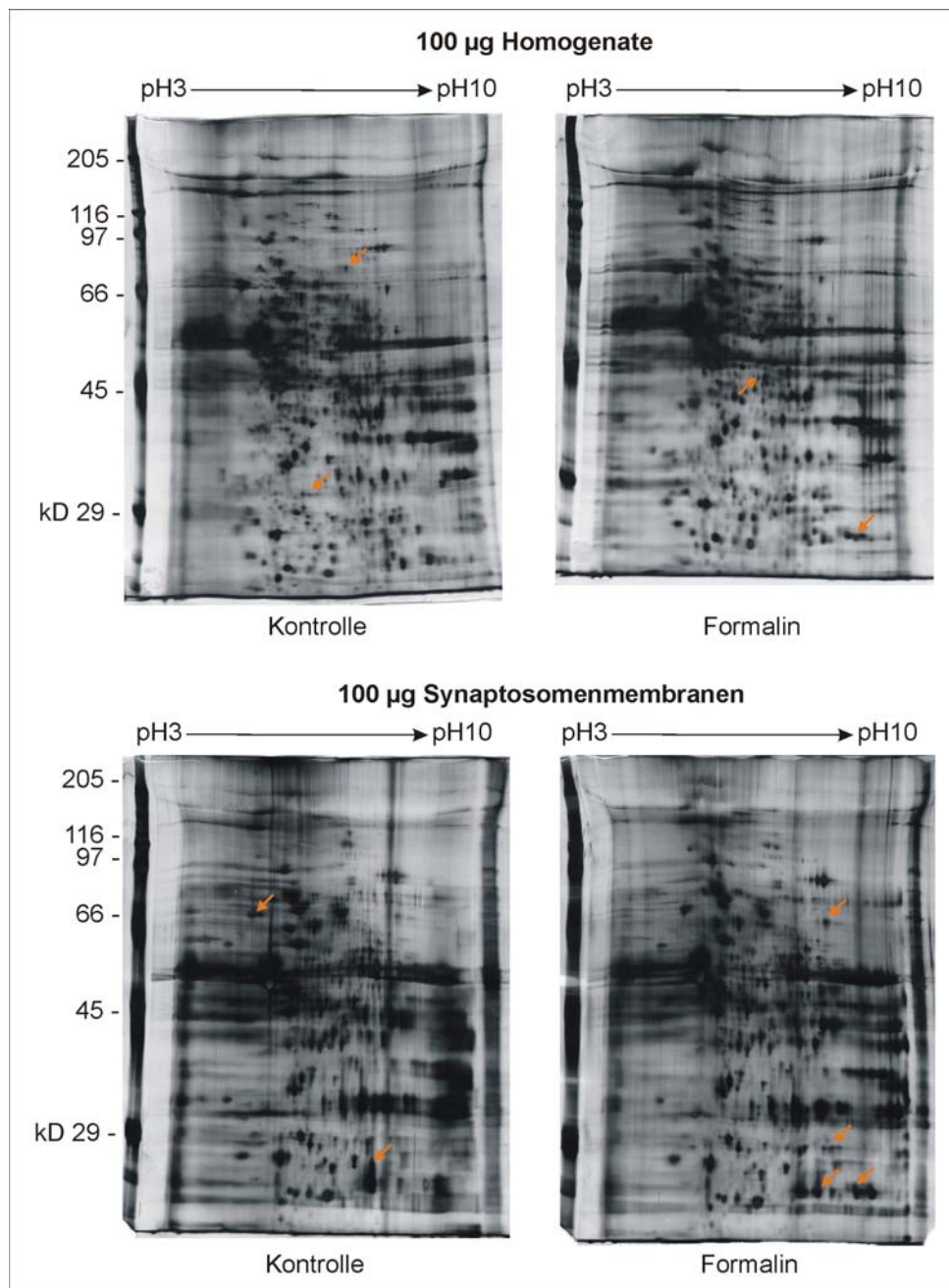


Abb. 2.5: Silberfärbung nach 2D-IEF/SDS-PAGE von Homogenaten und Synaptosomenmembranen aus dorsalen Rückenmarkshälften von Kontroll- und Formalin-induzierten Ratten. 1. Dimension: IEF mit immobilisierten pH-Gradienten auf 13 cm langen Gelstreifen mit pH3-10L. 2. Dimension: 10% SDS-PAGE. Differenzspots (orange Pfeile) konnten nicht reproduzierbar dargestellt werden.

Die Identifizierung verschiedener Hauptproteine aus den synaptischen Membranen (siehe 2.1.1) legte nahe, dass integrale Membranproteinen der Plasmamembran in den 16-BAC-2D-Gelen und damit erst recht in den klassischen 2D-Gelen stark unterrepräsentiert und Cytoskelett-Proteine und mitochondriale Kontaminationen überrepräsentiert sind. Daher wurde versucht, die Darstellung von Differenzspots über engere pH-Gradienten in der ersten Dimension (pH4-7L und pH6-11L) zu ermöglichen. Zur Anfärbung der Proteine in den Gelen wurde der mit der massenspektrometrischen Analyse kompatible Fluoreszenzfarbstoff SYPRO Ruby verwendet. Die engeren pH-Gradienten ergaben allerdings nicht die erhoffte Verbesserung zur Darstellung von Proteinspots. Parallel wurde damit begonnen, eine Protein-Karte des Rückenmarks zu erstellen, um sich anhand von Markerproteinen auf den Gelen orientieren zu können. Aus SYPRO Ruby-gefärbten 2D-Gelen von Synaptosomenmembranen (Kontrolle und Formalin-Injektion) wurden 25 repräsentative Spots ausgeschnitten, tryptisch verdaut und massenspektrometrisch analysiert (Abb. 2.6). Die identifizierten Spots sind in Tab. 2.1 dargestellt.

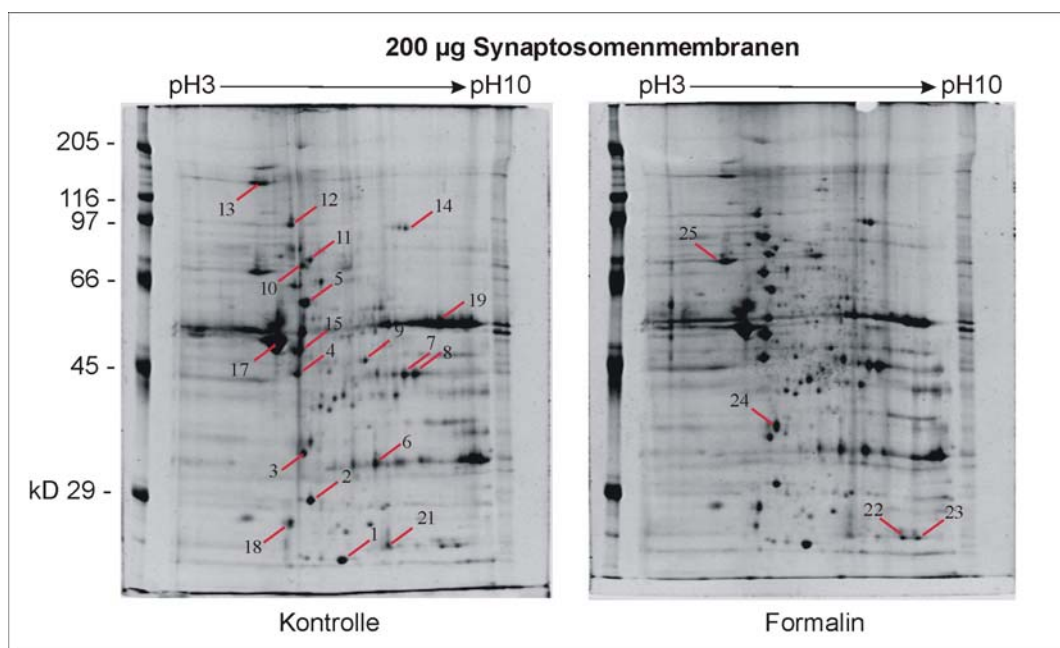


Abb. 2.6: SYPRO Ruby-Färbung nach 2D-IEF/SDS-PAGE von Synaptosomenmembranen aus dorsalen Rückenmarkshälften von Kontroll- und Formalin-induzierten Ratten. 25 ausgewählte Proteinspots wurden mittels MALDI-MS analysiert.

| Spot | Protein (Verdauüberstand) | % Sequenzabdeckung | MW (kD) | pI |
|------|--|-----------------------------|---------|-----|
| 1 | mitochondrial ATP synthase δ -subunit | 57% | 18,8 | 6.2 |
| 2 | Prohibitin (B-cell receptor associated protein 32) | 39% | 29,86 | 5.7 |
| 5 | HSP 60, mitochondrial precursor | 27% | 61 | 5.9 |
| 6 | Voltage dependent anion channel 2 | 31% | 30 | |
| 7 | s. Protein 8 | | | |
| 8 | Kreatin Kinase, mitochondrial precursor | 19% | 47 | 8.8 |
| 11 | HSP 70 Mortalin | PSD: STNGDTFLGGEDFDQALLR | 73 | 6.1 |
| 15 | EST gi/1656376; similar to ubiquinol-cytochrome C reductase core protein 1 | PSD: EVESIG AHLNAYSTR | | |
| 16 | glial fibrillary acidic protein δ | 37% | 48,82 | 5.7 |
| 19 | Chain A, rat liver F1-ATPase | 30%, 28% | 55,38 | 8.4 |
| 20 | neurofilament triplet M protein (NF-M) | 16% | 95,75 | 4.8 |
| 22 | superoxide dismutase, mitochondrial precursor | 22% | | |
| 23 | Y00497 precursor (AS -24 bis 198) | 25% | | |
| 25 | neurofilament triplet L protein (NF-L, NF 68) | 24%, 33% | 61, 37 | 4.6 |

Tab. 2.1: Liste der identifizierten Proteine aus den Synaptosomenmembran-Fraktionen nach 2D-IEF/SDS-PAGE und SYPRO Ruby-Färbung.

Für die Analyse einer großen Anzahl an Proteinspots ergab sich eine Kooperation mit der Massenspektrometrie-Gruppe von Dr. Eckard Nordhoff, MPI für Molekulare Genetik Berlin, da dort Hochdurchsatztechniken zur Verfügung stehen. Zur Erstellung einer vollständigen Protein-Karte wurden 2D-Gele aller Fraktionen aus einer Präparation von dorsalen Rückenmarkhälften von Kontroll- und Formalin-induzierten Ratten hergestellt (1. Homogenat, 2. „Leichte Membranen“, 3. Synaptosomenmembranen, 4. Myelin-Fraktion, 5. Mitochondrien-Fraktion und 6. lösliche Fraktion S2). Zunächst wurden vier Gele (Homogenat und synaptische Membranproben, jeweils Schmerz und Kontrolle) nach Coomassie G-250-Färbung analysiert. Insgesamt wurden per Hand 381 Proteinspots ausgestochen und in eine 384-Loch-Mikrotiterplatte überführt. Die Probenprozessierung erfolgte parallel in der Mikrotiterplatte. Je 1 μ l Verdauüberstand wurde für die MALDI-TOF-Analyse eingesetzt. Die Proben wurden auf einem 384-Spot „anchor chip target“ in einem Bruker Reflex II MALDI-TOF-Massenspektrometer automatisiert vermessen. Die

Spektren wurden, z.T. nach interner Kalibrierung mit Hilfe des Programmes MSA peptide mapping (V. Egelhofer, AG Nordhoff) mit Proteindatenbankeinträgen abgeglichen. Insgesamt war die Anzahl identifizierter Proteine äußerst gering. Aus dem Kontroll-Homogenat-Gel wurden nur 31 verschiedene, zumeist nicht membrangebundene Proteine, identifiziert (Abb. 2.7, Tab. 2.2). Gründe für die schlechte Analyseausbeute waren vor allem Schwächen im Protokoll für die Probenprozessierung. Die Proben auf den MALDI-Targets enthielten durch eine unausgereifte Waschprozedur zu viel Salz. Zusätzlich wurden überwiegend Peptide aus dem Trypsin-Eigenverdau detektiert, da auch die automatische Verdauprozedur noch nicht optimiert war. Weiterhin war häufig eine Keratin-Kontamination vorhanden, die durch ein automatisches Ausstechen der Spots verringert werden könnte. Dieser Fehlversuch hat nochmals gezeigt, dass das 2D-Gelsystem aus IEF und SDS-PAGE für eine Trennung membrangebundener Proteine nicht geeignet ist. Dennoch konnte eine provisorische Proteinkarte mit über 30 Proteinen für den linearen pH Bereich 3-10 erstellt werden. Eine vergleichende Analyse (Differenzspots zwischen Schmerz und Kontrolle waren nicht detektierbar) auf proteinchemischer Ebene war ebenfalls nicht möglich.

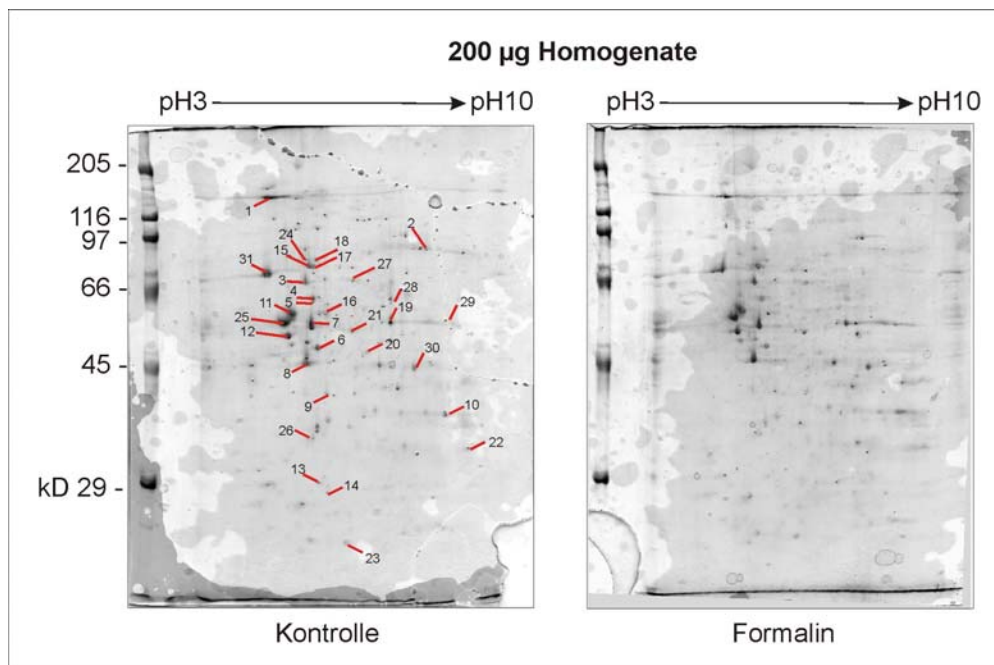


Abb. 2.7: Coomassie G250-Färbung nach 2DE-Auftrennung von Homogenaten aus dorsalen Rückenmarkshälften von Kontroll- und Formalin-induzierten Ratten. Sämtliche Proteinspots wurden mittels MALDI-MS analysiert. Gezeigt sind hier nur die identifizierten Proteinspots aus insgesamt 381 Proben.

| Spot | Protein (Verdauüberstand) | Spot | Protein (Verdauüberstand) |
|------|--|------|--|
| 1 | Neurofilament triplet M protein (NF-M) | 17 | Vascular ATP synthase α subunit |
| 2 | Aconitase | 18 | GRP-75 |
| 3 | α -Internexin | 19 | Glutamat-Dehydrogenase |
| 4 | HSP60 | 20 | EF-Tu |
| 5 | Peripherin | 21 | α -Enolase |
| 6 | Kreatinkinase B chain | 22 | VDAC1 (Porin 1) |
| 7 | Glial fibrillary acidic protein | 23 | ATP synthase δ subunit |
| 8 | Aktin | 24 | 78 kD glucose regulated protein (BIP) |
| 9 | Isocitrat-Dehydrogenase | 25 | Tubulin β |
| 10 | GAPDH | 26 | Pyruvat-Dehydrogenase β chain |
| 11 | Tubulin α | 27 | Dihydropyrimidase related protein 2 |
| 12 | F1-ATP-Synthase β | 28 | Pyruvatkinase |
| 13 | Prohibitin | 29 | F1-ATP-Synthase α |
| 14 | NADH Ubichinon Oxidoreduktase subunit | 30 | Kreatinkinase, mitochondrial |
| 15 | Heat shock protein cognate 70 kD protein | 31 | Neurofilament triplet L protein (NF-L) |
| 16 | Vascular ATP synthase β subunit | | |

Tab. 2.2: Liste der identifizierten Proteine aus Rückenmarkshomogenat nach 2D-IEF/SDS-PAGE und Coomassie G250-Färbung.

Da die Verwendung der klassischen 2DE zur Auftrennung von subzellulären Fraktionen aus Rattenrückenmark von Kontroll- und schmerzinduzierten Tieren keine reproduzierbaren Proteinmuster ergab und darüber hinaus Membranproteine auf diesen Gelen unterrepräsentiert waren, wurde dieser experimentelle Ansatz nicht weiter verfolgt.

2.2 Klonierung und Charakterisierung des Vanilloid-Rezeptor 1 (VR1, TRPV1) der Ratte

2.2.1 Klonierung von TRPV1 aus Ratten-DRG in pcDNA3.1(+)

Eine biochemische Charakterisierung von TRPV1 auf der Ebene des endogenen Proteins aus Rattenrückenmark erschien wegen der geringen Proteinmenge und dem daraus resultierenden sehr hohen Bedarf an Tieren als wenig erfolgversprechend. Daher wählte ich die Strategie der Klonierung von TRPV1 und seiner heterologen Expression in eukaryontischen Kulturzellen.

Die *Trpv1*-cDNA wurde erfolgreich aus Gesamt-RNA von Hinterwurzelganglien (DRG, dorsal root ganglia) der Lendenwirbel L4-L6 aus adulten Ratten gewonnen und im eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1(+) kloniert. Dazu wurde nach cDNA-Synthese aus DRG-Gesamt-RNA von Sham-Ratten (scheinoperierte Kontrolltiere) eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit *Pfu*-Polymerase und den TRPV1-spezifischen Primern *EcoRI* rVR1F und *XbaI* rVR1R mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen durchgeführt. Das entstandene PCR-Produkt (2545 bp) und der Vektor pcDNA3.1(+) wurden mit *EcoRI* und *XbaI* gespalten, aufgereinigt und anschließend ligiert. Ein Kontrollverdau der Plasmid-DNA mit *EcoRI* und *XbaI* von insgesamt 16 Klonen ergab bei Klon 1 und 16 ein Insert der erwarteten Größe von > 2,5 kb. Ein weiterer Kontrollverdau der Klone 1 und 16 mit *SmaI*, lieferte die erwarteten Fragmente von 2766 bp und 5162 bp (Abb. 2.8).

