

3 Diskussion

3.1 Proteom-Ansatz zur Identifizierung schmerzregulierter Genprodukte

Ein möglicher Ansatz, um die molekulare Ebene von Krankheiten oder Schmerz zu verstehen, ist der Vergleich des Proteoms unterschiedlicher Zustände (z.B. Schmerz versus Kontrolle). Das Proteom ist die Gesamtheit aller Proteine, die von einem Genom, einer Zelle oder einem Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt exprimiert werden¹⁴¹. Das Proteom ist, im Gegensatz zum statischen Genom, von dynamischer, sich ständig ändernder Gestalt. Zum einen ist die Proteinbiosynthese zell- und gewebespezifisch, aber auch äußere Bedingungen nehmen Einfluss auf die Quantität und Qualität der exprimierten Proteine des Proteoms. Von den Genen kann man keine einfachen Rückschlüsse auf die erzeugten Proteine ziehen, da durch die hohe kombinatorische Vielfalt, wie z.B. durch alternatives Spleißen und posttranslationale Modifikationen eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine mit zum Teil auch unterschiedlicher Funktion resultiert. Ebenso wenig kann die mRNA-Menge einen Rückschluss auf die Quantität eines Proteins geben¹⁴². Die Proteinanalyse liefert, im Gegensatz zur mRNA-Analyse, Informationen über die Menge, den Status der Modifikation, die subzelluläre Lokalisation, die dreidimensionale Struktur und die Interaktion mit anderen Proteinen. Es ist daher wichtig, die Proteinzusammensetzung über die differentielle mRNA-Analyse hinaus genauer zu untersuchen. Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2DE)^{126,127} ist in der Lage, Proteine mit einem Molekulargewichtsunterschied von ca. 100 Da und einem nur geringen Ladungsunterschied, verursacht z.B. durch den Austausch einer sauren gegen eine neutrale oder basische Aminosäure oder durch eine posttranslationale Modifikation, wie die Phosphorylierung, voneinander zu trennen. Die subtraktive Analyse der 2D-Gele ermöglicht das Auffinden von Veränderungen im Proteinmuster. Die Identifizierung der relevanten Proteine aus den 2D-Gelen erfolgt durch Peptidmassenfingerabdruck und massenspektrometrische Sequenzierung¹⁴³ von proteolytisch erzeugten Peptiden. Die Sensitivität liegt dabei im Femtomol-Bereich.

Die Besonderheit der subzellulären Proteomanalyse, wie sie in dieser Arbeit angewendet wurde, besteht in der Reduzierung der Komplexität und der Anreicherung funktioneller Einheiten eines zu untersuchenden Präparates. So können beispielsweise Zellorganellen oder spezialisierte Zellmembrandomänen isoliert werden. Die Vorteile gegenüber der herkömmlichen Proteomanalyse sind 1. ein besserer Zugang zu bisher unbekanntem Proteinen, 2. die Verwendung von Trennsystemen mit geringerer Auflösung, die sich aber für integrale Membranproteine eignen, 3. ein Informationsgewinn über die bloße Proteinidentifizierung hinaus (Zuordnung unbekannter Proteine zu bekannten Strukturen) und 4. bei einer vergleichenden Proteomanalyse kann der Wechsel eines Proteins in ein anderes Zellkompartiment (Translokation) detektiert werden.

3.1.1 Subzelluläre Fraktionierung von Rattenrückenmark und 2DE

Die hier verwendete experimentelle Methodik zielte darauf ab, anhand des Vergleichs der Proteinmuster aus Gewebeproben von dorsalen Rückenmarkshälften der Ratte (Kontrolle versus Schmerzmodell) nach Trennung durch 2DE Kandidatenproteine für schmerzregulierte Genprodukte, die als Differenzspots auf den 2D-Gelen erkennbar sein sollten, massenspektrometrisch zu identifizieren. Ausgewählt wurde dafür die Analyse subzellulärer Fraktionen, die synaptische Strukturen enthalten. Eine Methode zur Isolierung von synaptischen Membranen aus Rattenhirn¹²³ wurde für die Präparation von analogen Strukturen aus ganzen dorsalen Rückenmarkshälften adaptiert. Synaptische Membranen repräsentieren eine komplexe Membranstruktur aus integralen Membranproteinen der prä- und postsynaptischen Membranen. Sie enthalten zusätzlich Proteine aus der präsynaptischen Cytomatrix der aktiven Zone^{144,145} und die Postsynaptische-Dichte-Fraktion (PSD)¹²⁰. Die PSD ist eine elektronendichte Region unterhalb der postsynaptischen Membran, die eine Verbindung von Membranrezeptoren zum Cytoskelett bildet. Hier sind die zur Signalübertragung erforderlichen Proteine (Membranrezeptoren, wie NMDA-, AMPA und Kainat-Rezeptoren; Proteinkinasen, wie CaMKII; Scaffoldproteine wie Homer, Shank und PSD-95 und Enzyme wie SynGAP und nNOS) verankert^{120,121,146,147}. Die Präparation der PSD aus den synaptischen Membranen wurde nach Maßgabe der Co-Anreicherung des NMDA-Rezeptors und des Scaffoldproteins

PSD-95 etabliert. Nach der Auftrennung mittels 16-BAC-2DE zeigte sich, dass zwar Membranproteine und synaptische Proteine enthalten waren, aber die gut sichtbaren Spots häufig in der Zelle vorkommende Proteine repräsentierten.

Für die vergleichende Proteomanalyse von dorsalen Rückenmarkshälften aus Kontrolltieren versus Tieren aus dem Formalin-Schmerzmodell wurde aus Gründen der größeren Proteinausbeute die heterogenere synaptische Membranfraktion (Synaptosomenmembranen) verwendet. Für die Proteintrennung wurde die hochauflösende 2DE aus isoelektrischer Fokussierung mit immobilisierten pH-Gradienten und SDS-PAGE (IEF/SDS-PAGE) verwendet. Sie eignet sich gut für die Auftrennung von Proteingemischen, weniger aber für Membranproteine¹⁴⁸. Auf den 2D-Gelen konnten reproduzierbar keine Differenzspots detektiert werden. Die Darstellung von Differenzspots über engere pH-Gradienten (nicht gezeigte Daten) sowie die Verwendung eines neuen fluoreszierenden Proteinfarbstoffes SYPRO Ruby¹⁴⁹ brachte keine Verbesserung in Bezug auf die Aussagekraft der erhaltenen Proteinmuster. Die 2D-Gele waren anhand der Proteinmuster zwar vergleichbar, die Quantität der Proteinmenge der Spots variierte aber von Präparation zu Präparation. Die Begrenzung der pH-Gradienten hat auch den Nachteil, dass der Großteil der Proteine einen pI außerhalb dieses Bereiches hat. Diese Proteine können präzipitieren und die IEF stören. Eine Vorfraktionierung über diskrete isoelektrische Fraktionen könnte das verhindern, jedoch hat jeder weitere Fraktionierungsschritt einen Substanzverlust zur Folge. Anders als auf den niedrig auflösenden, und daher für die Detektion von Differenzspots ungeeigneten, 16-BAC-2D-Gelen waren integrale Membranproteine auf den IEF/SDS-PAGE-Gelen den massenspektrometrischen Analysen zufolge nicht repräsentiert. Detektiert wurden vor allem Cytoskelett-Proteine sowie mitochondriale Kontaminationen.