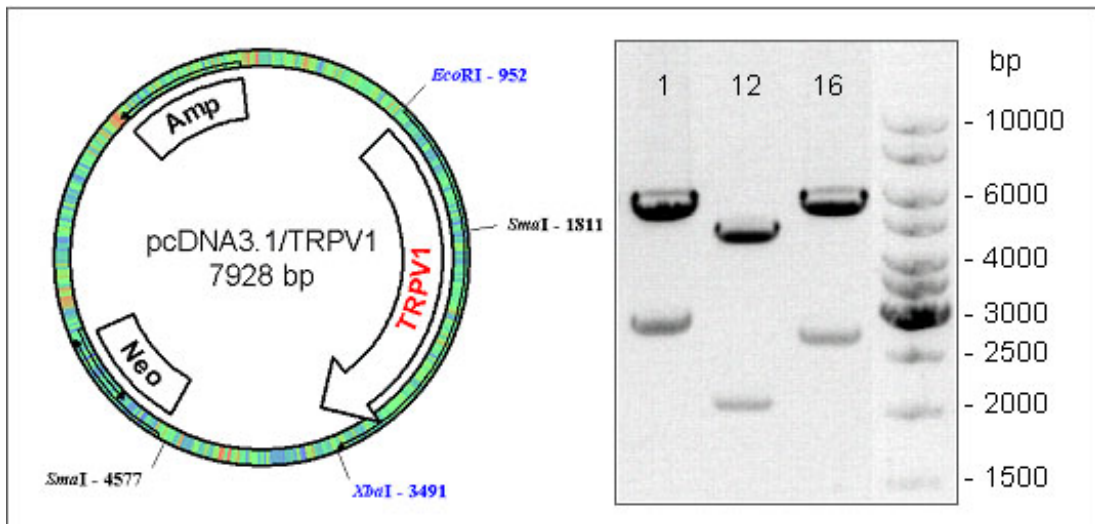


Abb. 2.8: Darstellung des Plasmids pcDNA3.1/TRPV1 und *SmaI*-Verdau der Klone 1, 12 und 16. Nach Restriktionsverdau zeigten die Klone 1 und 16 die erwarteten Fragmente von 2766 bp und 5162 bp.

Die Suche in der Rattengenom-Datenbank (Rat Genome Database, RGD) für TRPV1 ergab fünf Sequenz-Einträge (einzusehen unter <http://rgd.mcw.edu/tools/genes/geneview.cgi?id=628841>). 2002 wurde die Nomenklatur der TRP-Kanäle vereinheitlicht^[9], VR1 wurde in TRPV1 umbenannt. In der Legende von Abb. 2.9 sind zu den Datenbank-Einträgen (Accession No.) von TRPV1 die alten Namen zusätzlich aufgeführt, da es Einträge von verschiedenen Laboratorien mit unterschiedlicher Namensvergabe gibt. Im folgenden wird die neue Nomenklatur verwendet, Proteine werden mit Großbuchstaben (TRPV1) und Nukleotidsequenzen mit Kleinbuchstaben und kursiv (*Trpv1*) beschrieben. Wenn nicht anders angegeben, handelt es sich um Protein- bzw. DNA-Sequenzen der Ratte.

Die vollständige Sequenzierung des Klons pcDNA3.1/TRPV1 (Klon 1) ergab, dass dieser mit der *Trpv1*-Sequenz der Ratte (GenBank Accession No. AF040873) identisch ist. Diese Sequenz repräsentiert den offenen Leserahmen (ORF, open reading frame) des Vanilloid-Rezeptor 1 (TRPV1) der Ratte, dessen vollständige cDNA zuerst von Caterina et al.^[10] kloniert worden ist (GenBank Accession No. AF029310). Die Basensequenz von *Trpv1* in pcDNA3.1/TRPV1 (Klon 1) besitzt im Unterschied zu der von Caterina et al. klonierten *Trpv1*-Sequenz drei Einzelnukleotid-Austausche: der erste Basenaustausch (G → T) nahe dem N-Terminus von TRPV1 führt zu dem Aminosäureaustausch D18E, der zweite Basenaustausch (C → A) führt zu P96Q, während der dritte Basenaustausch (C → T)

keine Veränderung der Aminosäure V440 bewirkt. Diese Resultate wurden auch von der Firma Grüenthal in einer unabhängigen Klonierung von *Trpv1* bestätigt (Dr. Wade, Grüenthal GmbH, persönliche Mitteilung). Bei der von mir klonierten *Trpv1*-Sequenz handelt es sich also um die richtige Sprague-Dawley Ratten *Trpv1*-Sequenz (Abb. 2.9 und Tab. 2.3).

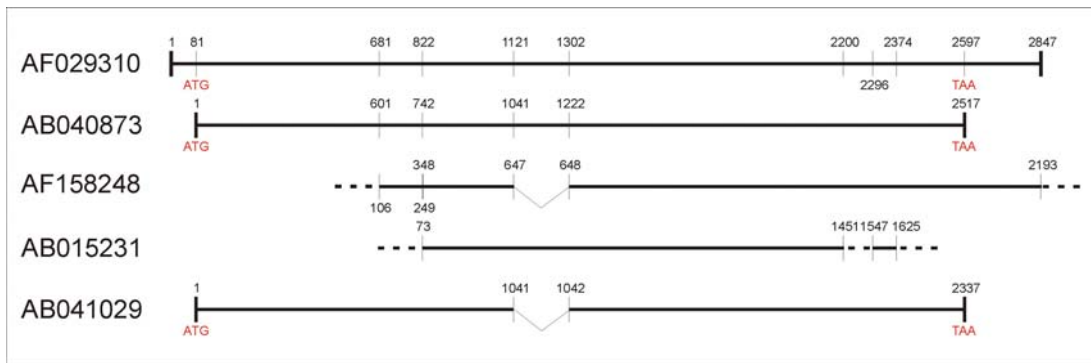


Abb. 2.9: Graphischer Vergleich von *Trpv1*-cDNA Sequenzen aus der Rattengenom-Datenbank. Accession No. AF029310, komplette cDNA mit 2847 bp, alter Name VR1^[10]; Accession No. AB040873, ORF der *Trpv1*-cDNA mit 2517 bp, alter Name VR1L1 (L für like)^[11]; Accession No. AF158248, N-terminal trunkierten *Trpv1*-Splicevariante (VR.5'sv) mit 2755 bp^[12]; Accession No. AB015231, stretch-inhibitable nonselective channel (SIC) mit 2354 bp^[13] und Accession No. AB041029 mit 2337 bp, alter Name VR1L2 (nur in der Datenbank).

| Acc. No. | alter Name | Codon für AS 18 | Codon für AS 96 | Codon für AS 440 |
|----------|------------|-----------------|-----------------|------------------|
| AF029310 | rVR1 | 132 GAG | 366 CCG | 1398 GTC |
| AB040873 | rVR1L1 | 52 GAT | 286 CAG | 1318 GTT |
| AB041029 | rVR1L2 | 52 GAT | 286 CAG | 1138 GTT |

Tab. 2.3: Unterschiede in den *Trpv1*-Nukleotidsequenzen und daraus resultierende AS-Austausche. Die Sequenz von AB040873 ist bis auf die drei Einzelnukleotid-Austausche der Codons für AS 18, AS 96 und AS 440 identisch mit dem offenen Leserahmen von *Trpv1* aus der kompletten mRNA-Sequenz AF029310. AS = Aminosäure.

2.2.1.1 Herstellung von GFP-gekoppelten TRPV1-Konstrukten und Deletionsmutanten von TRPV1

Die Expression von Proteinen, die mit dem grünfluoreszierenden Protein (GFP) fusioniert sind, lässt sich nach Anregung mit UV-Licht unter dem Fluoreszenzmikroskop nachweisen. Zur Unterstützung der Analyse der Lokalisation von TRPV1 mittels indirekter Immunfluoreszenz und für TRPV1-Knock-Down Experimente mit Antisense-Oligonukleotiden oder siRNA, die im Rahmen des BMBF-Schmerzprojektes von Dr. Jens Kurreck durchgeführt werden, wurden mittels TOPO-Klonierung TRPV1-Konstrukte mit C- und N-terminal gekoppeltem GFP hergestellt^[14,15]. Die kodierende Sequenz von TRPV1 wurde aus dem Vektor pcDNA3.1/TRPV1 mit Hilfe geeigneter Primer für die TOPO-Klonierung amplifiziert. Für die Insertion in den Vektor pcDNA/CT-GFP, mit dessen Hilfe TRPV1 als GFP-Fusionsprotein mit GFP am C-Terminus exprimiert werden soll, wurden die Primer TOPO-VR1F und TOPO-VR1R/CT verwendet, so dass die TRPV1-Sequenz kein Stopcodon mehr enthält. Für die Insertion in den Vektor pcDNA/NT-GFP wurden die Primer TOPO-VR1F und TOPO-VR1R/NT verwendet.

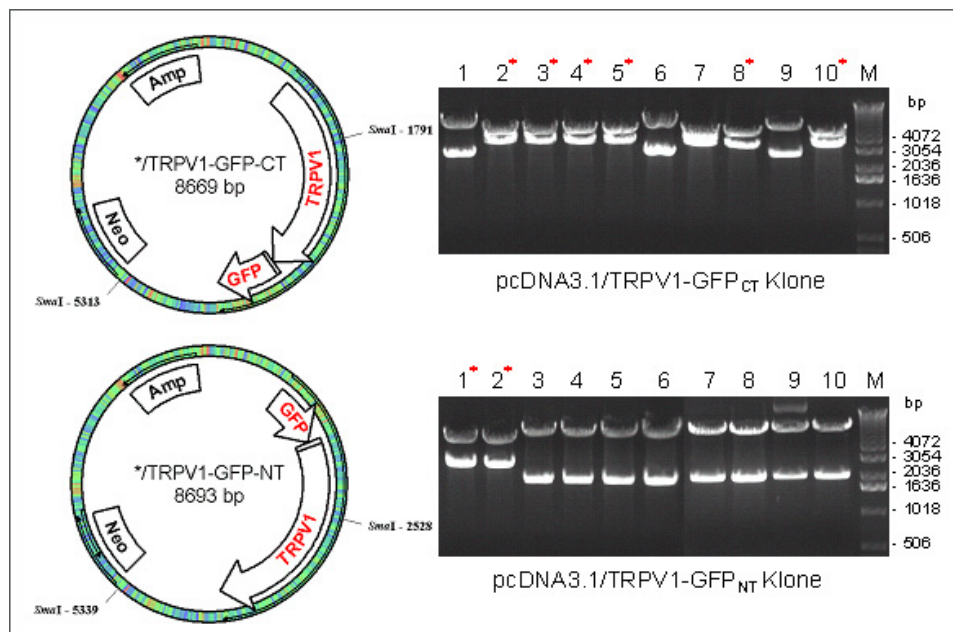


Abb. 2.10: Restriktionsverdau von je 10 Klonen pcDNA3.1/TRPV1-GFP_{CT} und pcDNA3.1/TRPV1-GFP_{NT} mit *SmaI*. Klone, die das richtig orientierte Insert tragen, sind markiert (*). Nach *SmaI*-Restriktionsverdau entstehen für die richtige Orientierung in pcDNA3.1/TRPV1-GFP_{CT} Fragmente der Länge 3522 bp und 5117 bp, in pcDNA3.1/TRPV1-GFP_{NT} Fragmente der Länge 2811 bp und 5882 bp.

Nach der Klonierung wurde die richtige Orientierung des Inserts durch Restriktionsverdau mit *SmaI* nachgewiesen. *SmaI* schneidet jeweils nur einmal im Vektor pcDNA3.1 und in der kodierenden Sequenz von TRPV1. Je nach Orientierung des Inserts ergeben sich unterschiedliche Bandenmuster im Agarosegel. Für pcDNA3.1/TRPV1-GFP_{CT} konnten sechs Klone mit der richtigen Orientierung, für pcDNA3.1/TRPV1-GFP_{NT} zwei positive Klone generiert werden (Abb. 2.10). Mittels Sequenzierung wurden Veränderungen der Basenzusammensetzung ausgeschlossen. Nach Expression beider Konstrukte in F11-Zellen, konnten die TRPV1-Fusionsproteine anhand der Fluoreszenz von GFP in den Zellen nachgewiesen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden noch eine Reihe weitere TRPV1-Konstrukte mit C- und N-terminalen Deletionen hergestellt. Diesen Konstrukten fehlt der gesamte cytoplasmatische N- bzw. C-Terminus oder aber das resultierende Protein besteht lediglich aus dem cytoplasmatischen N- oder C-Terminus. Eine Übersicht aller in dieser Arbeit generierten TRPV1-Konstrukte mit Namen und graphischer Darstellung befindet sich im Anhang 9.1.

2.2.2 Expression und Lokalisation von TRPV1 in F11- und HEK293-Zellen

In der Literatur wird TRPV1 überwiegend in der Fibroblasten-Zelllinie HEK293 exprimiert^[16-18] und analysiert. Da TRPV1 *in vivo* aber überwiegend von sensorischen Neuronen exprimiert wird, erschien mir ein neuronales Expressionssystem für die Charakterisierung seiner biochemischen Eigenschaften sinnvoll. Zur transienten Expression von TRPV1 wurde von mir eine vom DRG abgeleitete Zelllinie, die Hybridomzelllinie F11, in unserem Labor etabliert (die Zellen wurden uns freundlicherweise von Prof. Mark C. Fishman, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA zur Verfügung gestellt). Diese Zellen wurden durch die Fusion von Hinterwurzelganglienzellen (DRG-Zellen) der Ratte mit Neuroblastomzellen der Maus (N18TG2) gewonnen^[19]. Die F11-Zellen zeigen eine neuronale Morphologie und besitzen charakteristische Eigenschaften von DRG-Zellen^[20,21].

Eine Voraussetzung für biochemische Studien war die Nachweisbarkeit von heterolog exprimiertem TRPV1 in HEK293- und F11-Zellen. Sowohl HEK293- als auch F11-Zellen wurden mit der *Trpv1*-cDNA transfiziert, die Zellysate 48 h später mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem polyklonalen Antiserum gegen den C-Terminus des Ratten-TRPV1 untersucht (das Antiserum wurde uns freundlicherweise von Dr. M. K.-H. Schäfer, Phillips-Universität Marburg, zur Verfügung gestellt). In Lysaten von transient transfizierten HEK293- und F11-Zellen, detektierte das anti-TRPV1-Serum spezifisch eine diffuse Bande bei ~115 kD und eine Doppelbande bei ~100 kD und 97 kD (Abb. 2.11) Diese Banden wurden bei untransfizierten Zellen und auch bei Verwendung des Immunisierungspeptides in der Lösung des ersten Antikörpers zur Blockierung des TRPV1-spezifischen Antikörpers nicht beobachtet. Die anti-TRPV1-immunreaktive Bande bei 97 kD stimmt mit dem berechneten Molekulargewicht des Ratten-TRPV1 überein. Die beiden Banden mit höherem Molekulargewicht lassen auf posttranslationale Modifikationen von TRPV1 schließen. Die diffuse Bande bei ~115 kD könnte ein Hinweis auf ein Glycoprotein sein. Durch eine komplexe Asn-Glycosylierung mit einer heterogenen Komposition aus Carbohydraten, könnten sich die Wanderungsgeschwindigkeiten im Gel minimal unterscheiden und so die diffuse Bande hervorrufen.

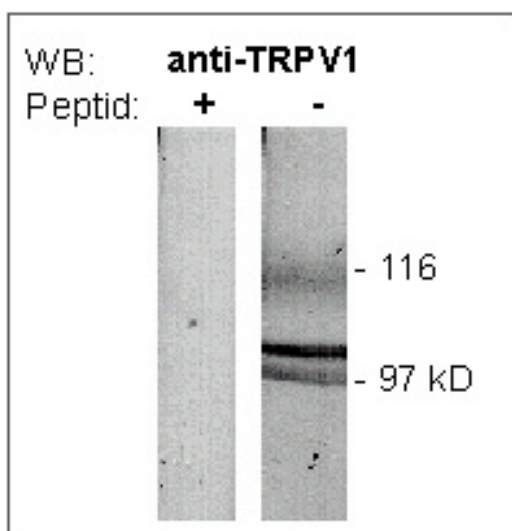


Abb. 2.11: VR1-Westernblot von Zellysaten aus transient transfizierten F11-Zellen. Das Anti-TRPV1 Serum detektiert spezifisch eine Doppelbande bei ~100 kD und 97 kD und eine diffuse Bande bei ~115 kD in transient transfizierten F-11 und HEK293-Zellen (hier ist nur der WB von F11-Zellen gezeigt).

Die subzelluläre Lokalisation von TRPV1 wurde 48 h nach transienter Transfektion von HEK293- und F11-Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz und konfokaler

Laserscanning-Mikroskopie analysiert. In HEK293-Zellen kommt der Rezeptor an intrazellulären Membranen, hauptsächlich am endoplasmatischen Retikulum, und an der Plasmamembran vor. In F11-Zellen dagegen war die TRPV1-Immunreaktivität vorwiegend an der Plasmamembran und in neuritenartigen Ausläufern lokalisiert. In einigen Fällen wurde auch eine punktförmige TRPV1-Immunreaktivität nachgewiesen, was darauf hinweisen könnte, dass TRPV1 an distinkten Stellen der Plasmamembran Cluster bildet. Die Anfärbung von F-Aktin mit Rhodamin-Phalloidin zeigte, dass TRPV1 an der Plasmamembran teilweise mit F-Aktin colokalisiert (Abb. 2.12 E und F).

Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass heterolog exprimierter TRPV1 in F11-Zellen hauptsächlich an der Plasmamembran vorkommt. Im Gegensatz dazu ist TRPV1 in anderen Zelllinien wie HEK293- oder COS7-Zellen^[22] hauptsächlich am ER lokalisiert. Die Lokalisation des Rezeptors an der Plasmamembran ist in einer neuronalen, vom DRG abgeleiteten, Zelllinie deutlicher als in einer von Fibroblasten abgeleiteten Zelllinie. Da die F11-Zellen aufgrund ihres Gewebetyp-Hintergrundes eine naturnähere zelluläre Umgebung für TRPV1 darstellen als Fibroblasten, verwendete ich sie als bevorzugtes Expressionssystem für die meisten weiteren Experimente.

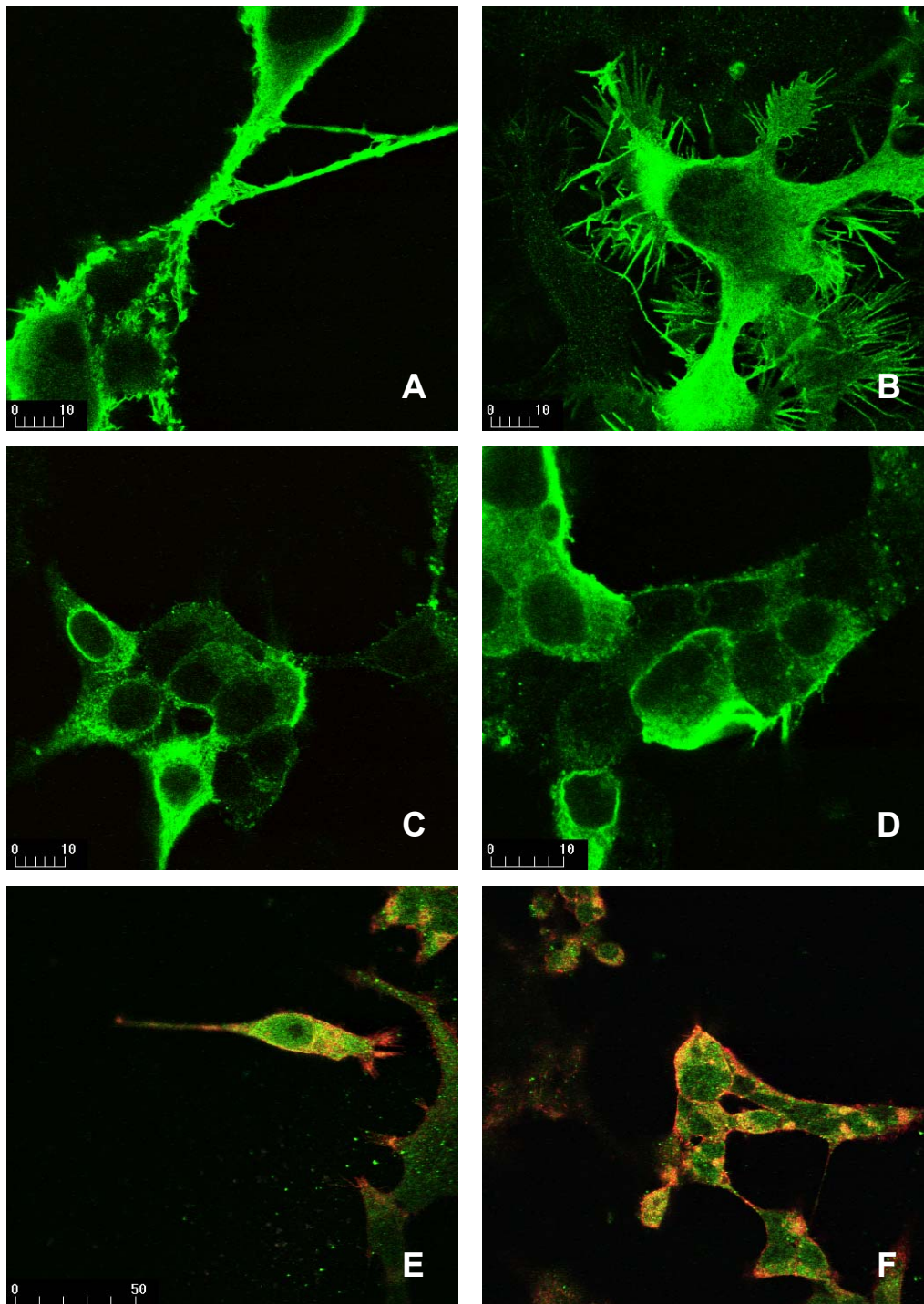


Abb. 2.12: Indirekte Immunfluoreszenz mit polyklonalem anti-TRPV1-Serum. In TRPV1 transfizierten F11-Zellen (A und B) ist der Rezeptor überwiegend an der Plasmamembran lokalisiert, während er in HEK293-Zellen (C und D) hauptsächlich im ER, aber auch an der Plasmamembran vorkommt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass TRPV1 (grün) mit F-Aktin (rot) in HEK293-Zellen (E und F) co-lokalisiert vorliegt (gelb).

2.2.2.1 Analyse der Lokalisation von TRPV1-Deletionsmutanten

Um strukturelle Determinanten der TRPV1-Lokalisation aufzufinden, wurden im Rahmen des Projektes verschiedene TRPV1-Konstrukte hergestellt und die subzelluläre Lokalisation des Rezeptors nach Transfektion von F11-Zellen nachgewiesen. In einem ersten Ansatz stellte sich heraus, dass nach Fusion des GFP an den N-Terminus des Rezeptors, dieser nicht an der Plasmamembran, sondern intrazellulär zu finden ist (TRPV1-GFP_{NT}, Abb. 2.13 A). Deshalb wurde bei allen weiteren Konstrukten das GFP C-terminal an TRPV1 fusioniert. Das Fusionsprotein TRPV1-GFP_{CT} zeigt eine dem nicht modifizierten Protein entsprechende Lokalisation in F11-Zellen an der Plasmamembran (Abb. 2.13 B). Die Lokalisation ist auch dann gestört, wenn der N-terminale, cytoplasmatische Anteil des Proteins vollständig fehlt (TRPV1₄₂₁₋₈₃₈-GFP_{CT}, Abb. 2.13 C). TRPV1 ist dann überwiegend an intrazellulären Membranen zu finden. Umgekehrt hat das C-terminale, cytoplasmatische Ende keinen Einfluss auf die Verteilung innerhalb der Zelle. Der Rezeptor, dem der C-Terminus fehlt, war weiterhin an der Plasmamembran lokalisiert (TRPV1₁₋₆₉₀-GFP_{CT}, Abb. 2.13 D). Der N-terminale Bereich von TRPV1 scheint folglich für die Plasmamembran-Lokalisation des Rezeptors wichtig zu sein. Die Analyse von TRPV1-Deletionsmutanten ohne GFP durch einen indirekten Immunfluoreszenz-Nachweis erbrachte Ergebnisse, die mit den GFP-Fluoreszenz-Ergebnissen konsistent waren. Der Vorteil der indirekten Immunfluoreszenz war die stärkere und länger anhaltende Fluoreszenz, die eine deutlichere Unterscheidung hinsichtlich der Lokalisation ermöglichte (Abb. 2.14, 2.15). Der C-terminal deletierte TRPV1 mit TM-Bereichen befindet sich an der Plasmamembran (TRPV1₁₋₆₉₀, Abb. 2.14 A). Der N-terminal deletierte TRPV1 mit TM-Bereichen befindet sich dagegen intrazellulär (TRPV1₄₂₁₋₈₃₈, Abb. 2.14 C). Interessanterweise waren die cytoplasmatischen N- und C-terminalen TRPV1-Fragmente auch dann mit Membranen assoziiert, wenn keine Transmembranbereiche vorhanden waren. Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen zeigten, dass das N-terminale cytoplasmatische Fragment von TRPV1 überwiegend an der Plasmamembran lokalisiert war (TRPV1₁₋₄₃₁, Abb. 2.14 B), wohingegen der C-Terminus ohne TM-Bereiche mit intrazellulären Membranen, teilweise an Endosomen-ähnlichen Strukturen, assoziiert war (TRPV1₆₈₆₋₈₃₈, Abb. 2.14 D). Dies spricht für spezifische Interaktionen der TRPV1-Termini mit Proteinen und/oder Lipiden zellulärer

Membranen, wobei N- und C-terminale Fragmente zu unterschiedlichen Membranen dirigiert werden. Eine genauere Analyse mit der konfokalen-Laserscanning-Mikroskopie bestätigte die Ergebnisse für den C-terminalen Bereich. Dagegen konnte das N-terminale Fragment von TRPV1 ohne Transmembranbereiche mit dieser Methode doch nur intrazellulär an Strukturen des Endoplasmatischen Retikulums nachgewiesen werden (TRPV1₁₋₄₃₁, Abb. 2.15 B). Der C-terminal deletierte TRPV1 befindet sich wie erwartet an der Plasmamembran (TRPV1₁₋₆₉₀, Abb. 2.15 A).

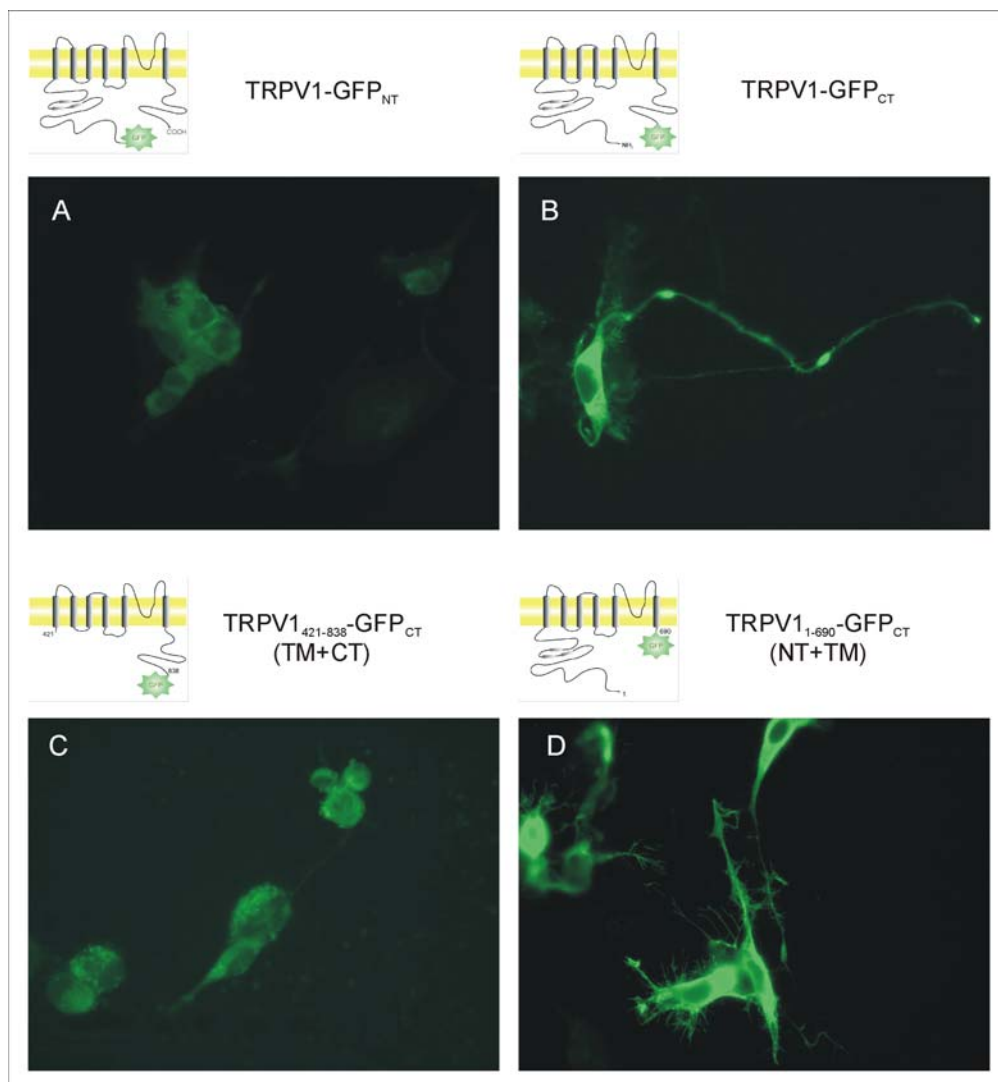


Abb. 2.13: Fluoreszenzaufnahmen verschiedener TRPV1-GFP-Konstrukte in F11-Zellen. Der vollständige TRPV1 mit C-terminal fusioniertem GFP (B) sowie die Deletionsmutante, die nur den cytoplasmatischen N-Terminus mit allen Transmembransequenzen und darauffolgendes fusioniertes GFP enthält (D) befinden sich an der Plasmamembran. Fehlt der cytoplasmatische N-terminale Bereich oder ist er mit GFP fusioniert, so befindet sich TRPV1 intrazellulär (A und C). Aufnahmen stammen vom einem Fluoreszenz-Mikroskop mit 40× Objektiv.

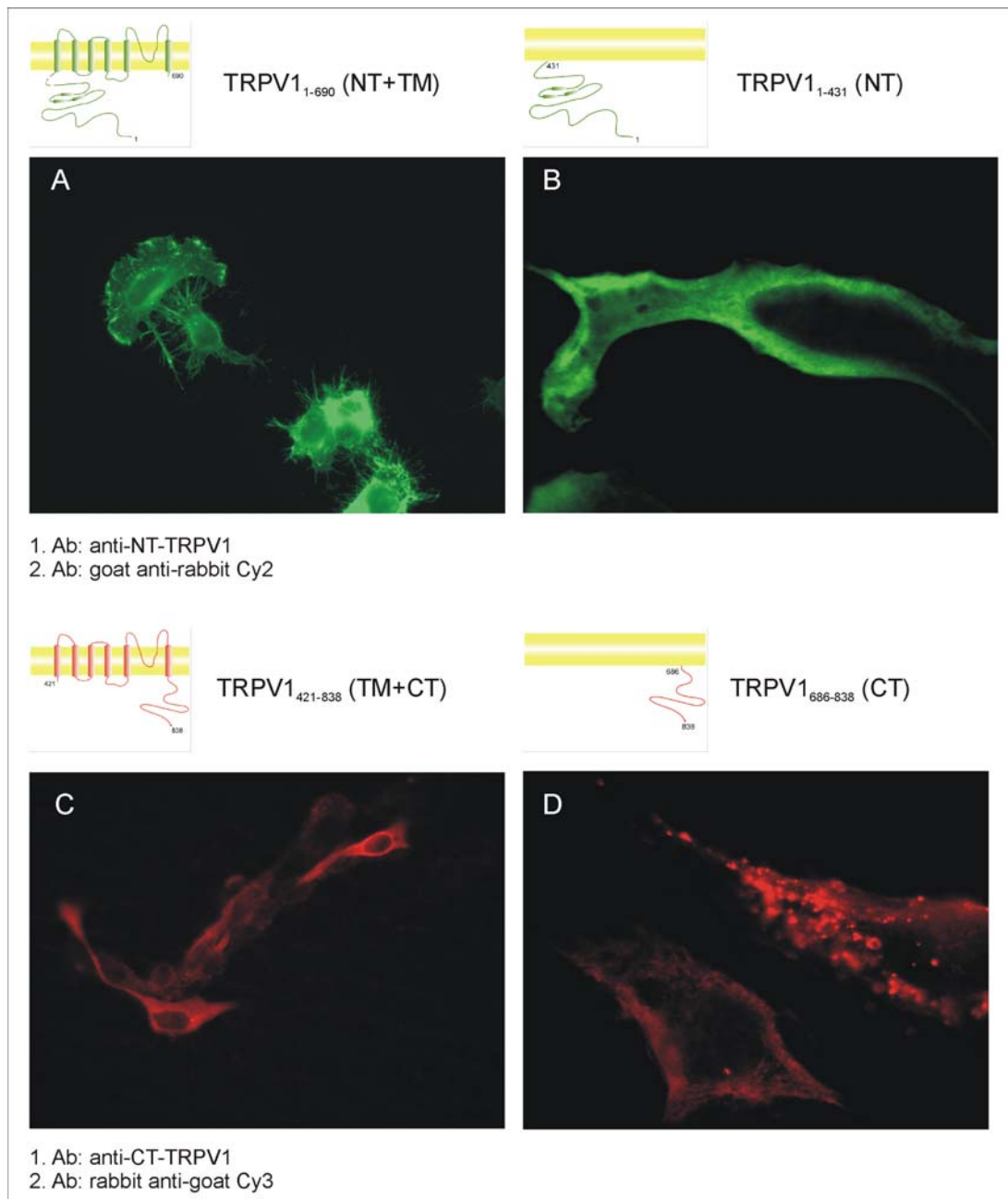
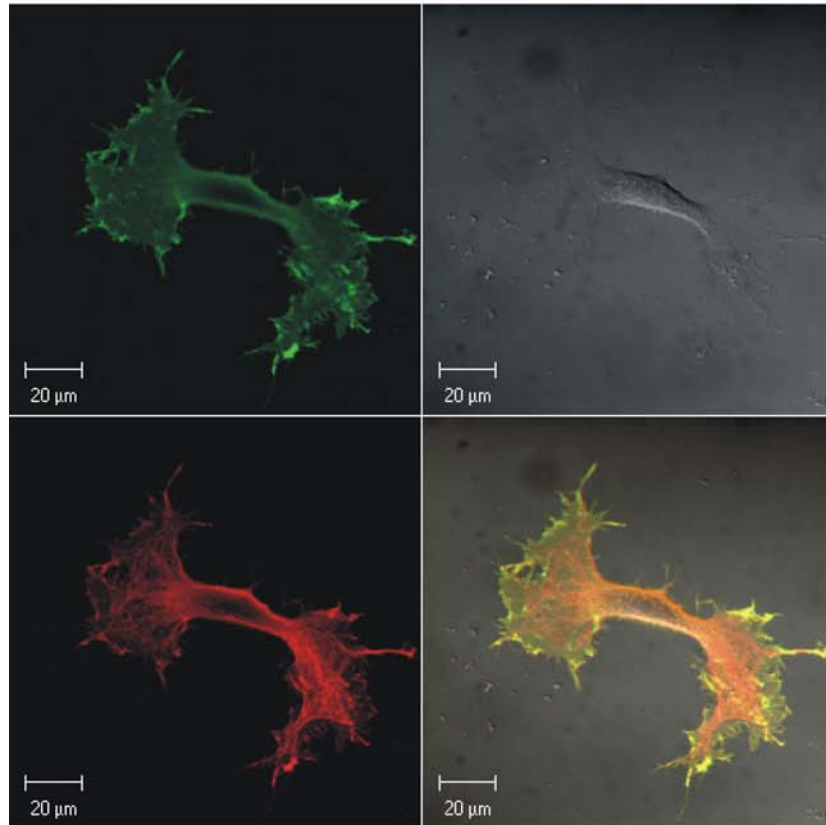
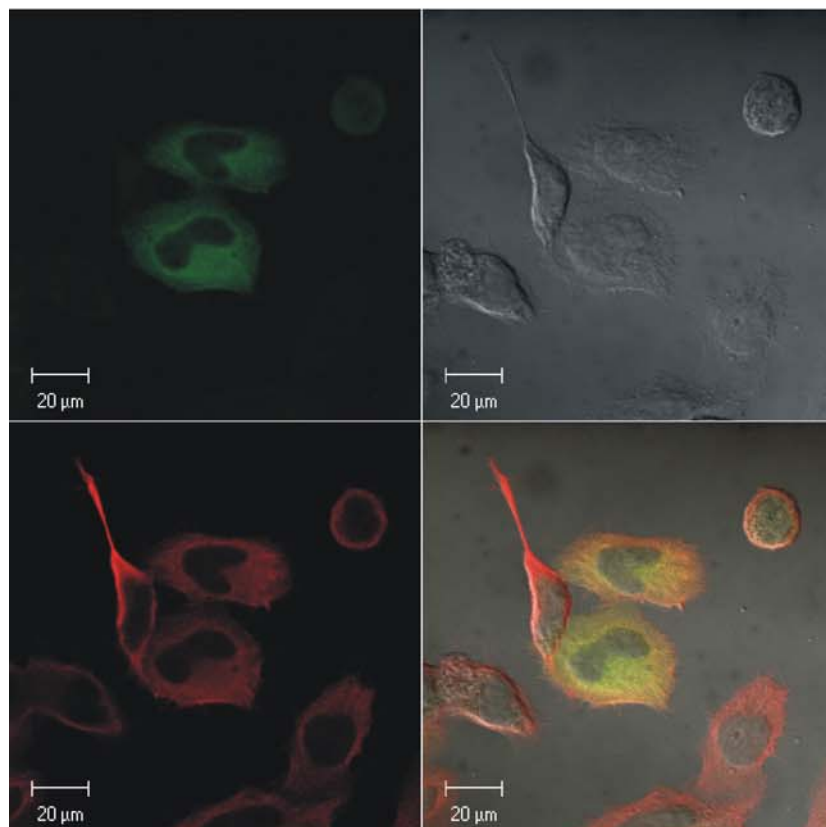


Abb. 2.14: Indirekte Immunfluoreszenz von TRPV1-Deletionsmutanten in F11-Zellen. Die Aufnahmen stammen vom einem Fluoreszenz-Mikroskop mit 40× Objektiv (A und C) und 63× Objektiv (B und D).