Mit Hilfe der gesammelten Daten konnte im Rahmen dieser Arbeit eine provisorische Rattenrückenmark-Proteinkarte mit bisher über 30 Proteinen für den pH-Bereich 3-10 erstellt werden. Zur Erstellung einer kompletten Proteom-Karte von Synaptosomenmembranen des dorsalen Rattenrückenmarkes wurden diese Fraktionen durch Dr. Mathias Dreger nach verschiedenen Waschschritten mittels der Membranprotein-kompatiblen 16-BAC-2DE und IEF/SDS-PAGE aufgetrennt und analysiert. Mit Hilfe dieser Strategie konnte verglichen werden, welche Proteine nach den unterschiedlichen Waschschritten in den jeweiligen Gelsystemen besonders

gut oder gar nicht aufgetrennt werden. Insgesamt konnte M. Dreger 122 unterschiedliche Proteine identifizieren und in Kategorien einteilen. Nur 10% repräsentierten integrale Membranproteine, die nur in den 16-BAC-Gelen zu finden waren (Dreger et al., *J Proteome Res*, eingereicht). Diese Ergebnisse machen noch einmal deutlich, wie schwierig das Unterfangen ist, mit einem Ansatz wie dem beschriebenen Unterschiede in der Proteinexpression bei verschiedenen Zuständen in einer komplexen Membranprotein-angereicherten Probe zu detektieren. Als positives Ergebnis dieser Studie konnte ein Protein identifiziert werden, das bislang noch nicht im Rückenmark beschrieben worden ist und nun gezielt in einer komplementären Studie mittels *in situ* Hybridisierung untersucht wird.

3.1.2 Grenzen der klassischen Proteomanalyse für Membranproteine

Die 2DE ist mit Abstand die wichtigste Trennungsmethode zur Proteomanalyse. Sie ist jedoch relativ langsam und die technische Durchführung schwierig. Außerdem ist sie diversen Einschränkungen unterworfen.

- 1) Für integrale Membranproteine besteht aufgrund ihrer Hydrophobizität das Hauptproblem in der geringen Löslichkeit in den wässrigen Medien für die IEF. Zur Solubilisierung der Membranproteine werden verschiedenen Detergenzien eingesetzt, die im Innern ihrer Micellen eine Lipid-ähnliche Umgebung nachahmen. Aufgrund der variablen Qualität von Detergenz zu Detergenz ist diese Solubilisierung unterschiedlich, was auch die Reproduzierbarkeit der Probenaufarbeitung begrenzt. Eine teilweise oder limitierte Solubilisierung ist nicht ausreichend, wenn Unterschiede in Proteomen quantitativ analysiert werden sollen. Die Darstellbarkeit von Membranproteinen in der 2DE als Spot ist zusätzlich limitiert, da
 - die Lipid-Umgebung der Membran gelöst werden muss, ohne dass die verbleibenden Lipide den Prozess der IEF stören.
 - die Membranproteine in löslicher Form (Detergenz-Protein-Komplex) aus der Membran extrahiert werden müssen.
 - während der IEF die Membranproteine in Lösung bleiben müssen, besonders an ihrem isoelektrischen Punkt, an dem alle Proteine ohnehin ihre geringste Löslichkeit besitzen¹⁴⁸.

- 2) Beim Transfer von der ersten auf die zweite Dimension tritt die Gefahr von Proteinverlusten auf, so dass Proteine mit extremen Eigenschaften wie Membranproteine, sehr große, sehr kleine, stark saure und stark basische Proteine horizontal schmieren, unterrepräsentiert oder gar nicht mehr vorhanden sind.
- 3) Sehr selten vorkommende Proteine können nicht gleichzeitig neben sehr häufigen Proteinen dargestellt werden¹⁴⁸. Die 2DE hat nur einen begrenzten dynamischen Bereich, sie ist nicht imstande, den Konzentrationsbereich, in dem Proteine auftreten, zu erfassen.
- 4) Die Quantifizierung ist unvollkommen und eine Automatisierung liegt noch in weiter Ferne¹⁵⁰. Die subtraktive Analyse kann für eine kleine Anzahl von 2D-Gelen visuell durchgeführt werden. Für eine Quantifizierung ist aber eine Bildverarbeitung mit Hintergrund- und Lagekorrektur notwendig. Für einen Vergleich müssen von zwei verschiedenen biologischen Proben mehrere unabhängige Probenaufarbeitungen erfolgen und die Signifikanz der Unterschiede sollte mit statistischen Methoden überprüft werden. Im Falle der in dieser Arbeit generierten 2D-Gele kam eine bildverarbeitende Auswertung der 2D-Gele nicht zum Tragen, da die Qualität der 2D-Gele im Hinblick auf den Hintergrund und der bereits visuell erkennbar starken Verschiebungen der Proteinmuster von Gel zu Gel nicht für diese Art der Auswertung geeignet waren.

3.1.3 Alternativen zur klassischen Proteomanalyse

Die klassische Proteomanalyse muss zunehmend der globalen Analyse von Protein-Protein-Interaktionen, posttranslationalen Modifikationen und molekularen Netzwerken weichen. Hierfür wurde der Begriff Proteomics (Bestimmung von Zahl und Menge der Proteine einer Zelle oder eines Organismus zu einer gegebenen Zeit und unter bestimmten Bedingungen) erweitert zur funktionellen Proteomics, die die Bestimmung von Funktion und Lokalisation mit einbezieht¹⁵¹. Zur funktionellen Proteomics gehört die Interaktionsproteomics, das heißt die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen. Proteinkomplexe lassen sich am besten mit Techniken wie dem Two-Hybrid-System¹⁵², der Tandemaffinitätsaufreinigung (Tandem affinity purification; TAP)¹⁵³, der Immunpräzipitation und mit Hilfe von Fluoreszenzmethoden (z.B. FRET) untersuchen.

Für Analysen von komplexen Proteingemischen ohne elektrophoretische Techniken stehen alternativ chromatographische Methoden zu Verfügung, die neben der Proteinidentifizierung auch gleichzeitig eine Quantifizierung ermöglichen. Bei der LC-MS/MS wird eine analytische HPLC (High Performance Liquid Chromatographie) mit einem Massenspektrometer (MS) gekoppelt. Hierbei können auch schwach exprimierte Proteine, sowie Membranproteine detektiert werden. Mit Hilfe der multidimensionalen Proteinidentifizierungs-Technologie (multidimensional protein identification technology; MudPIT) können mehrere Flüssigphasen-Chromatographien hintereinander durchgeführt werden^{154,155}. Der Vorteil hierbei liegt eindeutig in der Detektion von sehr vielen Proteine, insbesondere von integralen Membranproteinen, der Nachteil aber ist, dass keine Aussagen über ihre Konzentration getroffen werden kann.