Nächste Seite:

Abb. 2.15: Indirekte Immunfluoreszenz von A) TRPV1₁₋₆₉₀ (NT-TM) und B) TRPV1₁₋₄₃₁ (NT) in F11-Zellen. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe des konfokalen Laserscanning-Mikroskops LSM 510 mit dem Plan-Apochromat 63×/1.4 Oil DIC-Objektiv angefertigt. Gezeigt ist jeweils TRPV1 (grün), Tubulin alpha (rot), Normaski-DIC und eine Überlagerung der drei Bilder.

A) TRPV1₁₋₆₉₀ (NT+TM)B) TRPV1₁₋₄₃₁ (NT)

2.2.3 Untersuchung der Glycosylierung von TRPV1 in transfizierten F11- und HEK293-Zellen

Im TRPV1-Westernblot von Zellysaten transient transfizierter F11- und HEK293-Zellen zeigte sich ein Bandenmuster mit drei Banden (97, 100 and 115 kD), was auf eine mögliche Glycosylierung von TRPV1 hindeuten könnte (Abb. 2.11). Um diese posttranslationale Modifikation zu untersuchen und ihre Bedeutung zu charakterisieren, wurden Zellysate transient transfizierter F11/TRPV1 und HEK293/TRPV1 Zellen mit verschiedenen Glycosidasen inkubiert. Die Endoglycosidase H (Endo H) entfernt Zucker vom High-Mannose-Typ, die aus der komplexen Glycosylierung stammen. Peptid-N-Glycosidase F (PNGase F) hingegen entfernt alle Zuckerreste der Glycosylierungen an Asparaginresten (Asn).

Nach Inkubation mit Endoglycosidase H konnte die obere Bande der TRPV1-Doppelbande bei ~100 kD nicht mehr detektiert werden, während die untere Bande bei 97 kD proportional an Intensität zunahm. Die diffuse Bande bei ~115 kD blieb erhalten. Die Inkubation mit PNGase F resultierte in einem vollständigen Verlust der Banden bei 100 und 115 kD. Somit konnte eindeutig gezeigt werden, dass es sich bei TRPV1 um ein Glycoprotein handelt, welches Asn-glycosyliert vorliegt und sowohl Glycosylierung vom High-Mannose-Typ als auch komplexe Glycosylierung aufweist (Abb. 2.16).

Um die Glycosylierungsstelle in der TRPV1-Sequenz der Ratte genau zu bestimmen, wurde zunächst eine Datenbanksuche nach dem Asn-X-Ser/Thr Konsensusmotiv für eine Asn-Glycosylierung durchgeführt. Dazu wurde das Programm ScanProsite verwendet (<http://us.expasy.org/tools/scanprosite>), welches fünf mögliche Asn-Glycosylierungsstellen im TRPV1-Protein vorschlägt: 170-173 NDTI, 191-194 NASY, 213-216 NMTL, 604-607 NNSL und 748-751 NWTT. Eine weitere Datenbanksuche mit dem Programm TMHMM zur Vorhersage von Transmembran-Helices in Proteinen (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>) ergab, dass sich von den fünf möglichen Glycosylierungsstellen nur die im Bereich der Aminosäuren 600-656, zwischen den Transmembransequenzen 5 und 6, auf der extrazellulären Seite befindet. Unter der Voraussetzung, dass die vorgeschlagene TRPV1-Membrantopologie richtig ist, kommt nur die Position Asn604 als mögliches Konsensusmotiv für eine Glycosylierung in Frage (Abb. 2.17).

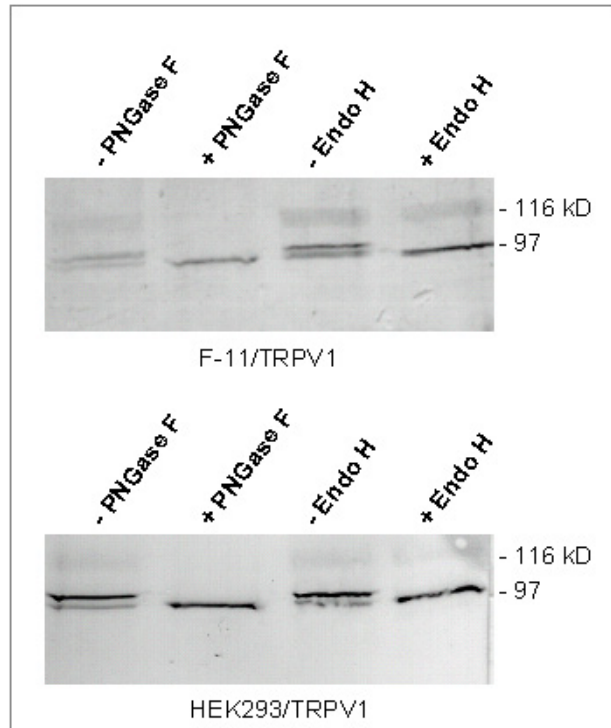


Abb. 2.16: Deglycosylierung von Lysaten transient transfizierter F11- und HEK293-Zellen mit PNGase F und Endo H. Das anti-TRPV1 Serum detektiert spezifisch eine Doppelbande bei ~100 kD und 97 kD und eine diffuse Bande bei ~115 kD in transient transfizierten F11- und HEK293-Zellen. Nach Inkubation mit PNGase F ist ein vollständiger Verlust der Banden von 100 und 115 kD zu beobachten, während die Intensität der 97 kD-Bande zunimmt. Nach Inkubation mit Endo H verschwindet nur die Bande bei 100 kD, die diffuse Bande bei 115 kD bleibt erhalten. Auch hier nimmt die Intensität der Bande bei 97 kD zu.

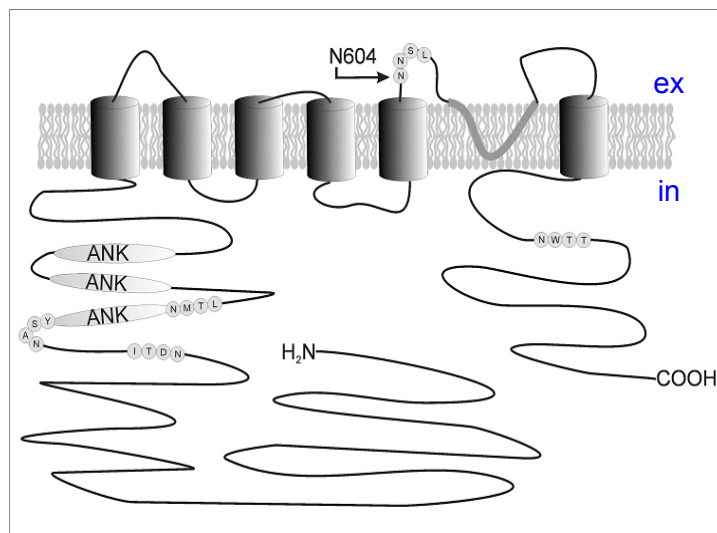


Abb. 2.17: Vorgeschlagene Membrantopologie von TRPV1. Gezeigt sind die Ankyrin-Repeat Domänen (ANK) und fünf Asn-X-Ser/Thr Konsensussequenzen als potentielle Asn-Glycosylierungsstellen. Der N- und C-Terminus sind intrazellulär (in) lokalisiert. Als einzig mögliche Asn-Glycosylierungsstelle kommt nur die extrazellulär (ex) lokalisierte Position Asn604 in Frage.

Um die Position Asn604 als einzig mögliche Glycosylierungsstelle zu bestätigen, wurde eine basenspezifische Mutagenese der *Trpv1*-cDNA durchgeführt. Eine Punktmutation an Position 1811 des offenen Leserahmens (1811A→C) führte zu einem Austausch der Aminosäure Asn zu Thr in Position 604 (604Asn→Thr). Diese basenspezifische Mutagenese von pcDNA3.1/TRPV1 zu pcDNA3.1/TRPV1mut lieferte in *Trpv1mut* eine zusätzliche *BbsI*-Schnittstelle. Somit konnte die erfolgreiche Mutagenese mit einem *BbsI*-Restriktionsverdau verfolgt werden. pcDNA3.1/TRPV1 liefert nach *BbsI*-Restriktionsverdau die erwarteten Fragmente von 779, 1415 und 5734 bp. Nach Mutagenese 1811A→C entstehen in pcDNA3.1/TRPV1mut die Fragmente 152, 779, 1263 und 5734 bp (Abb. 2.18). Die eingeführte Mutation wurde anschließend durch Sequenzierung bestätigt.

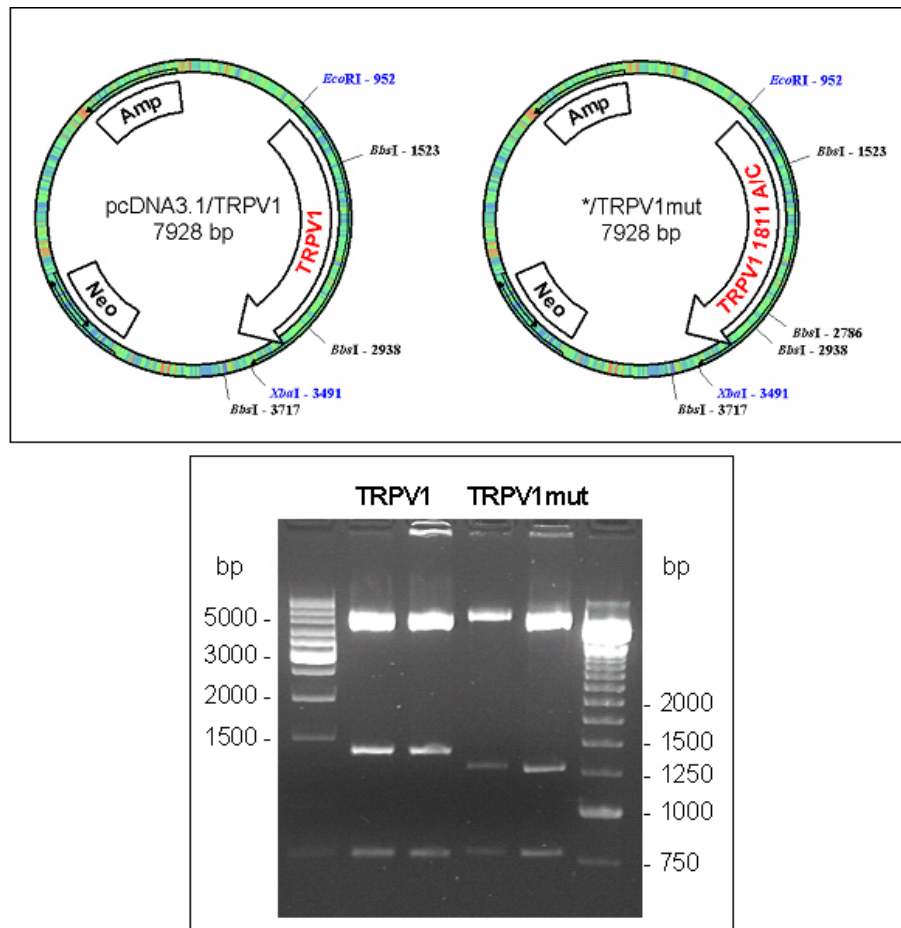


Abb. 2.18: Restriktionsverdau der Plasmide pcDNA3.1/TRPV1 und pcDNA3.1/TRPV1mut mit *BbsI*. pcDNA3.1/TRPV1 zeigt nach *BbsI*-Restriktionsverdau die erwarteten Fragmente von 779, 1415 und 5734 bp. Nach Mutagenese 1811A→C entsteht eine zusätzliche *BbsI*-Schnittstelle (*), wodurch ein Fragment von 1263 Basen in pcDNA3.1/TRPV1mut entsteht.

Zur Untersuchung der Glycosylierung wurde der Deglycosylierungsassay mit HEK293 oder F11-Zellen wiederholt. Dazu wurden beide Zelllinien mit der *Trpv1*-Wildtyp-cDNA (pcDNA3.1/TRPV1) und der mutierten cDNA *Trpv1mut* (pcDNA3.1/TRPV1mut) transient transfiziert. Die Zellhomogenate wurden mit Endo H oder PNGase F inkubiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Wieder zeigte der Wildtyp-TRPV1 das erwartete Muster aus drei Banden im TRPV1-Westernblot (Doppelbande bei 97 kD und ~100 kD, diffuse Bande bei 115 kD). Nach Deglycosylierung mit Endo H verschwand die Bande bei ~100 kD, nach Deglycosylierung mit PNGase F waren beide oberen Banden bei ~100 kD und 115 kD nicht mehr detektierbar. Im Falle des mutierten TRPV1 (604Asn→Thr) war schon ohne Inkubation mit einer Glycosidase nur eine einzige Bande bei 97 kD zu detektieren. Die Asn-Glycosylierung ist somit in TRPV1mut vollständig verschwunden (Abb. 2.19). Dieses Ergebnis wurde sowohl mit HEK293- als auch F11-Zellen erhalten. Diese Daten zeigen, dass die Position Asn604 tatsächlich die einzige Glycosylierungsstelle im TRPV1 ist. Zusätzlich erhärten sie die intrazelluläre Lokalisation der vier anderen potentiellen Asn-Glycosylierungsstellen und unterstützen das vorgeschlagene Modell für die TRPV1-Topologie (Abb. 2.17).

Die Lokalisation der TRPV1-Glycosylierungsmutante an der Plasmamembran in transfizierten F11-Zellen entspricht der des Wildtyp-TRPV1 (nicht gezeigte Immunfluoreszenzen).

Um den möglichen Einfluss der Glycosylierung auf die Funktion des Rezeptors zu untersuchen, wurden Messungen des Calcium-Einstroms durchgeführt. Mit Wildtyp-TRPV1 bzw. Glycosylierungs-defizienten TRPV1 transient transfizierte HEK293-Zellen zeigen in einem ersten Test identische Antworten nach Aktivierung des Rezeptors durch Capsaicin oder NADA bei pH 6,5 und 7,5 (Dr. Hans-Jörg Behrendt, Grünenthal, persönliche Kommunikation). Auch die elektrophysiologischen Eigenschaften scheinen Pilotstudien zufolge identisch zu sein (Elektrophysiologische Untersuchungen wurden einerseits durchgeführt an transfizierten Oocyten von Herrn Dr. Vulco, Universität Mainz, und andererseits an transfizierten F11-Zellen von Frau Dr. Wirkner, Universität Leipzig, persönliche Kommunikation).

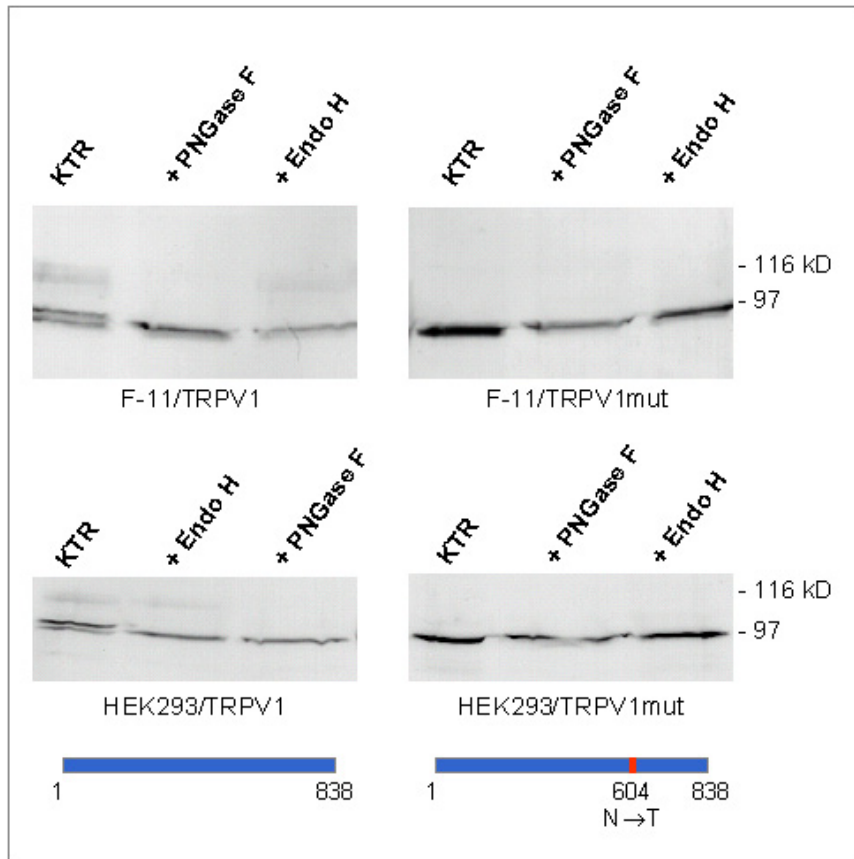


Abb. 2.19: Deglycosylierung von TRPV1 und TRPV1mut mit PNGase F und Endo H in transient transfizierten F11- und HEK293-Zellen. TRPV1 zeigt das bereits beschriebene Muster aus drei Banden. Nach Deglycosylierung mit Endo H verschwand die Bande bei ~100 kD, mit PNGase F beide oberen Banden bei ~100 kD und 115 kD. Beim mutierten TRPV1 (604Asn→Thr) erscheint schon ohne Inkubation mit einer Glycosidase nur eine einzelne Bande bei 97 kD.