Die Proteine zweier zu vergleichender Proben können bisher nur mit der Isotope Coded Affinity Tag (ICAT)-Methode¹⁵⁶ gleichzeitig identifiziert und quantifiziert werden. Diese Methode ist die beste Alternative für die Analyse schmerzrelevanter Proteine, die in dieser Arbeit vorgestellt wurde. Dazu werden fraktionierte Proben zunächst an Cystein-Resten mit Biotin-Tags markiert, die sich geringfügig in der Masse unterscheiden (ein Linker zwischen dem Biotin und einer Iodacetamidgruppe enthält entweder Wasserstoff oder Deuterium). Nach Vereinigung der Proben erfolgt die Spaltung der Proteine mit Trypsin und die Aufreinigung (Avidinsäule), Auftrennung (RP-HPLC), Detektion und Identifizierung der Peptide durch ESI-MS/MS. Wenn ein Cystein-haltiges Protein in beiden Proben vorhanden ist, werden markierte Peptidpaare erhalten, die bis auf den Linker identisch sind. Das Expressionsverhältnis wird aus den erhaltenen Peaks bestimmt, die sich in ihrer Masse um 8H-Atome unterscheiden. Von Vorteil ist, dass die ICAT-Methode Auskunft gibt über Zahl, Natur und Mengenverhältnis der Proteine zweier Proben. Die Schwäche liegt allerdings darin, dass nur Proteine mit Cystein-Resten erfasst werden. Hier wird die Entwicklung von neuen Tags, wie z.B. photochemische Linker, die an der festen Phase gebunden sind¹⁵⁷, N-terminale Markierung oder ¹⁸O-Markierungen von Proteinen neue Fortschritte bringen.

3.1.4 Schlussfolgerungen und Konsequenzen

Schmerzregulierte Proteine im Rückenmark, insbesondere Membranproteine, konnten durch den in dieser Arbeit angewandten Proteom-Ansatz nicht gefunden werden. Ich konnte die Grenzen der 2DE für Membranproteine klar definieren. Diese Erkenntnisse und den Blick auf die intensiven Bemühungen um alternative Methoden in der Proteom-Analyse gerichtet, machten es erforderlich, die Bearbeitung der Fragestellung in dieser Form zu beenden.

Da sich der Vanilloid-Rezeptor TRPV1 zeitgleich im BMBF-Leitprojekt als ein wichtiges schmerzrelevantes Target herauskristallisierte, habe ich mich auf die Target-Charakterisierung der thermosensitiven TRP-Kanäle TRPV1 und TRPV2 konzentriert. Vor allem TRPV1 wandelte sich von einem Marker für eine Subpopulation spezifischer sensorischer Neuronen zu einem molekularen Integrator diverser sowohl chemischer als auch physikalischer noxischer Stimuli⁶³. TRPV1 wird eine Rolle bei der Entstehung chronischer Schmerzen zugeschrieben. Für verschiedene Schmerzmodelle wurde eine Änderung der TRPV1-Expression in DRG-Neuronen¹⁵⁸⁻¹⁶⁰ und sogar eine *de novo* Expression von TRPV1 in A-Fasern nach partieller Nervenligation¹⁶¹ nachgewiesen. Für die Entwicklung neuer Schmerzmedikamente gegen TRPV1 oder TRPV2, sowie zur Abschätzung ihrer Wirkungen und Nebenwirkungen, ist es erforderlich, die strukturellen und funktionellen Eigenschaften dieser Rezeptoren so genau wie möglich zu kennen. Die biochemische Charakterisierung von TRPV1 und TRPV2 war daher Gegenstand meiner weiteren Forschungen.

3.2 Biochemische Charakterisierung der thermosensitiven TRP-Kanäle TRPV1 und TRPV2

Im Mittelpunkt der Target-Charakterisierung von TRPV1 und TRPV2 stand die Analyse der Glycosylierung, Quartärstruktur und der subzellulären Lokalisation in einem heterologen Expressionssystem. Um mehr Einblicke in die funktionellen Eigenschaften und Signalwege von TRPV1 und TRPV2 zu erhalten, wurde darüber hinaus nach Bindungspartnern mit Hilfe eines Pull-Down-Assays gesucht.

3.2.1 F11-Zellen als heterologes Expressionssystem

Die F11-Zellen wurden zu Beginn der Arbeit als neuronales Expressionssystem für die Analyse von TRPV1 und TRPV2 etabliert. Sie sollten als Alternative zu HEK293-Zellen (humane embryonale Nierenzellen) dienen, die sich von Fibroblasten ableiten. TRPV1 wird überwiegend in sensorischen Fasern⁸³ und in distinkten Gehirnneuronen^{83,84} exprimiert. Daher ist ein Expressionssystem mit neuronalen Eigenschaften geeigneter als Fibroblasten.

Bei F11-Zellen handelt es sich um Hybridom-Zellen aus Neuroblastom-Zellen der Maus (N18TG2) und Hinterwurzelganglien-Zellen (DRG-Zellen) der Ratte, die ursprünglich als Modell zur Analyse von Eigenschaften einzelner Neuronen generiert wurden¹³⁵. Vier Zelllinien (F11 A-D) zeigten charakteristische Eigenschaften von DRG-Neuronen. Es konnten Aktionspotentiale ausgelöst werden und die Zellen hatten Neuriten-ähnliche Ausläufer. Die F11-Zelllinien besaßen eine unterschiedliche Zusammensetzung von Maus- und Rattenchromosomen, zeigten aber eine erstaunliche Homogenität von neuronalen Eigenschaften. Drei Maus- und Rattenisoenzyme (Nucleosid-Phosphorylase (NP), Peptidase B (PB), Mannosephosphat-Isomerase (MPI)) wurden in allen stabilen F11-Zelllinien A-D coexprimiert. Nur in der F11-Zelllinie C wurde ausnahmslos die Maus-Isoenzyme PB und MPI gefunden¹³⁵. Bei Zellfusionen kann ein Transaktivierungsmechanismus auftreten, bei dem durch die eine Zellkomponente vorher stille Gene der zweiten Zellkomponente aktiviert werden¹⁶². Dass die Genexpression teilweise durch selektive Aktivierung von zuvor stillen Genen der Neuroblastom-Zellen der Maus durch die DRG-Zellen ausgelöst wird, kann also nicht ausgeschlossen werden. Zu den DRG-ähnlichen Eigenschaften der F11-Zellen gehört die Ausschüttung des Neurotransmitters Substanz P, das Vorhandensein von μ - und δ -Opioidrezeptoren sowie von Rezeptoren für Prostaglandin und Bradykinin und L-Typ Calciumkanälen¹³⁶. Die F11-Zellen sollten aufgrund der beschriebenen Eigenschaften ein geeignetes Expressionssystem für die beiden zu untersuchenden Rezeptoren TRPV1 und TRPV2 darstellen.

Wie die Charakterisierung der F11-Zellen im Rahmen dieser Arbeit zeigte, wird sowohl das Maus- als auch das Rattenortholog des Vanilloid-ähnlichen Proteins 1 (TRPV2) in den Zellen exprimiert (*Trpv2* Ratte: Acc. No. AF129113 und *Trpv2*

Maus: Acc. No. NM_011706). Die Frage, ob jeweils beide orthologe Proteine von den einzelnen Zellen exprimiert werden oder ob es sich um eine Mischkultur von Zellen handelt, die entweder das Ratten- oder Mausortholog exprimieren, konnte mittels Einzelzell-RT-PCR durch Dr. Olaf Bender geklärt werden. In allen 15 untersuchten Einzelzellen wurde sowohl TRPV2 der Ratte als auch der Maus nachgewiesen und durch Sequenzierung bestätigt¹³⁷. Darüber hinaus wurde TRPV2 auch in der Parentalzelllinie N18TG2 der Maus nachgewiesen, womit ein Transaktivierungsmechanismus in den F11-Fusionszellen ausgeschlossen werden konnte. Die Beobachtung der Expression von TRPV2 in der Neuroblastomzelllinie wird durch Untersuchungen der Expression des Rezeptors in verschiedenen Hirnregionen gestützt¹⁶³. Immunohistochemische Analysen zeigen, dass TRPV2 in verschiedenen Nuclei des Hypothalamus vorkommt und zwar in Neuronen, die hauptsächlich Oxytocin und Vasopressin enthalten. Damit könnte TRPV2 im Gehirn eine fundamentale Rolle beim Calciumtransport während neurophysiologischer Vorgänge wie Geburt, Laktation und Diurese sowie bei Angstzuständen, Depression und Bluthochdruck spielen¹⁶³. Da TRPV2 im Rückenmark in sensorischen mittelgroßen A δ -Neuronen exprimiert wird, leitet sich die parentale Hinterwurzelganglien-Zelllinie der Ratte vermutlich von solchen Zellen ab.