2.2.4 Untersuchung der Quartärstruktur von TRPV1 in transfizierten F11- und HEK293-Zellen

Für die Interpretation von Ligandenbindungsdaten ist es wichtig, die Quartärstruktur von Liganden-gesteuerten Ionenkanälen zu kennen. Viele Rezeptoren und Ionenkanäle sind Teil eines Multiproteinkomplexes, wobei die Zusammensetzung des Komplexes und die daraus resultierenden Protein-Protein-Wechselwirkungen die Funktion eines Rezeptors determinieren können. Zur Untersuchung der Quartärstruktur von TRPV1 wurden transient transfizierte HEK293- und F11-Zellen verwendet. Um die Komponenten der Zellysate unter nativen oder kontrolliert denaturierenden Bedingungen aufzutrennen, wurde die Blaue Native Gelelektrophorese (BN-PAGE) mit Gradientengelen aus 4-16% Polyacrylamid verwendet. Bei dieser Methode wird als Ladungsträger für die Elektrophorese

anstelle von SDS Coomassie Blue verwendet, welches im Gegensatz zu SDS die Protein-Protein-Interaktionen nicht beeinflusst. Nach Elektroblothing wurden die Blotmembranen mit dem polyklonalen anti-TRPV1-Serum untersucht.

Wurde das Homogenat transient transfizierter F11/TRPV1 oder HEK293/TRPV1 unter nativen Bedingungen mit 1% Dodecylmaltosid solubilisiert und ohne jede Denaturierung in der BN-PAGE aufgetrennt, so war im anschließenden Western Blot die TRPV1-Immunreaktivität an Positionen zu finden, die den Geltaschen des BN-Polyacrylamidgeles entsprach. Dies bedeutet, dass TRPV1 Teil eines Proteinkomplexes oder Aggregates ist, der zu groß ist, um in das native Gel einzudringen. Nach Zugabe geringer Mengen SDS dissoziiert der TRPV1-Komplex und die TRPV1-Immunreaktivität war vorwiegend auf Höhe des TRPV1-Dimers, aber auch auf Höhe von Trimeren und Tetrameren zu beobachten. Als Kontrolle wurden alle Protein-Protein-Interaktionen von TRPV1 durch Zugabe von 8 M Harnstoff, 75 mM DTT und 1,5% SDS zerstört, so dass nur noch das TRPV1-Monomer beobachtet werden konnte (Abb. 2.20A). Das Monomer erscheint als Doppelbande, was auf die Glycosylierung des Rezeptors zurückzuführen ist (siehe 2.2.3).

Wurden die Proteine der Particulate-Fraktion (Membranproteine und membranassoziierte Proteine, siehe 6.7.4) transient transfizierter HEK293/TRPV1 mit 1% Dodecylmaltosid mit oder ohne 0,5% SDS extrahiert und der Überstand mit Dimethyladipimidat (DMA) vernetzt, konnten nur noch Monomere und Dimere nach BN-PAGE beobachtet werden (Abb. 2.20B).

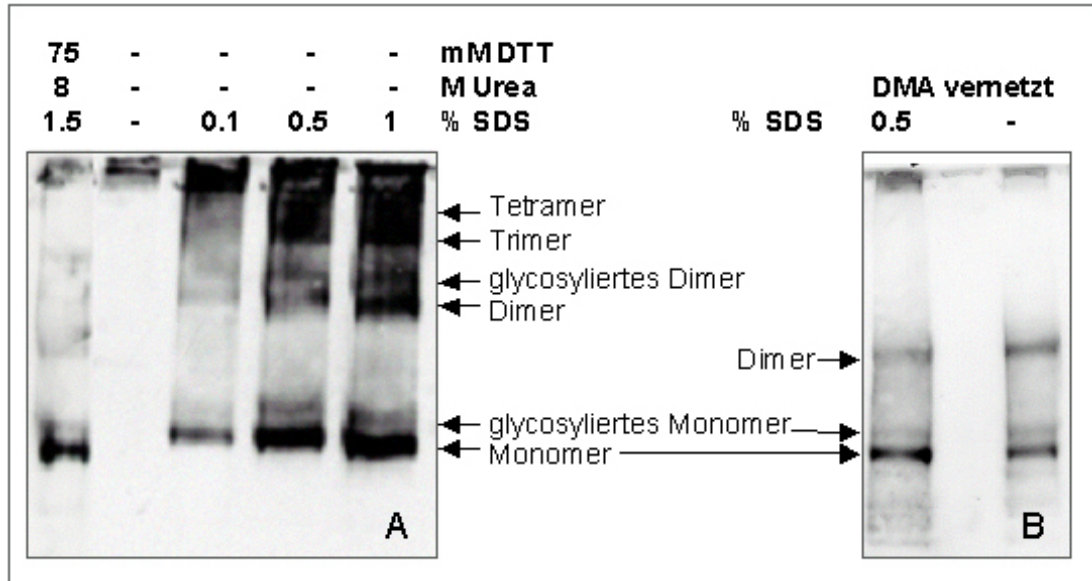


Abb. 2.20: TRPV1-Westernblot nach 4-16% BN-PAGE von Zellysaten transient transfizierter F11/TRPV1 Zellen (A) und nach chemischer Vernetzung transient transfizierter HEK293/TRPV1 Zellen mit DMA (B). (A) Mit steigenden SDS-Konzentrationen zerfällt der TRPV1-Komplex und bei 0,5 und 1% SDS lassen sich Mono-, Di-, Tri- und Tetramere nachweisen. (B) Nach chemischer Vernetzung mit DMA, ist nur noch das TRPV1-Monomer und das stabile TRPV1-Dimer zu detektieren. Das Molekulargewicht der TRPV1-Banden wurde anhand der Migration von Glutamat-Dehydrogenase-Oligomeren als Molekulargewichtsstandard abgeschätzt.

Um den TRPV1-Komplex genauer zu untersuchen, wurde als weitere Methode ein zweidimensionales Gelelektrophorese-System eingesetzt. Die erste Dimension war eine 4-16% BN-PAGE, die zweite Dimension eine klassische 10% SDS-PAGE. Mit Hilfe der zweiten Dimension konnte ein besserer Einblick in die TRPV1-Rezeptorzusammensetzung gewonnen werden, da hier die mögliche Tetramerstruktur denaturiert wurde und diese zu Monomeren zerfiel. Wie erwartet konnten in der zweiten Dimension Mono-, Di-, Tri- und Tetramer von TRPV1 als einzelne Proteinspots beobachtet werden. Wurden für diese Methode transient transfizierte F11/TRPV1mut Zellen verwendet, bei denen TRPV1 nicht mehr glycosyliert vorlag, fehlten die glycosylierten Oligomere, insbesondere das glycosylierte Monomer. Auf die Quartärstruktur an sich hatte die fehlende Glycosylierung jedoch keinen Einfluss. Zusätzlich wurden aber auch bei beiden TRPV1-Varianten noch zwei zusätzliche Proteinspots mit höherem Molekulargewicht erkennbar, die auf einen größeren Komplex hinweisen als das TRPV1-Tetramer (Abb. 2.21A).

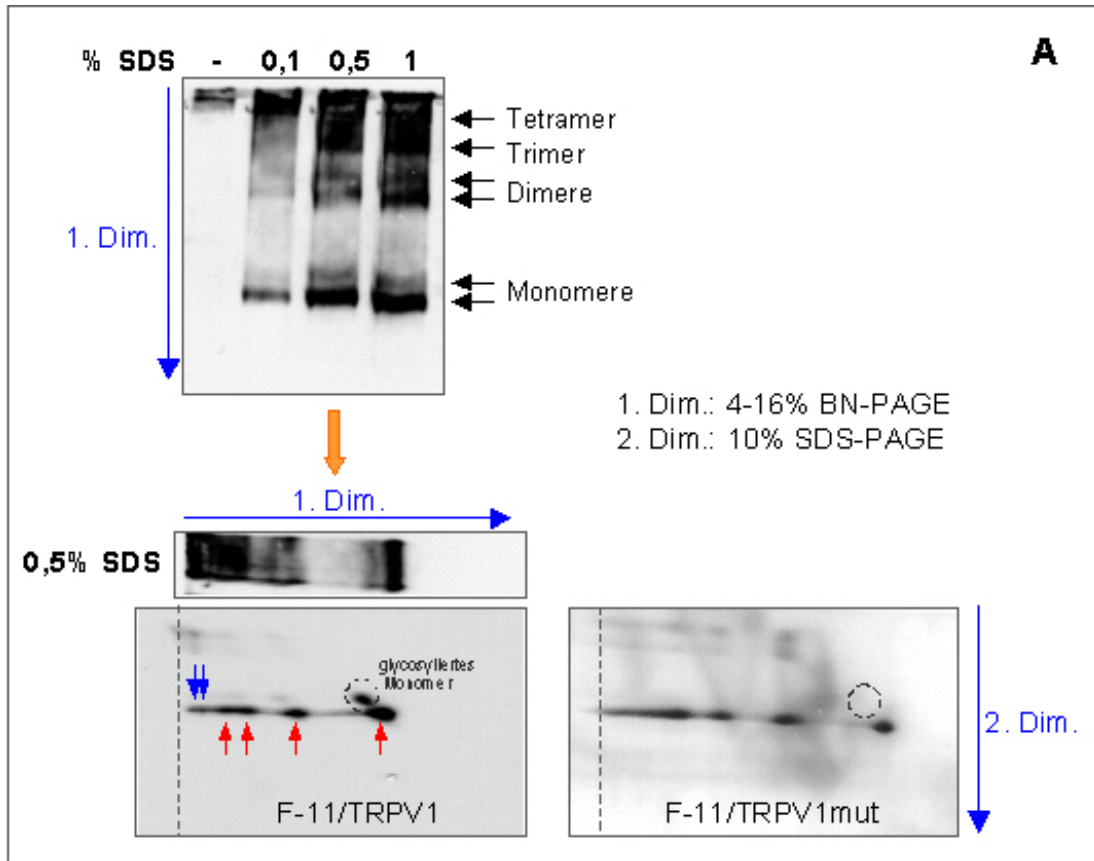


Abb. 2.21A: TRPV1-Westernblot nach der Auftrennung des TRPV1-Komplexes transient transfizierter F11/TRPV1 bzw. F11/TRPV1mut-Zellen mittels 2D-BN-PAGE. In der 2. Dimension sind die Proteinspots des TRPV1-Mono-, Di-, Tri- und Tetramers (rote Pfeile im Gel), sowie zwei zusätzliche Proteinspots (blaue Pfeile im Gel) klar zu erkennen. Nach Expression des Glycosylierungs-defizienten TRPV1-Konstruktes fehlten die oberen Spots, die dem glycosylierten Monomer entsprechen (gestrichelt umrandet).

Um ein besser aufgelöstes Immunreaktivitäts-Muster zu erhalten und die TRPV1-Komplexe besser zuordnen zu können, wurden als nächstes solubilisierte F11/TRPV1-Proben mit chemisch spaltbaren Crosslinkern verschiedener Länge vernetzt. Eingesetzt wurden N-Succinimidyl-3-[2-pyridyldithio]propionat (SPDP) mit einer Länge von 6,8Å, Dimethyl-3,3'-dithiobis[propionimidat] (DTBP) mit 11,9Å, 3,3'-Dithiobis[sulfosuccinimidyl]propionat] (DTSSP) mit 12Å und Sulfosuccinimidyl-6-[α -methyl- α -(2-pyridyldithio)toluamido]hexanoat (S-LC-SMPT) mit 20Å. Diese sollen den nativen Protein-Komplex in der ersten Dimension stabilisieren und sich dann in der zweiten Dimension durch β -Mercaptoethanol im Lämmli-Probenpuffer spalten lassen. Nach Auftrennung mittels 2D-BN-PAGE konnte mit allen Crosslinkern vornehmlich das TRPV1-Tetramer detektiert werden, das also

durch die Vernetzung deutlich stabilisiert wurde. Die Länge der Crosslinker spielte im Rahmen der hier verwendeten Reagenzien keine Rolle. Zusätzlich ließen sich hier auch wieder Proteinspots mit einem höherem Molekulargewicht als dem Tetramer ausmachen. Der entsprechende Komplex war nur knapp in das Gel der 1. Dimension eingedrungen und lief deshalb in der 2. Dimension am äußersten linken Rand des Gels (Abb. 2.21B).

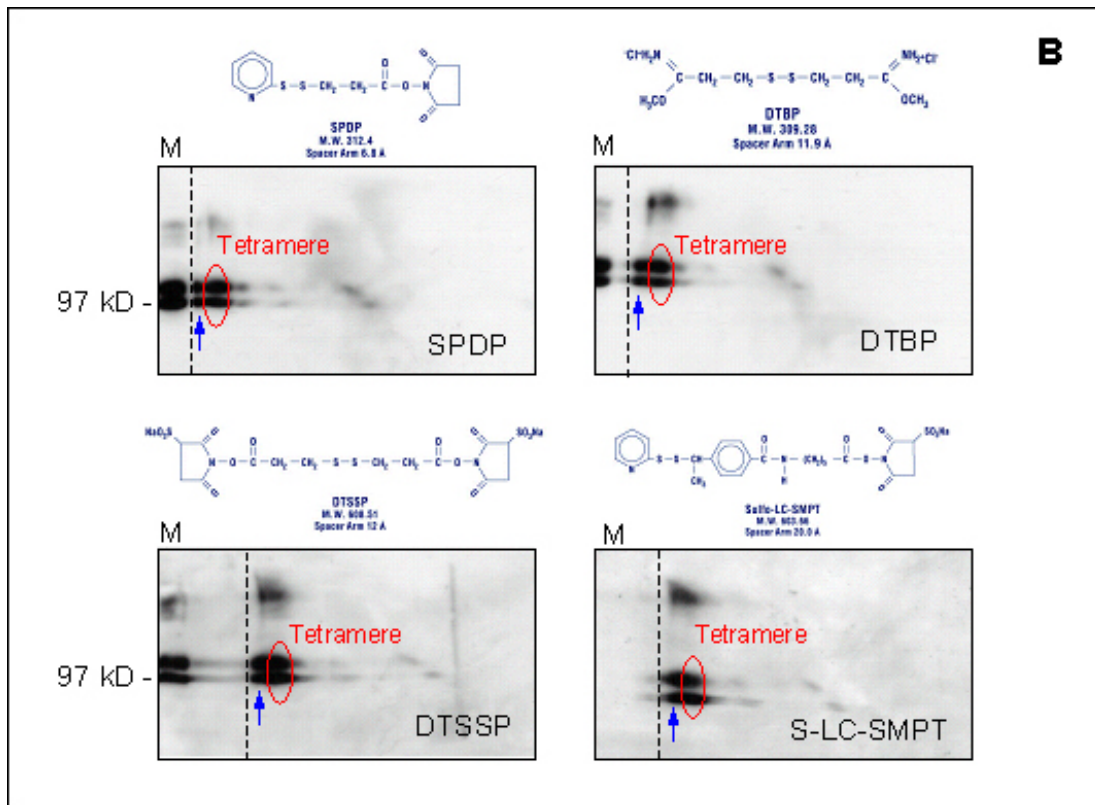


Abb. 2.21B: Darstellung des TRPV1-Tetramers in transient transfizierten F11-Zellen nach chemischer Vernetzung und 2D-BN-PAGE. Die chemische Vernetzung mit vier spaltbaren Crosslinkern verschiedener Länge lieferte bei allen vorwiegend das TRPV1-Tetramer (rot umrandet). Zusätzlich ließen sich noch Spots mit höherem Molekulargewicht ausmachen (blaue Pfeile). Die gestrichelten Linien markieren die Lage der oberen Ränder der Gele aus der ersten Dimension (4-10% BN-PAGE). Als Marker (M) diente Homogenat von transient transfizierten F11/TRPV1-Zellen in der zweiten Dimension (10% SDS-PAGE).

Um sicherzugehen, dass die Spots mit höherem Molekulargewicht als das TRPV1-Tetramer nicht von Aggregaten stammte, die sich eventuell während der Präparation formen und in den Taschen der ersten Dimension stecken blieben, bzw. nur unvollständig in das Gel eindringen, wurde die zweidimensionale Methode weiter

verändert. Damit der Proteinkomplex einfacher in das Gel der ersten Dimension eindringen konnte, wurde anstatt der BN-PAGE ein gemischtes 0,7% Agarose/2% Polyacrylamid-Gelsystem verwendet. Als zweite Dimension diente wieder die klassische 10% SDS-PAGE. Um den TRPV1-Komplex in der ersten Dimension zu stabilisieren, wurde der spaltbare Vernetzer DTPB verwendet. Auf diese Weise konnte der Protein-Komplex tatsächlich tiefer in das Gel der ersten Dimension eindringen. Die räumliche Auflösung der Spots in der zweiten Dimension war zwar geringer, dennoch ließen sich zwei distinkte Spots nachweisen, die sich an Positionen höheren Molekulargewichtes als die Tetramere befanden (Abb. 2.22). Somit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass TRPV1 in einem Komplex mit höherem molekularem Gewicht als das postulierte Tetramer vorliegt. Leider war kein guter Molekulargewichtsstandard verfügbar, um das genaue Molekulargewicht zu bestimmen. Es könnte sich um ein TRPV1-Hexamer oder Dimer des TRPV1-Tetramers handeln bzw. mit TRPV1 assoziierte Proteine erhöhen das Molekulargewicht.

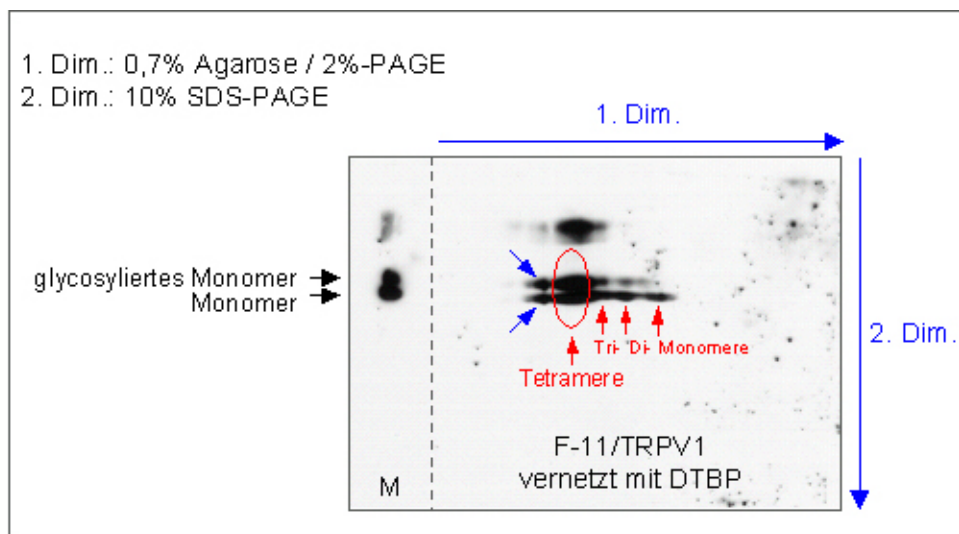


Abb. 2.22: TRPV1-Westernblot nach 2D-Agarose/Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Lysaten transient transfizierter und vernetzter F11-Zellen. Im Gegensatz zur BN-PAGE lief der TRPV1-Komplex hier weiter in das Gel der ersten Dimension ein, wodurch deutlich ein Komplex mit einem höheren Molekulargewicht als das Tetramer erkennbar wurde (blaue Pfeile). Das Molekulargewicht ließ sich allerdings nicht genau bestimmen, da es keine verlässlichen Marker in diesem Bereich gibt.

2.3 Klonierung und Charakterisierung des Vanilloid Rezeptor-ähnlichen Proteins 1 (VRL-1, TRPV2)

Während der Experimente zu der vorliegenden Arbeit wurde entdeckt, dass die verwendeten F11-Zellen endogen einen nahen Verwandten von TRPV1, nämlich TRPV2 exprimieren^[23]. Daher entschied ich mich, auch diesen Ionenkanal biochemisch zu charakterisieren. Zusätzlich zur Untersuchung des endogenen TRPV2 in F11-Zellen, wollte ich TRPV2 auch klonieren und analog zu TRPV1 in F11-Zellen zur Charakterisierung exprimieren.

Dr. Olaf Bender war als Gastwissenschaftler an diesem Projekt, vor allem an der Klonierung und Charakterisierung von TRPV2, maßgeblich beteiligt. Im Rahmen einer Diplomarbeit hat Lisa M. Münter die cDNA von Ratten- und Maus-TRPV2 in F11-Zellen nachgewiesen (siehe Legenden der Abbildungen).

2.3.1 Klonierung von TRPV2 aus Rattenhirn in pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO

Nach Amplifikation des 2280 bp offenen Leserahmens von *Trpv2* aus Gesamt-RNA von Rattenhirn wurden die PCR-Produkte in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO ligiert und in *E. coli* XL1-Blue kloniert. Von den 8 untersuchten Klonen wurden durch Restriktionsverdau 3 positive Klone identifiziert (Klon 4, 6, 8; Abb. 2.23) und anschließend sequenziert. Das letzte Codon für Aminosäure P761 und das Stopcodon wurden bei der PCR nicht amplifiziert, um nach Expression ein TRPV2-GFP Fusionsprotein zu erhalten. Die vollständige Sequenz von pcDNA3.1/TRPV2-GFP_{CT} war identisch mit der Ratten-TRPV2 Sequenz (GenBank Acc. No. AF129113) mit Ausnahme von vier Einzelnukleotidaustauschen in den Codons für Aminosäure 82 [573AGT → 573AGG], 367 [1428CCG → CTG], 397 [1518TTC → TTT] und 462 [1713TTT → TTC]. Diese Basenaustausche führen zu zwei Aminosäureaustauschen im TRPV2: S82R and P367L. Die beiden anderen Mutationen sind still.

Um das gesamte TRPV2 Protein ohne GFP zu erhalten, wurden eine *in-vitro*-Mutagenese von pcDNA3.1/TRPV2-GFP_{CT} durchgeführt, in welcher das Codon für

die Aminosäure P761 und ein Stopcodon eingeführt wurden. Die Sequenz des neuen Plasmids pcDNA3.1/TRPV2 wurde durch Sequenzierung beider Stränge bestätigt.

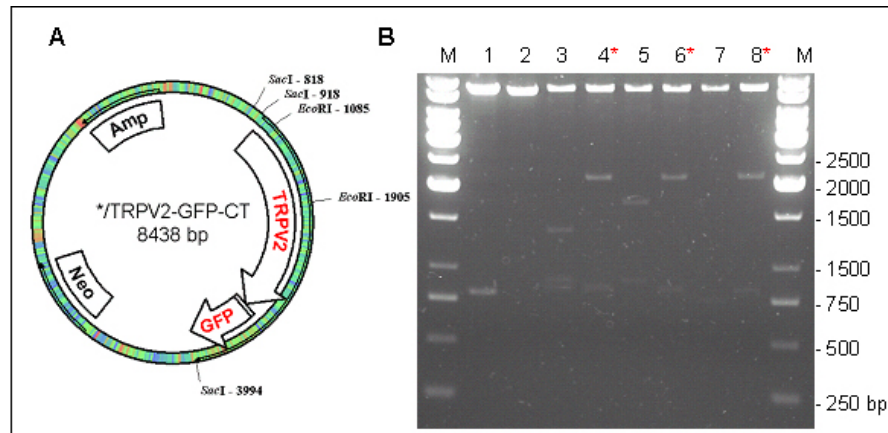


Abb. 2.23: Klonierung des vollständigen offenen Leserahmens von *Trpv2* in pcDNA3.1+/CT-GFP-TOPO. A) Schematische Darstellung von pcDNA3.1/TRPV1-GFP_{CT}, mit den für den Verdau verwendeten Restriktionsendonukleasen. B) Agarosegel nach Restriktionsverdau von 8 Klonen mit *EcoRI* und *SacI*. Die Fragmentlängen der mit * gekennzeichneten Klone entsprechen der richtigen Orientierung von *Trpv2* im Vektor. (Dr. Olaf Bender).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden wie für TRPV1 auch weitere TRPV2-Konstrukte mit C- und N-terminalen Deletionen hergestellt. Eine Übersicht aller in dieser Arbeit generierten TRPV2-Konstrukte mit Namen und graphischer Darstellung befindet sich im Anhang 9.1.

2.3.2 Maus- und Ratten-TRPV2 werden endogen in F11-Zellen exprimiert

Wie zuvor gezeigt, eignete sich die DRG-abgeleitete F11-Zelllinie besonders gut, um heterolog exprimierten TRPV1 zu untersuchen. Da Befunde anderer Arbeitsgruppen den Schluss nahe legten, dass die Zelllinie F11 den TRPV1-verwandten Rezeptor TRPV2 endogen exprimiert, wurde F11-Zellhomogenat mit einem gegen den C-Terminus von TRPV2 der Ratte und Maus gerichteten polyklonalen Antikörperserum getestet. Der TRPV2-Antikörper detektierte eine Proteinbande um ~84 kD (das berechnete Molekulargewicht liegt für TRPV2 der Ratte bei 86,7 kD und für TRPV2 der Maus bei 86 kD), welche bei Verwendung des Immunisierungspeptides nicht beobachtet werden konnte. Im Vergleich zu F11-Zellen besitzt TRPV2 in Rattenhirn

ein höheres Molekulargewicht (Abb. 2.24). Dr. Olaf Bender zeigte in Northern Blot Analysen und nach 3'- sowie 5'-RACE, dass es in F11-Zellen und Rattenhirn keinen Unterschied auf mRNA-Ebene gibt. Der auf Proteinebene gefundene Unterschied im Molekulargewicht konnte bisher nicht aufgeklärt werden.

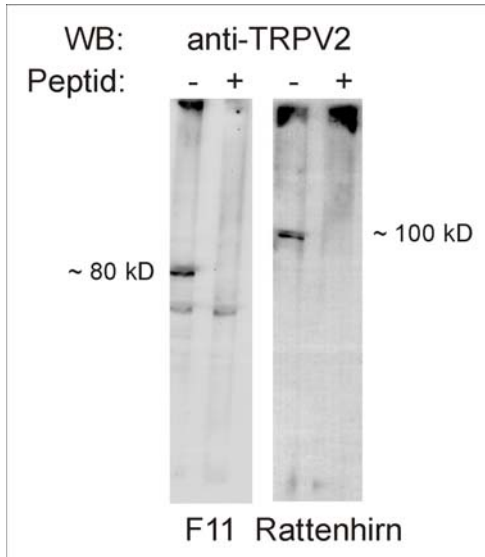


Abb. 2.24: TRPV2-Westernblot. Der polyklonale TRPV2-Antikörper gegen den C-Terminus von TRPV2 detektiert eine Bande bei >80 kD in F11-Zellhomogenat und eine Bande von ~100 kD in Rattenhirn-Homogenat. Die Immunreaktivität konnte mit 5 µg/ml Peptid (KNSASEEDHLPLQVLQSP-COOH) korrespondierend zum C-Terminus von TRPV2 verdrängt werden.

Um zu prüfen, ob die komplette *Trpv2*-mRNA in F11-Zellen vorhanden ist, wurden Primer für eine überlappende Darstellung des offenen Leserahmens von *Trpv2* in PCR-Fragmenten gemäß Acc. No. AF129113 hergestellt: Fragment **A**: 34-568 bp = 534 bp, Fragment **B**: 549-1205 bp = 656 bp, Fragment **C**: 1061-1897 bp = 836 bp und Fragment **D**: 1618-1897 bp = 633 bp.

Obwohl im Agarosegel für jedes PCR-Produkt nur eine Bande zu erkennen war, lieferten Sequenzanalysen verschiedener Klonierungsexperimente entweder die *Trpv2*-Sequenz der Ratte oder *Trpv2*-Sequenz der Maus. Um eine mögliche Expression von TRPV2 der Maus in F11-Zellen zu überprüfen, wurden die PCR-Produkte in einem 6%igen nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Hierbei zeigte sich eine klare Auftrennung in jeweils zwei Banden bei den Fragmenten A, B und D, wobei die obere Bande immer mit der Kontrollsequenz des *Trpv2* aus Rattenhirn korrespondierte (Abb. 2.25).

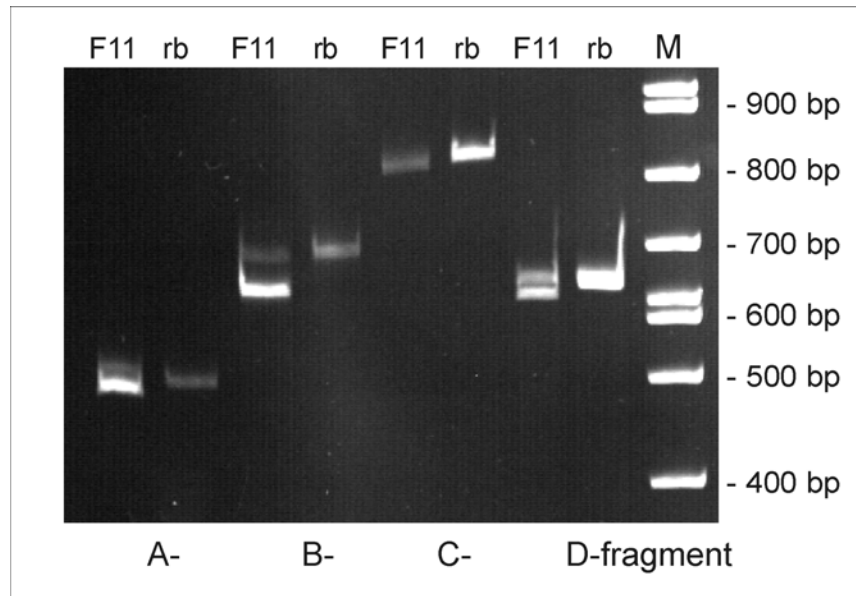


Abb. 2.25: Nicht-denaturierende PAGE überlappender RT-PCR Produkte aus F11-Zellen und Rattenhirn. RT-PCR mit cDNA aus F11-Zellen und Ratten-spezifischen TRPV2-Primern resultierte in zwei Banden für die Fragmente A, B und D, wohingegen eine RT-PCR mit cDNA aus Rattenhirn (rb) jeweils nur eine einzelne Bande ergab. (Lisa M. Münter).

Beide PCR-Fragmente B aus F11-Zellen wurden ausgeschnitten und in den pCRII-TOPO Vektor inseriert. Sequenzanalysen zeigten tatsächlich, dass die weniger weit migrierende Bande mit der Ratten-*Trpv2* Sequenz (Acc. No. AF129113), die weiter migrierende Bande hingegen der Maus-*Trpv2* Sequenz (Acc. No. NM_011706) entsprach. Ein Sequenzvergleich der offenen Leserahmen von Ratten-*Trpv2* und Maus-*Trpv2* zeigt eine 92%ige Sequenzidentität. Die Länge des offenen Leserahmens von *Trpv2* der Ratte beträgt 2286 bp, während *Trpv2* der Maus 2271 bp besitzt. Daraus resultieren Proteine mit 761 Aminosäuren für Ratten-TRPV2 und 756 Aminosäuren für Maus-TRPV2, die sich nicht mittels SDS-PAGE voneinander trennen lassen. Mit Hilfe der gewählten Primer zur Untersuchung des Ratten-*Trpv2* in F11-Zellen konnte also durch die PCR auch das Mausortholog amplifiziert werden (Abb. 2.26).

Um die Herkunft des Maustranskriptes zu überprüfen wurde die F11-Parental-Zelllinie N18TG2 (Maus Neuroblastom) untersucht und die Expression der *Trpv2*-mRNA nachgewiesen (Abb. 2.27A). Als Kontrolle dienten Rattenhirn und cDNA aus F11-Zellen. In einer 6%igen nicht-denaturierenden PAGE spalteten sich die PCR-Fragmente A, B und D aus F11-Zellen wieder in zwei Banden auf. Die Wanderungsgeschwindigkeit der höheren Bande entsprach der Kontrolle aus

Rattenhirn-cDNA, die Wanderungsgeschwindigkeit der niedrigeren Bande entsprach der Kontrolle aus N18TG2-cDNA (Abb.2.27B). Die Frage, ob beide Gene (Ratten- und Maus-*Trpv2*) in derselben Zelle exprimiert werden, konnte mittels Einzelzell-RT-PCR beantwortet werden. In allen analysierten F11-Zellen (n = 15) konnte die Expression beider *Trpv2*-Spezies gezeigt werden. Die Auftrennung der RT-PCR-Produkte von Fragment D resultierte für jede Einzelzelle in zwei Banden (Abb. 2.27C) und nach Sequenzierung der oberen und unteren Fragmente einer F11-Einzelzelle konnten die vorherigen Ergebnisse bestätigt werden.



Abb. 2.26: Sequenzvergleich der offenen Leserahmen von Ratten-*Trpv2* (rVRL1; Acc. No. AF129113) und Maus-*Trpv2* (mVRL1; Acc. No. NM_011706). Die farbigen Pfeile markieren die Primersequenzen zur Amplifikation überlappender PCR-Fragmente von TRPV2 (Gelb: Fragment A mit 534 bp, Grün: Fragment B mit 656 bp, Orange: Fragment C mit 836 bp, Blau: Fragment D mit 633 bp).

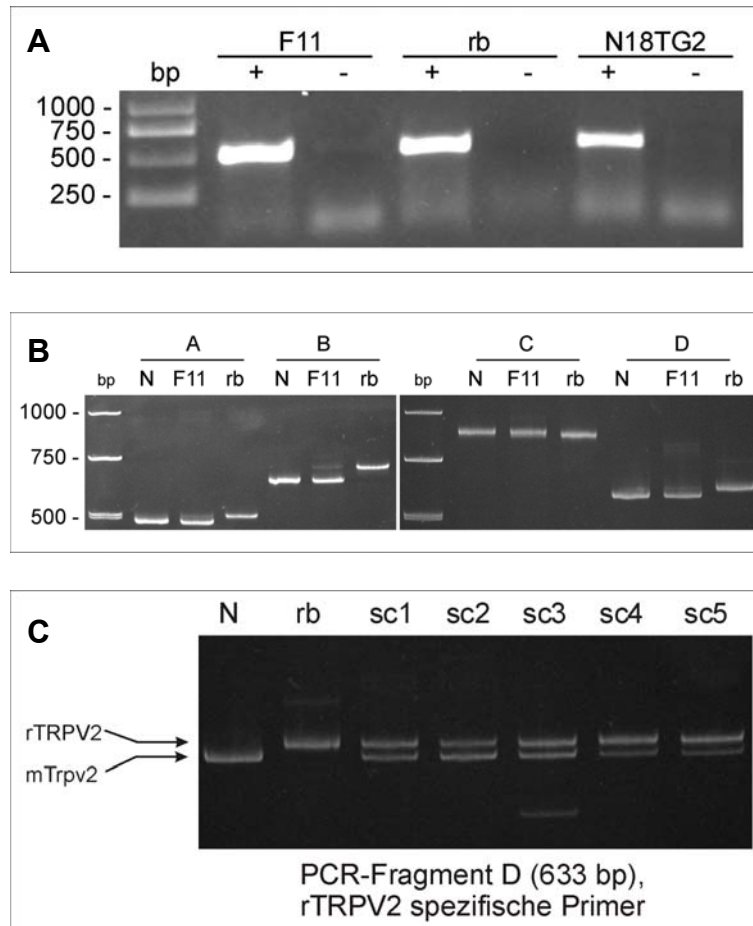


Abb. 2.27: **A)** RT-PCR zum Nachweis der TRPV2-Expression in N18TG2-Zellen. RT-PCR mit *Trpv2*-spezifischen Primern für Fragment A resultierte in einem Produkt bei den Kontrollen (F11, rb) und auch bei der F11-Vorläuferzelllinie N18TG2. +/-: mit/ohne Reverse Transkriptase. **B)** Nicht-denaturierende PAGE überlappender RT-PCR-Produkte aus F11-Zellen, Rattenhirn und N18TG2-Zellen. Die RT-PCR ergab für die Fragmente A, B und D zwei separate Banden aus F11-cDNA (F11), aber nur jeweils eine Bande aus der cDNA von Rattenhirn (rb) bzw. N18TG2 (N). **C)** Nicht-denaturierende PAGE der Einzelzell-RT-PCR von Fragment D. Einzelne F11-Zellen (sc1-5) zeigten jeweils zwei Banden für das Fragment D. Die obere Bande korrespondiert mit der cDNA-Kontrolle aus Rattenhirn (rb), die untere Bande mit N18TG2 (N). Beide Fragmente aus der ersten Einzelzelle (sc1) wurden kloniert und sequenziert. (Dr. Olaf Bender).