3.2.2 Glycosylierung, Lokalisation und Quartärstruktur von TRPV1 und TRPV2 in F11- und HEK293-Zellen

3.2.2.1 Glycosylierungsstellen von TRPV1 und TRPV2

Nach Expression von TRPV1 und TRPV2 sowohl in F11- als auch in HEK293-Zellen zeigten sich im Westernblot jeweils mehrere Banden. Ein Verdau der Proteine mit verschiedenen Endoglycosidasen ergab, dass beide Kanäle eine N-Glycosylierung sowohl vom High-Mannose-Typ als auch eine komplexe N-Glycosylierung aufweisen. Die Glycosylierungsstellen konnten nach basenspezifischer Mutagenese für TRPV1 der Ratte an der Aminosäure Asn 604 (im Sequenzmotiv 604-607 NNSL) und für TRPV2 der Ratte an Asn 571 und Asn 572 (571-575 NNSTV) eindeutig identifiziert werden. TRPV2 der Maus weist an der gleichen Position Datenbankanalysen zufolge nur eine mögliche Glycosylierungsstelle an Position Asn 567 (567-570 NTTV) auf. Die

Glycosylierungsstellen befinden sich zwischen den Transmembransequenzen 5 und 6 vor der Porenschleife auf der extrazellulären Seite und bestätigen die vorgeschlagene Topologie der Kanäle, in der N- und C-Terminus cytoplasmatisch lokalisiert vorliegen.

3.2.2.2 Einfluss der Glycosylierung auf die TRPV1-Aktivierung und Lokalisation

Die komplexe, wahrscheinlich Sialinsäure-haltige, Glycostruktur des TRPV1 an Position Asn604 erhöht die negative Ladung in unmittelbarer Nähe des pH-Sensors an Position E600¹⁴, wodurch der Rezeptor möglicherweise im Hinblick auf die pH- und/oder Temperatursensitivität moduliert wird. TRPV1-Mutanten, in denen die Glutaminsäure gegen Asparaginsäure, Histidin oder Glutamin (E600D, E600H oder E600Q) ausgetauscht wurde, zeigten nicht mehr denselben robusten und dynamischen Anstieg Hitze-aktivierter Ströme zwischen pH 6-8, was die Wichtigkeit der Glutaminsäure an dieser Stelle unterstreicht. Eine Ladungsverschiebung durch eine fehlende Glycosylierung in dieser Region, die mit einer Änderung der Aktivierungseigenschaften einhergeht, wäre demnach denkbar. In der Literatur finden sich zahlreiche Beispiele für die Regulation (Aktivierung, Deaktivierung, Trafficking) von Ionenkanälen durch die Glycosylierung. So wurden bei zwei Vertretern der TRPC-Familie (TRPC3 und TRPC6) Unterschiede in der Aktivierbarkeit in Abhängigkeit von der Glycosylierung gefunden. Vergleichbar mit TRPV2 gibt es auch bei TRPC6 zwei Glycosylierungsstellen, die allerdings in der ersten und zweiten extrazellulären Schleife liegen. Wird die Glycosylierungsstelle in der zweiten Schleife entfernt, führt dies zum Verlust der Regulierbarkeit und zu einem konstitutiv aktiven Kanal, ähnlich wie TRPC3¹⁶⁴. Weiterhin gibt es eine Reihe von Untersuchungen an Ionenkanälen mit ähnlicher Topologie wie die der TRP-Kanäle, beispielsweise die spannungsabhängigen Kaliumkanäle, wo gezeigt werden konnte, dass ein Zusammenhang zwischen der Glycosylierung und der Funktion des Rezeptors besteht^{165,166}. Um mögliche Einflüsse auf die Funktion von TRPV1 zu untersuchen, wurden elektrophysiologische Untersuchungen an transfizierten HEK293-Zellen von Frau Dr. Kerstin Wirkner, Rudolf-Boehm-Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Leipzig, vorgenommen. Die Analyse der

Capsaicin-Dosis-Wirkungs-Kurve der deglycosylierten TRPV1-Mutante zeigte eine Verschiebung nach links mit einem erniedrigtem Maximum gegenüber dem Wildtyp-TRPV1. Die Aktivierung von TRPV1 durch 3 μM Capsaicin ließ sich durch Capsazepin antagonisieren. Eine pH-Abhängigkeit (pH 6.3, 7.4, 8.0) war nicht erkennbar. Wie zu erwarten war, sind die Ströme bei niedrigem pH größer und nehmen mit zunehmender Basizität ab (Abb. 3.1 von Frau Dr. Kerstin Wirkner, persönliche Mitteilung). Dabei ist zu berücksichtigen, dass ein niedriger pH sowie die Transfektion an sich die Vitalität der Zellen negativ beeinflusst.

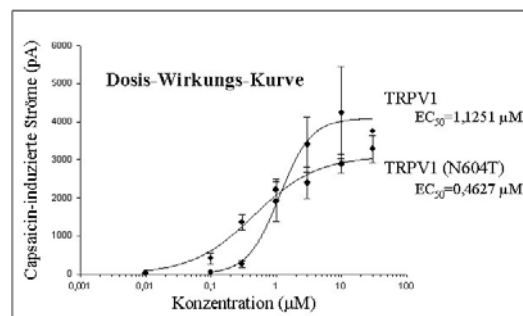


Abb. 3.1: Dosis-Wirkungskurve Capsaicin-induzierter Ströme von TRPV1 und TRPV1 (N604T). Gegenüber TRPV1 zeigt die Deglycosylierungsmutante eine Verschiebung der Dosis-Wirkungskurve nach links und ein erniedrigtes Maximum bei pH 7.4. Mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. Kerstin Wirkner.

Diesen ersten Ergebnissen zufolge führt die Deglycosylierung von TRPV1 dazu, dass schon bei niedrigeren Capsaicin-Konzentrationen ein Ionen-Einstrom erfolgt. Dies zeigt, dass unterschiedliche Ladungen an dieser Stelle die Modulation des Rezeptors beeinflussen können. Eine Sensibilisierung des Rezeptors gegenüber Capsaicin tritt auch bei der TRPV1-Mutante E600Q auf. Der mutierte Rezeptor ist 10mal sensitiver gegenüber Capsaicin mit einer $EC_{50} = 520$ nM für E600 und 40 nM für E600Q¹⁴. Die E600Q-Mutante repräsentiert hier den Wildtyp-TRPV1 unter sauren Bedingungen, was sowohl die Capsaicin- (Verschiebung hin zu einer niedrigeren Aktivierungskonzentration) als auch die Hitzeantwort (Verschiebung hin zu einer niedrigeren Aktivierungstemperatur) betraf. Für die Deglycosylierungsmutante von TRPV1 stehen also noch einige Experimente bezüglich der pH-, Capsaicin- und Hitzeantworten aus, um die Bedeutung der Glycosylierung des Rezeptors besser zu verstehen.