2.3.3 Expression und Lokalisation von heterolog exprimiertem TRPV2 der Ratte im Vergleich zu endogenem TRPV2 in F11-Zellen

Zur Aufklärung der subzellulären Lokalisation des TRPV2-Rezeptors wurden sowohl TRPV2 als auch TRPV2-GFP heterolog in F11-Zellen exprimiert und im Vergleich zum endogenen TRPV2 nicht transfizierter F11-Zellen mit Hilfe von

Fluoreszenz-Mikroskopie sowie konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert. Der endogene TRPV2 wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz mit dem TRPV2-Antikörper überwiegend cytoplasmatisch in den F11-Zellen nachgewiesen, die Signale waren zudem sehr schwach. Im Gegensatz dazu zeigte sich der heterolog exprimierte TRPV2 in F11-Zellen hauptsächlich an der Plasmamembran und in Neuriten-ähnlichen Ausläufern, ähnlich der subzellulären Verteilung von TRPV1 (Abb. 2.28). Nach Fusion von GFP an den C-Terminus von TRPV2 war der Rezeptor in den Zellen hauptsächlich an intrazellulären Membranen (ER), aber auch an der Plasmamembran lokalisiert.

Die unterschiedliche Lokalisation von endogenem und überexprimiertem TRPV2 lässt die Hypothese zu, dass der endogene TRPV2 nur unter bestimmten Bedingungen an der Plasmamembran lokalisiert ist, während der überexprimierte TRPV2 überwiegend konstitutiv zur Plasmamembran dirigiert wird.

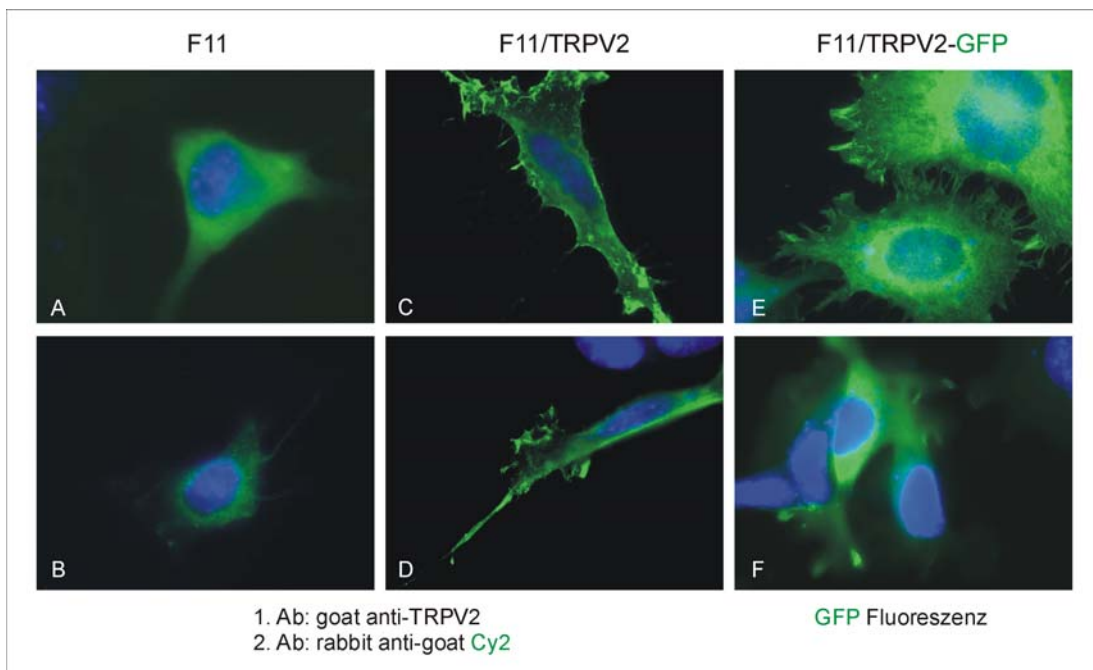


Abb. 2.28: Fluoreszenzaufnahmen von TRPV2 und TRPV2-GFP in F11-Zellen. A-D) Indirekte Immunfluoreszenz mit einem TRPV2-Antikörper. Untransfizierte F11-Zellen zeigen nur schwache Signale des endogenen TRPV2 im Cytoplasma (A/B). Mit TRPV2 transfizierte F11-Zellen (C/D) zeigen Lokalisation von TRPV2 hauptsächlich an der Plasmamembran. (E/F) GFP-Fluoreszenz von TRPV2-GFP transfizierten F11-Zellen. TRPV2-GFP ist an der Plasmamembran lokalisiert, es lässt sich aber auch in intrazellulären Membranen (ER) nachweisen. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI (blau). Die Aufnahmen stammen vom einem Fluoreszenz-Mikroskop mit 63× Objektiv.

2.3.4 Untersuchung der Glycosylierung von TRPV2 in transfizierten F11-Zellen

Lysate von F11-Zellen, die mit pcDNA3.1/TRPV2 transfiziert wurden, zeigten nach Westernblot-Analysen mit dem TRPV2-Antikörper mehreren Banden (>80 kD, 84 kD und 97 kD), was für ein Glycoprotein charakteristisch ist. Die Intensität der Bande bei 84 kD war dabei am stärksten. Um die Glycosylierung als mögliche posttranslationale Modifikation von TRPV2 zu bestätigen, wurde Zellysat von transient transfizierten F11-Zellen wie für TRPV1 beschrieben mit verschiedenen Glycosidasen inkubiert. Die Deglycosylierung von TRPV2 wurde im Westernblot mit dem TRPV2-Antikörper nachgewiesen. Nach Inkubation mit Endoglycosidase H war die obere Bande der TRPV2 Doppelbande bei >80/84 kD nicht mehr vorhanden. Die untere Bande bei 80 kD nahm dagegen proportional an Intensität zu, während die diffuse Bande bei 97 kD unverändert blieb (Abb. 2.29A). Weder die 97 kD- noch die 84 kD-Bande konnten nach Inkubation von F11/TRPV2-Zellysat mit PNGase F nachgewiesen werden, nur die 80 kD-Bande blieb erhalten. Diese Daten legen wie auch bei TRPV1 den Schluss nahe, dass sowohl Glycosylierung vom High-Mannose-Typ als auch komplexe Glycosylierung des TRPV2-Rezeptors vorliegt.

Identische Beobachtungen wurden mit pcDNA3.1/TRPV2-GFP_{CT} transfizierten F11-Zellen gemacht. GFP- (Abb. 2.29B) und TRPV2-Westernblots (Abb. 2.29C) von TRPV2-GFP transfizierten F11-Zellen zeigten unter Berücksichtigung des Molekulargewichts des GFP von ~30 kD ein analoges Bandenmuster des TRPV2-Glycoproteins. Die Hauptbande des TRPV2-GFP erscheint bei ~110 kD, die obere der Doppelbande bei 114 kD und die diffuse Bande bei 128 kD. Auch der endogene TRPV2-Rezeptor kann hier bei ~80 kD ausgemacht werden. Er ist nur mit dem TRPV2-Antikörper zu detektieren und liegt nicht glycosyliert vor. Niedermolekulare Banden in den Westernblots sind unspezifischen Reaktionen des TRPV2-Antikörpers.

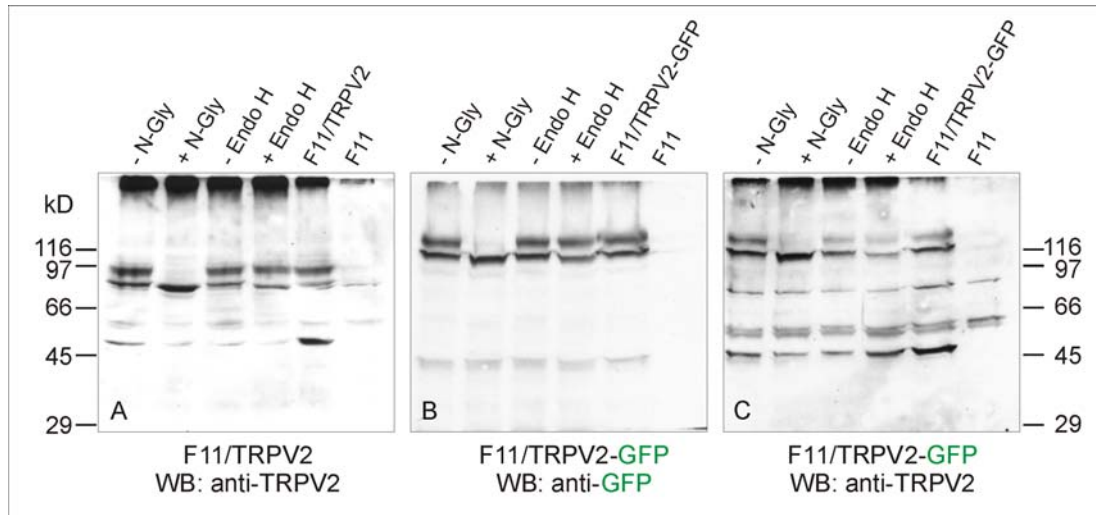


Abb. 2.29: Deglycosylierungsassay mit Zellysaten von F11/TRPV2 und F11/TRPV2-GFP mit PNGase F und Endo H. A) TRPV2-Westernblot (WB) TRPV2 transfizierter F11-Zellen. B) GFP- und C) TRPV2-Westernblot TRPV2-GFP transfizierter Zellen.

Um die Glycosylierungsstelle in der TRPV2-Sequenz der Ratte zu bestimmen, wurde wie bei TRPV1 eine Datenbanksuche nach dem Asn-X-Ser/Thr Konsensusmotiv für eine Asn-Glycosylierung durchgeführt. Mögliche Asn-Glycosylierungsstellen im TRPV2-Protein der Ratte sind 63-66 NTSA, 571-574 NNST and 572-575 NSTV. Im Hinblick auf die vorhergesagte Topologie von TRPV2 kamen nur die Positionen N571 und/oder N572 als mögliche extrazelluläre Glycosylierungsstellen zwischen TM5 und der Porenschleife in Frage (NNTV). Für TRPV2 der Maus konnte an analoger Stelle nur eine mögliche Asn-Glycosylierungsstelle 567-570 NTTV bestimmt werden.

Um die Position der Glycosylierung zu bestätigen, wurden drei basenspezifische Mutagenesen der *Trpv2*-cDNA durchgeführt. Innerhalb des offenen Leserahmens von *Trpv2* wurden Punktmutationen in die Positionen 1711A→C und 1714A→C eingeführt, sowie eine Doppelmutante 1711A→C/1714A→C generiert. Diese Veränderungen in der *Trpv2*-cDNA führten zu einem Austausch der Aminosäure Asn zu Thr in den Positionen N571T oder N572T bzw. NN571/572TT in TRPV2. Die erfolgreichen Mutagenesen wurden durch Sequenzierung bestätigt (Abb. 2.30).

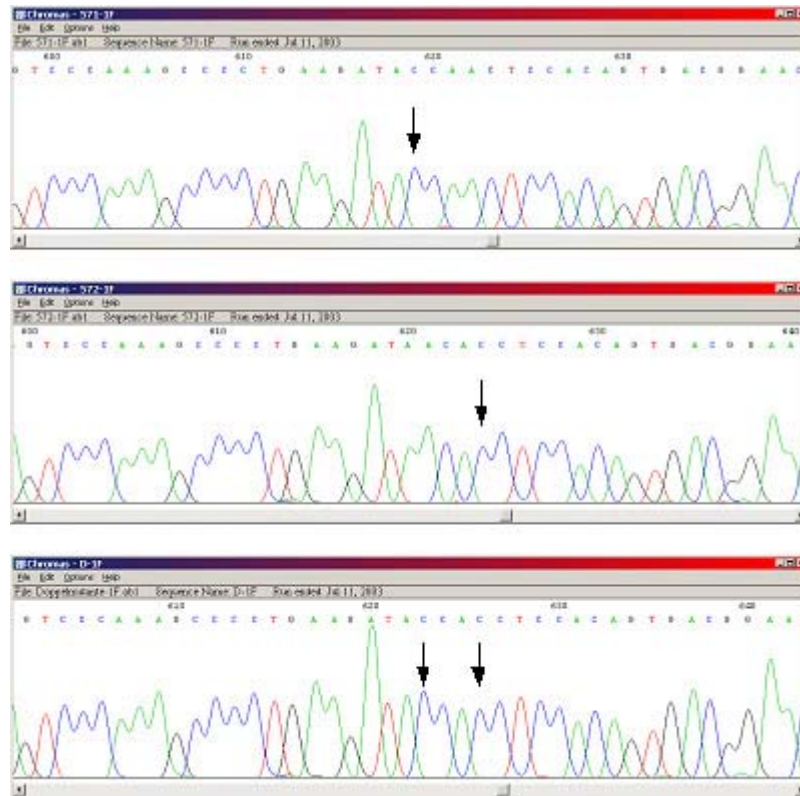


Abb. 2.30: Sequenzierung nach basenspezifischer Mutagenese der *Trpv2*-cDNA in pcDNA3.1/TRPV2. Oben: Plasmid pcDNA3.1/TRPV2_N571T zeigt den Basenaustausch 1711AAC→ACC. Mitte: Plasmid pcDNA3.1/TRPV2_N572T zeigt den Basenaustausch 1714AAC→ACC. Doppelmutante pcDNA3.1/TRPV2_NN571/572TT zeigt zwei Basenaustausche 1711AAC→ACC und 1714AAC→ACC.

Zur Untersuchung der Glycosylierung wurden die TRPV2-Glycosylierungsmutanten in F11-Zellen exprimiert und TRPV2 im Westernblot nachgewiesen. (Abb. 2.31A). Für TRPV2_N571T entsprach das Bandenmuster dem Wildtyp d.h. mit einer Bande bei 84 kD und einer diffusen Bande bei 97 kD. TRPV2_N572T ist teilweise glycosyliert, d.h. es konnte eine Doppelbande bei 80/84 kD und eine diffuse Bande bei 97 kD detektiert werden. Die Doppelmutante TRPV2_NN571/572TT zeigte überraschenderweise eine Doppelbande bei 80/84 kD. Um zu ermitteln, ob die Doppelbande bei der Mutante TRPV2_NN571/572TT auf eine eventuelle Glycosylierung an anderer Stelle zurückzuführen ist, wurde ein Deglycosylierungsassay aller TRPV2-Glycosylierungsmutanten durchgeführt (Abb. 2.31B)

Bei TRPV2_N571T zeigten sich nach Inkubation mit Endoglycosidase H und PNGase F die erwarteten Änderungen: PNGase F bewirkte das Verschwinden der gesamten Glycosylierungsbanden, lediglich die 80 kD-Bande wurde detektiert. Endoglycosidase H bewirkte eine Verschiebung der 84 kD-Bande zu 80 kD. Dasselbe Ergebnis wurde bei TRPV2_N572T erzielt.

Bei der Doppelmutante verschwand die Doppelbande bei 80/84 kD weder nach Inkubation mit Endoglycosidase H noch mit PNGase F, womit eine N-Glycosylierung ausgeschlossen werden kann. Welche andere Form der Modifikation dem zugrunde liegt (z.B. O-Glycosylierung oder eine Phosphorylierung) wurde nicht weiter untersucht.

Die Daten legen wie auch bei TRPV1 den Schluss nahe, dass sowohl Glycosylierung vom High-Mannose-Typ als auch komplexe Glycosylierung an den Positionen N571 und N572 bei TRPV2 vorliegen kann.

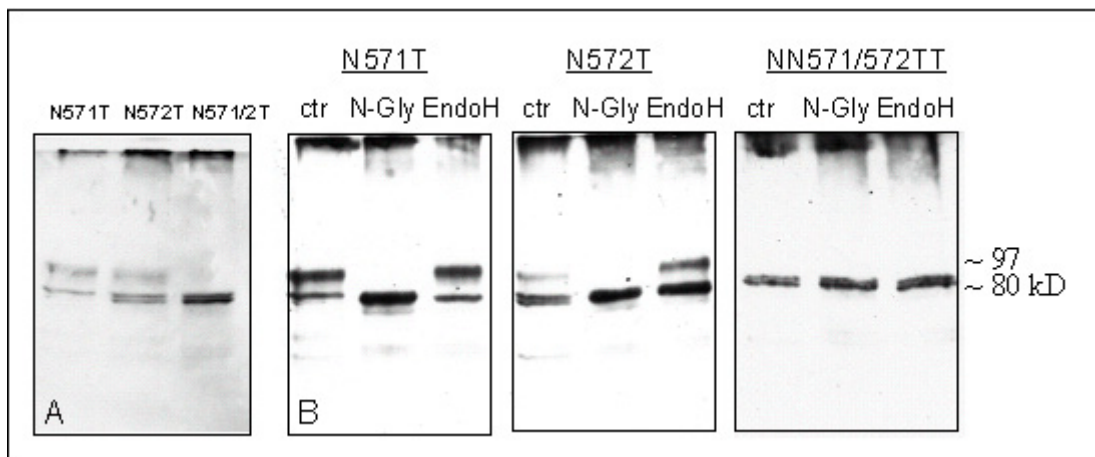


Abb. 2.31: TRPV2-Westernblot transfizierter F11-Zellen. A) TRPV2-Glycosylierungsmutanten nach transienter Transfektion: TRPV2_N571T, TRPV2_N572T und TRPV2_NN571/572TT. B) Deglycosylierungsassay der TRPV2-Glycosylierungsmutanten aus A.

Die Lokalisation der TRPV2-Glycosylierungsmutanten konnte nach indirekter Immunfluoreszenz wie für den Wildtyp-TRPV2 an der Plasmamembran gezeigt werden (Abb. 2.32).

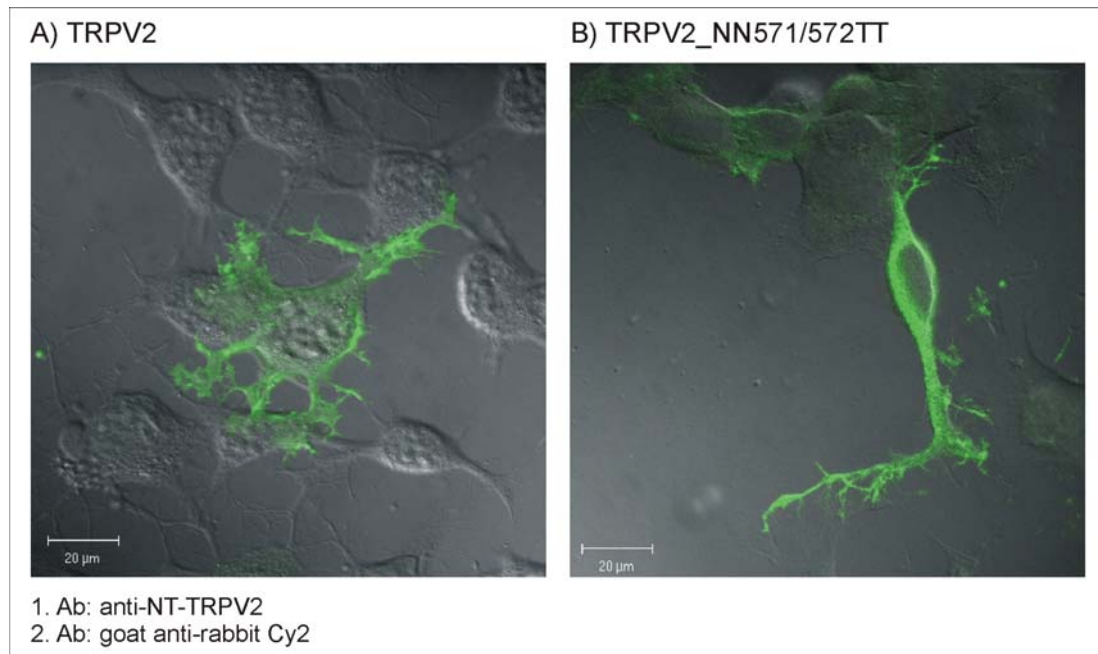


Abb. 2.32: Indirekte Immunfluoreszenz von A) TRPV2 und B) TRPV2_NN571/572TT in F11-Zellen. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe des konfokalen Laserscanning-Mikroskops LSM 510 mit dem Plan-Apochromat 63×/1.4 Oil DIC-Objektiv angefertigt. Gezeigt ist jeweils die TRPV2-Immunreaktivität (grün), überlagert mit einer Normmaski-DIC-Aufnahme. Wird TRPV2 in F11-Zellen überexprimiert, so befindet sich der Rezeptor überwiegend an der Plasmamembran, besonders in den Äusläufern der Zellen (A). Der Glycosylierungs-defiziente Rezeptor (Doppelmutante NN571/572TT) zeigt dieselbe Lokalisation (B). Das gilt auch für die TRPV2-Mutanten N571T und N572T.

2.4 Identifizierung von TRPV1- und TRPV2-Interaktionspartnern durch Pull-Down-Experimente

Die cytoplasmatisch lokalisierten Termini von TRPV1 und TRPV2 sind wahrscheinlich an einer Reihe von Protein-Protein-Interaktionen in den postulierten Multiproteinkomplexen beteiligt. Um potentielle Interaktionspartner zu finden und zu untersuchen, wurden die cytoplasmatischen C- und N-terminalen Sequenzen (CT bzw. NT) von TRPV1 und TRPV2 mit dem Maltose-bindenden Protein (MBP) fusioniert. Der MBP-Anteil der Fusionsproteine dient zur Immobilisierung und Reinigung der Fusionsproteine mittels Affinitätschromatographie (Amylose-Säule). Das von den bakteriellen Proteinen abgetrennte Fusionsprotein wurde für Interaktionsexperimente (Pull-Down-Assays) verwendet. Die Arbeiten zur Klonierung und Expression der Fusionsproteine und der Aufbau der Pull-Down-Assays wurden in zwei von mir betreuten Diplomarbeiten bearbeitet. Die Daten zu TRPV1 wurden von Herrn M.sc. Han Si und die Daten zu TRPV2 von Frau Dipl.-Biochem. Lisa M. Münter generiert.

2.4.1 Klonierung und Expression C- und N-terminaler Sequenzen von TRPV1 und TRPV2 als MBP-Fusionsproteine

Als Ausgangsmaterial für die kodierenden Sequenzen der cytoplasmatischen Termini von TRPV1 der Ratte wurde das Plasmid pcDNA3.1/TRPV1 und für TRPV2 cDNA aus Ratten-DRG verwendet. Für die Amplifikation wurden Primer generiert, die am 5'-Ende mit einer *EcoRI*-Schnittstelle (Forward-Primer) und am 3'-Ende mit einer *XbaI*-Schnittstelle (Revers-Primer) versehen waren. Die resultierenden PCR-Produkte wurden mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen in den prokaryontischen Expressionsvektor pMAL-c2x im Leseraster hinter das *malE*-Gen sowie in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1(+) ligiert. Das *malE*-Gen kodiert für das Maltose-bindende Protein. Es wurden die Konstrukte pMALc2x/TRPV1_(1-431aa)(NT), pMALc2x/TRPV1_(681-838aa)(CT) und pMALc2x/TRPV2_(645-761aa)(CT) generiert. Die erfolgreiche und richtige Klonierung wurde durch einen Kontrollverdau der erhaltenen Plasmide sowie durch Sequenzierung bestätigt. Allerdings blieben mehrere unterschiedliche Ansätze zur

Klonierung des cytoplasmatischen N-Terminus von TRPV2 aus Ratten-DRG erfolglos.

Nach IPTG-induzierter Expression in *E. coli* BL21(DE3) sollte nach Zellaufschluss und Zentrifugation ein lösliches MBP-Fusionsprotein vorliegen. Tatsächlich konnten nach Optimierung des Expressionsprotokolls die MBP-Fusionsproteine von TRPV1 (MBP-TRPV1-CT bei ~65 kD, MBP-TRPV1-NT bei ~94 kD; Abb. 2.33 A) rechtes Bild und B) rechtes Bild) als lösliche Proteine über eine Amylosematrix gereinigt werden. Das N-terminale MBP-Fusionsprotein MBP-TRPV1-NT (~94 kD) konnte nicht ganz rein gewonnen werden. Mehrere Banden im Western Blot deuteten entweder auf Degradation oder unvollständige Translation des Fusionsproteins hin.

MBP-TRPV2-CT bei ~55 kD konnte ebenfalls löslich gewonnen werden (Abb. 2.34 oben). Bereits vor der Induktion mit IPTG war eine geringe Menge MBP-TRPV2-CT detektierbar, aber nach einer Stunde Expression war die Menge an Fusionsprotein deutlich erhöht. Nach Zellwandlyse der Bakterien durch Lysozym konnte im Überstand kein MBP-TRPV2-CT nachgewiesen werden. Das lösliche Fusionsprotein wurde erst nach Zellaufschluss durch Einfrieren in N₂ und Auftauen im Überstand gewonnen, wobei das Pellet danach noch einen gewissen Anteil an unlöslichem Fusionsprotein enthielt (Abb. 2.34 oben).

Alle Fusionsproteine wurden nach SDS-PAGE im Western Blot mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern gegen den C- bzw. N-Terminus von TRPV1 und den C-Terminus von TRPV2 sowie einem MBP-Antikörper nachgewiesen. Die Fusionsproteine MBP-TRPV1-CT, MBP-TRPV1-NT und MBP-TRPV2-CT konnten als lösliche Proteine nach bakterieller Expression gewonnen und durch Bindung an eine Amylosematrix von bakteriellen Proteinen getrennt werden, somit standen sie zur Bindung und Untersuchung von potentiellen Interaktionsproteinen aus Zell- oder Gewebepreparaten bereit.

2.4.2 Affinitätschromatographie (Pull-Down-Assay) zur Entdeckung potentieller Interaktionspartner

Zur Suche nach potentiellen Interaktionsproteinen wurden die an eine Amylosematrix gebundenen MBP-Fusionsproteine mit löslichen (Überstand nach

Ultrazentrifugation des Zellhomogenates) oder unlöslichen Proteinfractionen (Particulate-Fraktion nach Solubilisierung mit 1% NP-40 oder 1% Na-Cholat, danach Verdünnung auf 0,1% Detergenz) aus F11-Zellen oder auch mit der löslichen S2-Fraktion aus Rattenrückenmarkgewebe inkubiert. Als Kontrollansätze in unterschiedlichen Experimenten dienten einerseits die Inkubation der zu untersuchenden Proteinfractionen mit der Amylosematrix ohne gebundenes MBP-Fusionsprotein (bei MBP-TRPV1) oder mit der Amylosematrix, an die vorher bakteriell exprimiertes MBP anstelle des MBP-Fusionsprotein gebunden worden ist (bei MBP-TRPV2). Nach Waschen wurden die MBP-Fusionsproteine mit den interagierenden Proteinen sowie die Kontrollen mit gebundenen unspezifischen Proteinen von der Amylosematrix durch Maltose eluiert. Nach SDS-PAGE wurden die Differenzbanden aus dem Gel, die im Vergleich zu den Kontrollen zusätzlich zu beobachten waren, mittels MALDI-MS in Zusammenarbeit mit Dr. Mathias Dreger analysiert.

Im Falle von MBP-TRPV1-CT konnten vier Differenzbanden potentieller Interaktionspartner in der löslichen F11-Fraktion detektiert werden, von der die Bande bei ~45 kD als β -Aktin der Maus identifiziert wurde (Abb. 2.33 A). Die zu hohe Detergenz-Konzentration (1% Na-Cholat anstatt 0,1% Na-Cholat siehe 6.8.8.2) in der solubilisierten F11-Particulate-Fraktion führte zur Elution des Fusionsproteins von der Säule, so dass in diesem Experiment keine Interaktionspartner in dieser Probe ausgemacht werden konnten. Im Falle von MBP-TRPV1-NT konnten mehrere Differenzbanden potentieller Interaktionspartner in der löslichen S2-Fraktion von Rattenrückenmark detektiert werden, eine Analyse mittels MALDI-MS schlug leider fehl (Abb. 2.33 B). Nur das Fusionsprotein selbst wurde eindeutig identifiziert. Die massenspektrometrischen Daten sowie weitere Details können der Master-These von M.sc. Han Si (2003) entnommen werden.

An dieser Stelle wurde das Projekt zur Suche von TRPV1-Interaktionspartner als Doktorarbeit an Chandan Goswami weitergegeben, der den Pull Down Assay weiter optimiert und zusätzliche Parameter wie den Einfluss von Ca^{2+} untersucht. Die Experimente sind sehr vielversprechend und eine Publikation befindet sich bereits in Revision^[24].

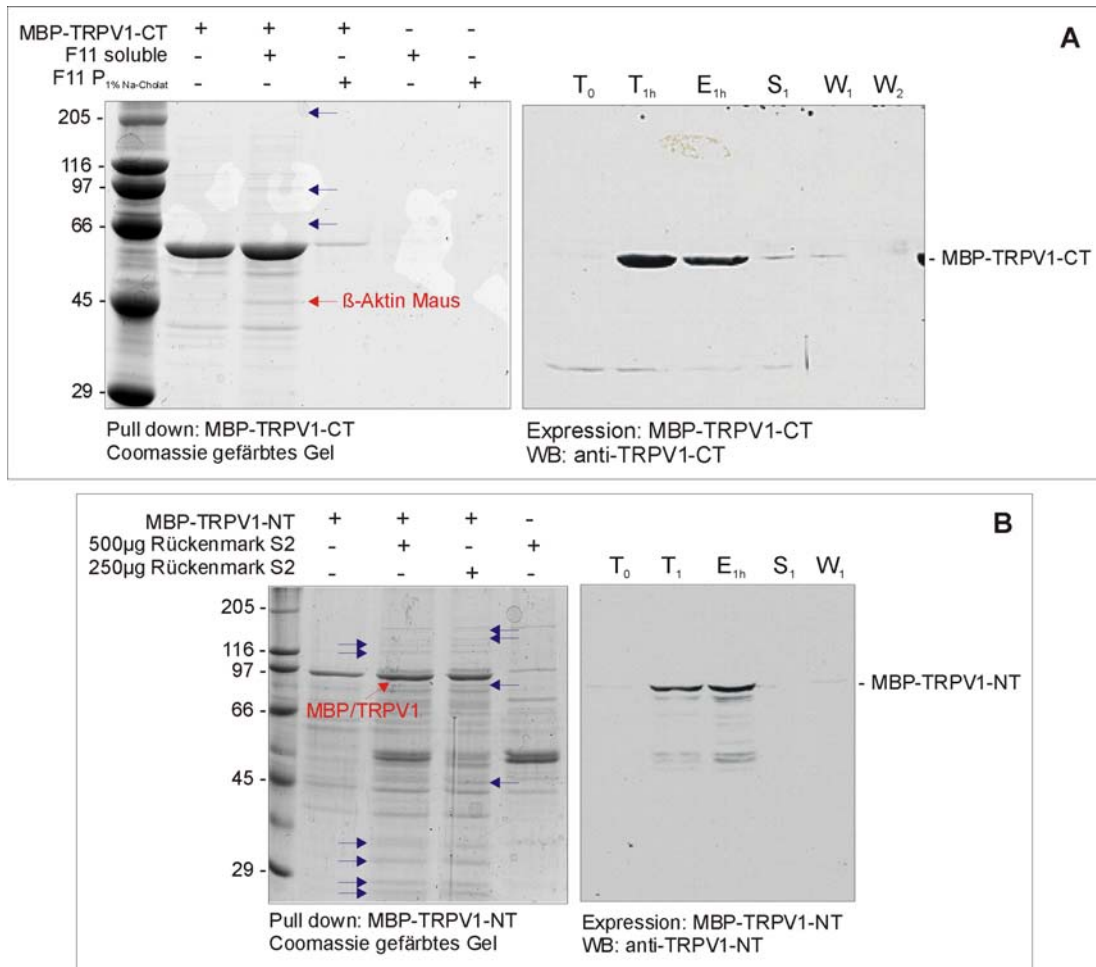


Abb. 2.33: Expression, Reinigung und Pull Down Assay von MBP-TRPV1-Fusionsproteinen in BL21(DE3). A) MBP-TRPV1-CT und B) MBP-TRPV1-NT. Linke Bilder) Coomassie gefärbte SDS-Gele nach Pull-Down-Assay mit löslichen und unlöslichen F11-Proteinfraktionen (A) oder löslicher S2-Proteinfraktion aus Rattenrückenmark (B). Rechte Bilder) Westernblots der Fusionsproteinreinigung über die Amylosematrix. T₀: Vor Induktion der Expression mit IPTG, T₁: Bakterienlysat nach 1h Expression, E_{1h}: Eluat von der Amylosematrix nach 1h Expression, Inkubation des Bakterienlysates mit Amylose und Waschen, S: Überstand nach Inkubation des Bakterienlysates mit Amylose, W: Waschfraktion. Blaue Pfeile markieren differenzielle Proteinbanden, die noch nicht durch MALDI-MS analysiert werden konnten.

Auf der Suche nach MBP-TRPV2-CT interagierenden Proteine wurden lösliche und unlösliche F11-Proteinfraktionen verwendet. F11-Zellen exprimieren TRPV2 auch endogen, wodurch sie für die Suche nach Interaktionspartnern für TRPV2 besonders geeignet sind (siehe 2.3.2). Die F11-Zellhomogenate zur Herstellung dieser Fraktionen stammen aus unterschiedlich behandelten Zellen. Da Interaktionspartner von TRPV2 möglicherweise erst nach Stimulation des TRPV2 binden, wurde ein

Teil der F11-Zellen für 2 min auf 53°C erwärmt. Zur Untersuchung des Einflusses von Ca^{2+} wurde das F11-Zellhomogenat zusätzlich mit 1 mM CaCl_2 versetzt.

Nach den Pull-Down-Assays konnten keine Unterschiede in den Bandenmustern nach Inkubation von MBP-TRPV2-CT oder MBP mit den unterschiedlich behandelten F11-Zellproben sowohl der löslichen als auch unlöslichen F11-Proteinfraktionen detektiert werden. Es zeigten sich aber Unterschiede zwischen den Ansätzen mit MBP-Kontrollen und MBP-TRPV2-CT. Aus den Ansätzen mit löslichen F11-Proteinfraktionen konnte das β -Tubulin der Maus (BAB27292) bei 50 kD eindeutig als Interaktionspartner von MBP-TRPV2-CT identifiziert werden (Abb. 2.34 unten links). Aus den Ansätzen mit unlöslichen F11-Proteinfraktionen konnte bei 75 kD die P450-(Cytochrom)-Oxidoreduktase oder NADH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktase der Maus (NP_032924) und bei 47 kD Aktin identifiziert werden (Abb. 2.34 unten rechts). Die Peptidmassen-Fingerprints sowie die PSD-Spektren können der Diplomarbeit von Frau Dipl.-Biochem. Lisa M. Münter (2003) entnommen werden.

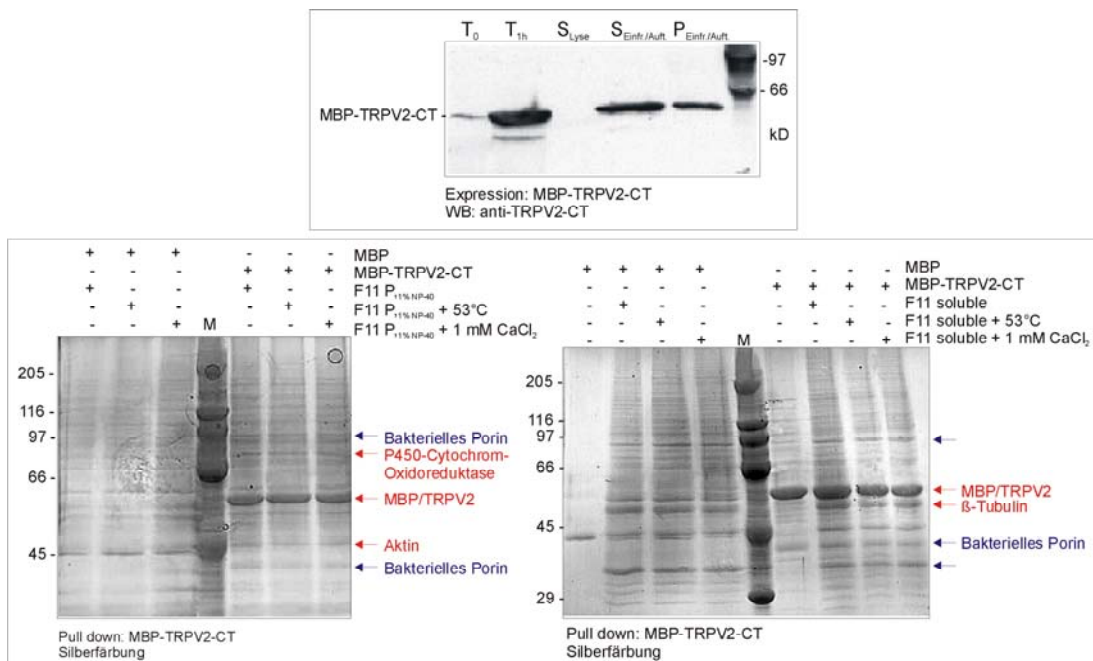


Abb. 2.34: Expression und Pull-Down-Assay von MBP-TRPV2-CT in BL21(DE3). Oben) Westernblot zum Nachweis der Expression und Löslichkeit. Unten) Silberfärbung der SDS-Gele nach Pull-Down-Assay. Links) Pull-Down-Assay mit unlöslicher F11-Proteinfraktion (solubilisiertes F11-Particulate). Rechts) Pull-Down-Assay mit löslicher F11-Proteinfraktion. In rot sind die mittels MALDI-MS identifizierten potentiellen Interaktionsproteine gezeigt, die nicht als Proteinbanden in den Kontrollen vorkommen. In der Fusionsprotein-Bande wurde sowohl MBP als auch TRPV2 mittels MALDI-MS bestätigt.