Im heterologen Expressionssystem scheint die Glycosylierung keinen Einfluss auf die Lokalisation des Rezeptors zu haben. Der Rezeptor befindet sich in F11-Zellen sowohl im glycosylierten als auch im nicht-glycosylierten Zustand überwiegend an der Plasmamembran. Die Glycosylierung hat damit keinen Einfluss auf das Targeting von TRPV1 in F11-Zellen. Allerdings müsste man sich die Wege, die der Rezeptor zur Plasmamembran nimmt, genauer ansehen. *In vivo* ist die Anzahl der Kanäle viel geringer als bei einer Überexpression in Zellen, die dabei geradezu mit TRPV1 überflutet werden. Es wäre interessant zu wissen, ob der nicht-glycosylierte TRPV1 nach der Translation den Weg vom ER direkt zur Plasmamembran nimmt oder wie bei der komplexen Glycosylierung über post-ER-Kompartimente (Golgi-Apparat, trans-Golgi-Netzwerk) zu dieser gelangt. Wenn er nicht den „Umweg“ über den Golgi-Apparat geht, könnte eine direkte Signalsequenz am N-Terminus des Rezeptors postuliert werden. Hinweise für eine solche Sequenz geben die Ergebnisse der TRPV1-Deletionsmutanten, in denen eine um den cytoplasmatischen C-Terminus verkürzte Mutante (TRPV1₁₋₆₉₀) an der Plasmamembran zu finden ist, während eine um den cytoplasmatischen N-Terminus Mutante (TRPV1₄₂₁₋₈₃₈) sich an intrazellulären Membranen, wahrscheinlich im Golgi-Apparat, befindet. Auch die Tatsache, dass die Fusion von GFP an den N-Terminus von TRPV1 dessen Lokalisation an die Plasmamembran stört, stützt die Hypothese einer Signalsequenz.

3.2.2.3 Einfluss der Glycosylierung von TRPV2

In Westernblots von nicht transfizierten F11-Zellysaten und von Rattenhirnextrakten konnte mit einem TRPV2-Antikörper nachgewiesen werden, dass der endogene TRPV2 sowohl in F11-Zellen als auch im Rattenhirn nicht glycosyliert vorliegt, da keine Veränderung des Laufverhaltens von TRPV2 nach Behandlung mit Endoglycosidasen stattfand. Interessanterweise wird transient transfizierter TRPV2 in F11-Zellen glycosyliert und lässt sich durch den Molekulargewichtsunterschied in Westernblots vom endogenen TRPV2 unterscheiden.

Für TRPV2 konnte ein Interaktionspartner mittels eines Yeast-Two-Hybrid Ansatzes identifiziert werden. Die Bindung des Proteins RGA (recombinase gene activator)¹⁶⁷ an TRPV2 ist transient, glycosylierungsabhängig und auf intrazelluläre Kompartimente beschränkt, was die Vermutung nahe legt, dass RGA als Chaperon

während der Reifung von TRPV2 fungiert. Die Bindung wurde ursprünglich in Rattenhirn gefunden, konnte darüber hinaus aber auch in einer Mastzelllinie der Ratte (RBL2H3) nachgewiesen werden. Ebenso wie in F11-Zellen wird TRPV2 endogen in dieser Zelllinie exprimiert, liegt aber glycosyliert vor. Weiter unten wird dieser Umstand nochmals im Hinblick auf die Lokalisation von TRPV2 angesprochen.

Anhand der experimentellen Daten, die in Versuchen mit anderen Ionenkanälen ähnlicher Topologie generiert wurden, ist ein regulierender Einfluss der Glycosylierung auf die Funktion von TRPV1 und TRPV2 nicht ausgeschlossen. Während jedoch schon zu Beginn der Erforschung von TRPV1 mit Capsaicin ein Agonist zur Verfügung stand und damit die Möglichkeit, funktionelle Aspekte zu untersuchen, gegeben ist, wurde erst vor kurzem mit 2-Aminoethoxydiphenylborat (2APB) ein Aktivator für TRPV2 (auch TRPV1 und TRPV3) bekannt¹⁶⁸. Deshalb stehen die funktionellen Untersuchungen noch aus.

3.2.2.4 Subzelluläre Lokalisation von TRPV1 und TRPV2

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die subzelluläre Lokalisation der Rezeptoren in F11- und HEK293-Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz sowie GFP-gekoppelte Rezeptorkonstrukte (vollständige, N- und C-terminal trunkierte Proteine) mittels Fluoreszenz- und konfokaler Laserscanning-Mikroskopie bestimmt. Dazu wurde die transiente Expression der entsprechenden Plasmide 48 Stunden nach Transfektion der beiden Zelllinien F11 und HEK293 analysiert.

Lokalisation von TRPV1

Der heterolog exprimierte TRPV1 konnte in F11-Zellen überwiegend an der Plasmamembran und in Neuriten-artigen Ausläufern lokalisiert werden, wohingegen er sich in HEK293-Zellen überwiegend an intrazellulären Membranen befand. Letzteres stimmt mit publizierten Daten überein, die für TRPV1 eine überwiegend intrazelluläre Lokalisation angeben. So wurde TRPV1-GFP in COS7-Zellen, einer von Nierenfibroblasten der afrikanischen grünen Meerkatze abgeleiteten Zelllinie, hauptsächlich an intrazellulären Membranen (ER) gefunden^{138,169,170}. Ebenfalls intrazellulär wurde heterolog exprimierter TRPV1 in CHO- (chinese hamster ovary), C6- (Rattenglioma) und Sf9- (Spodoptera frugiperda ovary) Zellen gefunden¹⁶⁹⁻¹⁷¹.

Dass TRPV1 in F11-Zellen an der Plasmamembran zu finden war, könnte mit dem neuronalen Ursprung dieser Zelllinie zusammenhängen. Die Vermutung, dass TRPV1 in neuronalen Zellen an der Plasmamembran vorkommt, wird durch eine immunocytochemische Analyse an Gewebeschnitten unterstützt, bei der TRPV1 in der Plasmamembran von DRG-Zellen und Nervenendigungen im Hinterhorn des Rückenmarks gefunden wurde¹⁷².

Fehlt dagegen der cytoplasmatische N-Terminus, so ist die Translokation an die Plasmamembran gestört. Es konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus von TRPV1 mit Proteinen des SNARE-Komplexes, Snapin und Synaptotagmin IX, interagiert¹⁷³. Diese Proteine spielen eine zentrale Rolle bei der Exozytose und sind verantwortlich für die Fusion von Vesikel- und Plasmamembran. Im Falle von TRPV1 wird die Translokation des Rezeptors von intrazellulären Kompartimenten zur Plasmamembran durch PKC induziert¹⁷³, wobei die Phosphorylierungsstelle im cytoplasmatischen C-Terminus liegt¹⁷⁴. Auch eine N-terminal-trunkierte TRPV1-Spleißvariante zeigte keine Aktivität in *Xenopus laevis* Oozyten, was darauf hinweist, dass die intrazelluläre N-terminale Domäne essentiell für die Formierung eines funktionellen Rezeptors an der Plasmamembran ist¹²⁹.

Eine weitere Form der TRPV1-Regulation wurde erst kürzlich bei Untersuchungen des orthologen Rezeptors TRPV1 der Maus beobachtet¹⁷⁵. Aus dem DRG von C57BL/6-Mäusen wurden zwei Splice-Varianten, TRPV1 α und TRPV1 β , isoliert, von denen nur TRPV1 α einen funktionellen Kanal bilden kann. TRPV1 β fehlen im Vergleich zu TRPV1 α N-terminal 10 Aminosäuren, wodurch der Rezeptor vermutlich instabil wird und in geringeren Mengen in der Zelle zu finden ist. Nach Co-Expression beider Varianten in *Xenopus laevis*-Oozyten wurde ein dominant-negativer Effekt hinsichtlich der TRPV1 α -Aktivität gemessen. Dies war vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Komplexbildung von TRPV1 β mit der α -Untereinheit zu einer Instabilität von TRPV1 α führte und weniger aktiver Rezeptor an der Zelloberfläche verfügbar war. Es konnte außerdem durch Oberflächenbiotinylierung und Streptavidin-Präzipitation eine Anreicherung des glycosylierten TRPV1 erzielt werden, was die Vermutung nahe legt, dass erst nach vollständiger Prozessierung (Glycosylierung) ein Transport an die Plasmamembran erfolgt¹⁷⁵.

Eine Störung des Transportes an die Plasmamembran konnte innerhalb dieser Arbeit beobachtet werden, wenn das grün fluoreszierende Protein (GFP) mit dem N-

Terminus des Rezeptors fusioniert wurde. Fehlt hingegen der cytoplasmatische C-Terminus, der nach Garcia-Sanz et al.¹⁷⁶ verantwortlich ist für die Heteromerisierung des Rezeptors, fand sich TRPV1 nach heterologer Expression in F11-Zellen trotzdem an der Plasmamembran. Eine Eingrenzung der die Lokalisation determinierenden Sequenz steht allerdings noch aus.

Die Beobachtung, dass TRPV1 in F11-Zellen überwiegend an der Plasmamembran und weniger im ER vorliegt, während in HEK293-Zellen die Verhältnisse umgekehrt sind, wird durch die Beschreibung zweier TRPV1-Pools an der Plasmamembran und im ER gestützt¹⁷⁰. Dies spricht für spezifische Interaktionen der TRPV1-Termini mit Proteinen und/oder Lipiden zellulärer Membranen, wobei N- und C-terminale Fragmente für die unterschiedliche Membranlokalisation verantwortlich sind und untermauert die Hypothese, dass die TRPV1-Lokalisation und damit seine Aktivität über einen regulierten Vesikel-Shuttle-Mechanismus¹⁷³ gesteuert wird. Bei einer Studie zur vesikulären Translokation von TRP-Kanälen wurde für TRPC5 die Translokation in Vesikeln unterhalb der Plasmamembran in die Plasmamembran durch einen EGF/RacI/PIP(5)K α -Signalweg gezeigt. Die Erhöhung funktioneller TRPC5-Kanäle in der Plasmamembran führte zu einer Erniedrigung der Nervenwachstumsrate in hippokampalen Neuronen¹⁰¹

Lokalisation von TRPV2

Der endogene TRPV2 liegt in F11-Zellen cytoplasmatisch vor, wohingegen der heterolog exprimierte TRPV2 überwiegend an der Plasmamembran und in Neuriten-artigen Ausläufern lokalisiert ist. Eine mögliche Ursache für die unterschiedliche Lokalisation könnte, wie bereits weiter oben angedeutet, in der Glycosylierung des Rezeptors liegen. Allerdings war die Proteinmenge des endogenen TRPV2 in F11-Zellen sehr gering (schwache Immunfluoreszenzsignale und nur sehr dünne Bande im Westernblot), so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass sich ein kleiner nicht detektierbarer Anteil des Rezeptors doch an der Plasmamembran und dort auch glycosyliert befindet.

Ein Effekt der Glycosylierung auf die Stabilität und das Trafficking zur Plasmamembran wurde bei dem spannungsabhängigen Kaliumkanal KCNA4 beobachtet¹⁷⁷. Zum einen wurde eine in COS7-Zellen exprimierte deglycosylierte KCNA4-Mutante beinahe vollständig im ER zurückgehalten und hatte zudem eine

kürzere Halbwertszeit als der Wildtyp-KCNA4. Dies wird eventuell durch eine fehlende Protein-Protein-Interaktion verursacht, die für eine normale Reifung von KCNA4 notwendig ist. Das wäre auch eine mögliche Erklärung der intrazellulären Lokalisation des endogenen nicht glycosylierten TRPV2 in F11-Zellen. Es stellt sich allerdings die Frage, warum die heterologe Expression des Rezeptors in den Zellen zur Glycosylierung und damit zum Transport an die Plasmamembran führt.

Obwohl TRPV2 endogen, also im natürlichen Umfeld, in F11-Zellen und der Mastzelllinie RBL2H3 (s. Glycosylierung TRPV2) exprimiert wird, gibt es einen Unterschied hinsichtlich der subzellulären Lokalisation des Rezeptors. In den RBL2H3-Zellen fand sich TRPV2 sowohl an intrazellulären Membranen (ER) als auch an der Plasmamembran¹⁶⁷. Allerdings wurde nicht gezeigt, ob der Rezeptor nach der Behandlung der Zellen mit Tunicamycin, welches die N-Glycosylierung im ER hemmt, weiterhin an der Plasmamembran lokalisiert war.

Anders als bei dem oben beschriebenen Kanal KCNA4 hat die Deglycosylierung des in F11-Zellen heterolog exprimierten Ratten-TRPV2 scheinbar keinen Einfluss auf den Transport zur Plasmamembran. Eigene Ergebnisse deuten darauf hin, dass der heterolog exprimierte Rezeptor auch ohne Glycosylierung überwiegend an der Plasmamembran zu finden ist. Das bedeutet, dass das Trafficking nicht vom Vorhandensein (komplexer) Glycosylierung abhängig ist.

3.2.2.5 TRPV1 ist Bestandteil eines Signalkomplexes

Die Untersuchung des TRPV1-Signalkomplexes erfolgte mit Hilfe eines zweidimensionalen Systems aus Blauer Nativer PAGE und SDS-PAGE. Die in der ersten Dimension beobachtete Tetramerstruktur des TRPV1-Komplexes zeigte sich in der zweiten Dimension als distinkte Spots von Mono-, Di-, Tri- und Tetramer.

Dass TRPV1 als Tetramer vorliegt, wurde durch die Ergebnisse anderer Gruppen bestätigt^{178,179}. Außerdem war aufgrund der bisherigen Erkenntnisse über diese Klasse von Rezeptoren (6TM + konservierte Porenschleife) eine solche Anordnung sehr wahrscheinlich. In einer kürzlich publizierten Arbeit wurde darüber hinaus eine für die Tetramerisierung essentielle Domäne im C-Terminus von TRPV1 identifiziert. Nur wenn der als TRP-Domäne bezeichnete Bereich zwischen Glu684-Arg721 vorhanden war, konnte die Bildung von Tetrameren beobachtet werden¹⁷⁶. In

einer eingehenden Untersuchung der TRPC-Rezeptorfamilie mittels Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) wurden verschiedene heteromere Komplexe identifiziert, die es einer Zelle wahrscheinlich ermöglichen, auf veränderte physiologische Bedingungen zu reagieren¹⁸⁰. Es wurde gefunden, dass TRPC1 mit TRPC4 und TRPC5 Komplexe eingehen kann. Es sind Homo- bzw. Heteromerisierung nahe verwandter TRPC-Kanäle möglich, so bei TRPC4/5 und TRPC3/6/7. Weitgehend unklar ist, welche Mechanismen zur Bildung der jeweiligen Komplexe führen. Auch für TRPV1 wurde gezeigt, dass er *in vitro* mit TRPV3 Heteromere ausbilden kann¹⁰³.

In den eigenen Versuchen wurden zusätzlich zwei weitere Spots mit einem höheren Molekulargewicht detektiert, die größere Komplexe als das TRPV1-Tetramer abbilden. Dabei wird es sich vermutlich um einen mit regulatorischen Proteinen assoziierten Rezeptorkomplex handeln. Die funktionelle Variabilität von Rezeptoren in verschiedenen Geweben wird nicht nur über die Bildung von Heterotetrameren erreicht, sondern auch über die Assoziation der primären Rezeptoruntereinheiten mit regulatorischen Proteinen. Eine ganze Reihe von assoziierten oder auch Helfer-Proteinen kennt man von den spannungsabhängigen Kaliumkanälen^{181,182}. Es sind sowohl cytoplasmatische als auch Membran-integrierte Proteine, die mit den Rezeptoruntereinheiten interagieren und dadurch z. B. deren Expressionsniveau, die intrazelluläre Verteilung und die biophysikalischen Eigenschaften beeinflussen. Mutationen in den assoziierten Proteinen konnten mit erblich bedingten Erkrankungen, die ihre Ursache in der Veränderung von Ionenkanälen haben, sogenannte ‚Channelopathies‘, assoziiert werden. So ist z. B. die genetisch heterogene autosomal-rezessiv vererbte Herzrhythmuskrankung LongQT-Syndrom 1 (LQT1, Jervell und Lange-Nielsen Syndrom) u.a. auf Mutationen im Gen KCNE1 (minK) zurückzuführen¹⁸³.

Leider waren die in den eigenen Versuchen beobachteten Spots, und damit auch eventuell im Komplex vergesellschaftete Proteine, nicht im Gel, sondern nur im Westernblot durch TRPV1-Antikörper detektierbar und daher der massenspektrometrischen Analyse nicht zugänglich. Auch der Versuch, den Rezeptor sowie die assoziierten Proteine durch Oberflächenbiotinylierung zu markieren, um zu untersuchen, ob der im Westernblot detektierte hochmolekulare Komplex an der Plasmamembran vorkommt oder aus dem ER stammt, war nicht

erfolgreich. Die mit dem TRPV1-Plasmid transfizierten Zellen hielten der Prozedur der Biotinylierung nicht stand.

3.2.3 Identifikation von TRPV1- und TRPV2-Interaktionspartnern

Da sich die TRPV1-assoziierten Proteine im postulierten Signalkomplex mittels BN-PAGE nicht analysieren ließen, wurde zu deren Identifizierung eine neue Strategie gewählt. MBP- (*maltose binding protein*-) Fusionsproteine der cytoplasmatischen Termini von TRPV1 (und TRPV2) wurden in Bakterien exprimiert, über das MBP an eine Amylosematrix gebunden und mit F11-Zell- oder Rattenrückenmarkextrakten inkubiert (Pull-Down-Assay). Aus Differenzbanden im Vergleich zu Kontrollansätzen konnte für TRPV1 bisher Aktin identifiziert werden. Für TRPV2 konnten neben Aktin auch β -Tubulin und die P450-(Cytochrom)-Oxidoreduktase als potentielle Interaktionspartner identifiziert werden.

Aktin und β -Tubulin als Bestandteile von Mikrofilamenten bzw. Mikrotubuli des Cytoskeletts sind als Interaktionspartner von TRPV1 und TRPV2 insofern interessant, da sie u.a. eine wichtige Rolle beim Vesikeltransport durch das Cytosol (durch das Motorprotein Myosin an Aktinfilamenten¹⁸⁴) sowie beim Organell- und Vesikeltransport in Neuronen (durch Motorproteine wie Kinesin und Dynein an Mikrotubuli¹⁸⁵) spielen. Die P450-(Cytochrom)-Oxidoreduktase ist ebenfalls von großem Interesse, da Mitglieder aus der Superfamilie von Cytochrom-P450-Enzymen hydrophobe Substanzen zu wasserlöslichen Produkten hydroxylieren und auch AA metabolisieren können¹⁸⁶⁻¹⁸⁸. Für TRPV2 wurde zwar eine Aktivierung durch AA-Derivate noch nicht gezeigt, diese ist aber aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit zu TRPV1 nicht ausgeschlossen.

β -Tubulin wurde inzwischen als direkter Interaktionspartner von TRPV1 durch weitere Pull-Down-Experimente identifiziert und durch Co-Immunpräzipitation verifiziert¹⁴⁰. Die Ergebnisse von C. Goswami zeigten eine calciumabhängige Bindung von β -Tubulin an den C-Terminus des Rezeptors. Beide Proteine colokalisieren an der Plasmamembran. Diese Interaktion hat vermutlich einen Einfluss auf die Stabilität des Tubulins: so fördert die Bindung des rekombinanten TRPV1-C-Terminus die Polymerisation von Tubulin *in vitro* und wirkt einer durch niedrige Temperaturen bzw. Nocodazol verursachten Depolymerisation entgegen.

Die Ergebnisse zeigen erstmals, dass das Tubulin-Cytoskelett ein dem TRPV1-Rezeptor nachgeschalteter Effektor ist.

Die Analyse weiterer Proteinbanden aus den Pull-Down-Experimenten für TRPV1 und TRPV2 sowie die Verifizierung von Aktin und P450-(Cytochrom)-Oxidoreduktase als direkte Interaktionspartner von TRPV2 steht noch aus.

3.3 Ausblick auf zu untersuchende Fragestellungen

3.3.1 Identifizierung unbekannter Interaktionspartner sowie ihre funktionelle Analyse

Die Methode der Pull-Down-Assays ist mittlerweile soweit ausgereift, dass neue TRPV1-Interaktionspartner gefunden werden konnten, so dass eine Ausweitung der Suche nach Interaktionspartnern für TRPV2, TRPV3 und TRPV4 sinnvoll ist. Bislang konnten mit dieser Methode zwei neue TRPV1-Interaktionspartner identifiziert und mittlerweile auch verifiziert werden (β -Tubulin¹⁴⁰ und Annexin VI, Diplomarbeit von Mathias Broser). β -Tubulin ist auch ein direkter TRPV2-Interaktionspartner (Diplomarbeit von Lisa M. Münter).

Es müssen aber weitere, sensitivere Methoden herangezogen werden, da gerade die Probenaufarbeitung für die Pull-Down-Assays, sowie die Kontrollen zuweilen problematisch sind. Hierfür bietet sich die Methode des Yeast-Two-Hybrids an, aber es könnten auch neue Wege beschritten werden, beispielsweise die Suche nach Interaktionspartnern mittels Phage Display.

Sobald neue Interaktionspartner mit einer dieser Methoden gefunden sind, sollten diese unabhängig z.B. mit Hilfe der Co-Immunpräzipitation verifiziert und funktionell analysiert werden. Die funktionelle Analyse von Protein-Protein-Interaktionen für potentielle Interaktoren des TRPV1- und TRPV2-Proteinkomplexes setzt zunächst die Lokalisierung der beteiligten Partner im selben Zellkompartiment voraus. Eine geeignete Methode ist die Kombination von Fluoreszenzmikroskopie mit der Technik des Fluoreszenz Resonanz Energie Transfers (FRET). Hierbei kann die Energieübertragung von einem angeregten Donor-Fluorophor auf ein Akzeptor-Fluorophor in enger räumlicher Nähe verfolgt werden. Dafür werden die zu untersuchenden Proteine mit unterschiedlichen Fluorophoren markiert. Durch die Expression beider Fusionsproteine in einer Zelle kann eine Interaktion mittels der

FRET-Mikroskopie unter physiologischen Bedingungen zeitaufgelöst beobachtet werden. Diese Methode bietet somit die Möglichkeit, die Dynamik der Entstehung von Proteinkomplexen oder transiente Interaktionen zu untersuchen. Weiterhin können zur Aufklärung von Signaltransduktionswegen entsprechende Inhibitoren benutzt werden, um mögliche Interaktionen zu blockieren.

Auch die Bestimmung von physikalischen Größen einer Protein-Protein-Interaktion, z.B. der Dissoziationskonstante einer Bindung durch die Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (SPR)¹⁸⁹ oder der Enthalpie sowie Stöchiometrie einer Bindung durch die isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)^{190,191} gehört zur funktionellen Analyse, sofern die zu untersuchenden Proteine in gereinigter Form vorliegen.

3.3.2 Umfassende Analyse von TRPV1-regulierenden und TRPV1-regulierten Signalwegen

Wie wichtig die Kenntnis aller molekularen Interaktoren und funktionellen Eigenschaften eines für den Eingriff mit Schmerzmedikamenten vorgesehenes Protein ist, zeigt ein aktueller Fall:

Das Rheumamittel Rofecoxib (Vioxx®), eine spezifischer COX-2-Hemmer, kann tödliche Blutgerinsel verursachen und wurde vom Markt genommen^{192,193}. Rheuma- und Arthroseschmerzen werden von Prostaglandinen verursacht, die durch die Induktion von Cyclooxygenasen (COX) aus Arachidonsäure synthetisiert werden. Es gibt zwei Formen dieses Enzyms, COX-1, das konstitutionell vorkommt und die schützende Prostaglandinwirkung in der Magenschleimhaut vermittelt, und COX-2, das durch Entzündungsprozesse induziert wird, aber in einigen Organen auch konstitutionell vorkommt (z.B. der Niere). Nichtopioidanalgetika (nonsteroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs) wie Aspirin hemmen sowohl COX-1 als auch COX-2. Wegen der magenschädigende Wirkung solcher Medikamente werden magenschonende, spezifische COX-2-Hemmer wie Vioxx® entwickelt. Das Mengenverhältnis von COX-1 und COX-2 ist aber im Blut sehr fein ausbalanciert. Eine spezifische Hemmung von COX-2 im Blut führt zu einer erleichterten Blutgerinnung, womit Gefäße verstopft werden. Die Folge davon sind Herzinfarkt und Schlaganfall.

Damit potente TRPV1-Antagonisten gegen bestimmte Schmerzzustände gezielt hergestellt werden können, müssen alle molekularen, auch gewebespezifischen, Determinanten der Kanalaktivierung, -funktion und -modulation bekannt sein. Das gleiche gilt für die nachgeschalteten Signalwege des TRPV1-Signalkomplexes.

Abbildung 3.2 fasst die wichtigsten bekannten Signalwege, die zur Aktivierung und Modulation von TRPV1 führen können, zusammen.

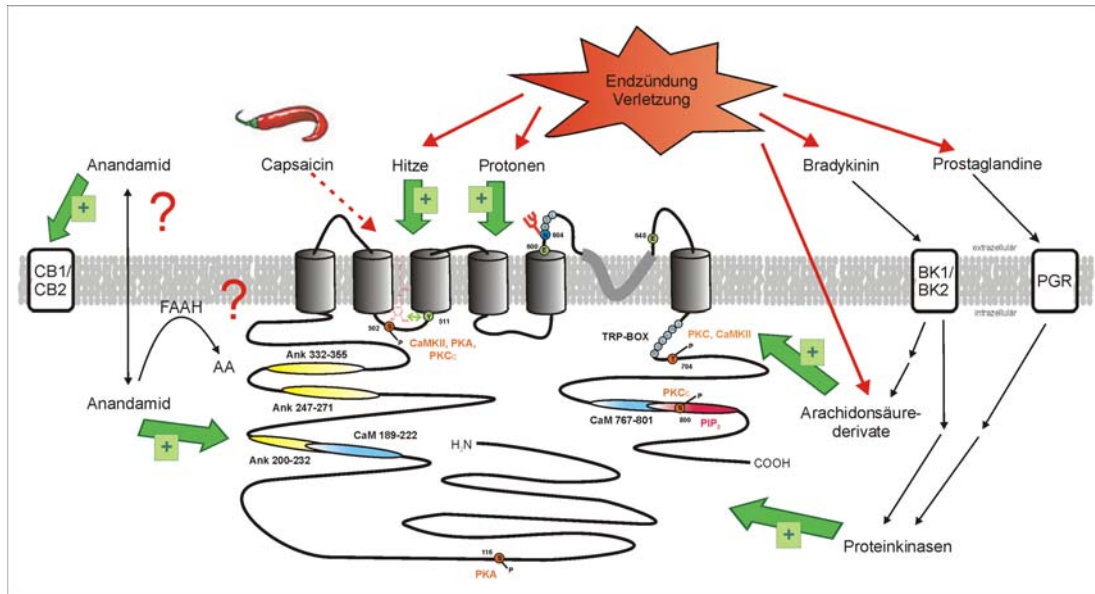


Abb. 3.2: TRPV1 ist ein Integrator vielfältiger Signalwege (adaptiert nach¹⁹⁴). TRPV1 kann durch Vanilloide wie Capsaicin, ansteigende Temperatur und Erniedrigung des pH-Wertes, sowie durch Arachidonsäurederivate direkt aktiviert werden. Eine indirekte Aktivierung erfolgt durch Proteinkinasen aus aktivierten Signalwegen von Endzündungsmediatoren (Prostaglandine, Bradykinin) nach Bindung an ihre G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (PGR bzw. BK1/BK2). Mehrere Aminosäuren (in der Abbildung markiert) spielen bei der Aktivierung und Sensibilisierung von TRPV1 durch verschiedenen Mediatoren eine wichtige Rolle. Der Crosstalk von TRPV1 und Cannabinoid-Rezeptoren (CB1/CB2) durch den gemeinsamen Agonisten Anandamid ist noch weitgehend unerforscht.

Unter den Crosstalk-Beziehungen von TRPV1 zu G-Protein gekoppelten Rezeptoren, ist die Regulation der Aktivierung der Cannabinoid-Rezeptoren (CB1/CB2) und TRPV1 durch Anandamid am wenigsten verstanden. Anandamid kann beide Rezeptoren direkt aktivieren, wobei die Aktivierung von TRPV1 zu einer Vasodilatation und Ausschüttung von CGRP führt⁷². Durch einen bidirektionalen Transport durch die Plasmamembran gelangt Anandamid in die Zellen, wo es der schnellen Hydrolyse zu Arachidonsäure (AA) durch FAAH (fatty acid amine

hydrolase) unterworfen ist. Aus AA entstehen über vielfältige Stoffwechselwege Arachidonsäurederivate, die wiederum TRPV1 aktivieren können. Ob FAAH und TRPV1 in denselben Neuronen coexprimiert wird, ist nicht bekannt¹⁹⁵.

Im Falle von TRPV1 (und natürlich auch den anderen Rezeptoren der TRP-Familie) bleibt die Kernfrage offen, wie dieser Rezeptor genau arbeitet. Von großem Interesse ist die Aufklärung aller komplexen Zusammenhänge, deren Komponenten und ihrer gegenseitigen Modulation.