

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie

(Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Ingolf Cascorbi)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**CHARAKTERISIERUNG DER E179K-VARIANTE DES
TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL ANKYRIN 1 PROTEINS IN VITRO**

Inauguraldissertation zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

JONAS MARIUS BAASTRUP

aus Karlebo, Dänemark

Kiel 2014

1. Berichtstatter:	Prof. Dr. Dr. I. Cascorbi
2. Berichtstatter:	Prof. Dr. T. Bartsch
Tag der mündlichen Prüfung:	14. Januar 2016
Zum Druck genehmigt, Kiel den	5. Oktober 2015
Gezeichnet:	Prof. Dr. J. Roider

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und Fachbegriffe.....	1
1 Einleitung	3
1.1 Thermosensation.....	3
1.2 Die TRP-Kanal Superfamilie.....	4
1.3 Der TRPA1-Kanal.....	4
1.3.1 Struktur und Expression des TRPA1-Proteins	5
1.3.2 Lokalisation und somatosensorische Funktion.....	8
1.3.3 Polymorphismen im TRPA1-Gen und Rolle bei Schmerzerkrankungen	12
1.4 Ziele der Arbeit	14
2 Material und Methoden.....	15
2.1 Nukleinsäurekonzentrationsbestimmungen	15
2.2 Klonieren des TRPA1-Vektors.....	16
2.2.1 Vektoren.....	16
2.2.2 Restriktion von DNA.....	17
2.2.3 Agarose Gelelektrophorese	18
2.2.4 Transformation von One-Shot [®] Top10 <i>E. coli</i> Bakterien	19
2.2.5 DNA-Isolation mittels QIAGEN Plasmid Kit.....	19
2.3 Zellkultur.....	20
2.3.1 Zelllinie.....	21
2.3.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen	22
2.3.3 Passagieren von Zellen	22
2.3.4 Transiente Transfektion der Zellen mit TRPA1-DNA	23
2.4 Proteinanalyse.....	24
2.4.1 Proteinisolierung	24
2.4.2 Aceton Präzipitation	26
2.4.3 SDS-PAGE	26

2.4.4	Western Blot	27
2.4.5	Biotinylierungsassay	29
2.5	Relative mRNA Quantifizierung	30
2.5.1	RNA Isolation	311
2.5.2	Umschreibung von RNA in cDNA	31
2.5.3	Taqman™ Expression Assay und quantitative <i>real-time</i> RT-PCR	32
2.6	Kalzium-Influx-Messung mittels Fluo-4 NW Calcium Assay™	34
2.7	Rasterelektronmikroskopie	35
2.8	Immunhistochemie	36
2.9	Statistische Auswertung	38
3	Ergebnisse	39
3.1	mRNA- und Protein-Expression der TRPA1-Varianten	39
3.2	<i>Trafficking</i> der TRPA1-Proteine in der Plasmamembran	41
3.2.1	Biotinylierung der TRPA1-Oberflächenproteine	41
3.2.2	Zelluläre Lokalisation der TRPA1-Varianten	42
3.3	Funktionalitätsmessung der TRPA1-Varianten	43
3.3.1	Funktionalität während thermaler Stimulation	44
3.3.2	Inhibition von TRPA1 mittels HC-030031	46
3.4	Morphologie der HEK 293T/17-Zellen während thermaler Stimulation	47
4	Diskussion	50
5	Zusammenfassung	55
6	Literaturverzeichnis	56
7	Lebenslauf	67
8	Veröffentlichungen	68
9	Danksagung	69

Abkürzungen und Fachbegriffe

AA	<i>Aminosäure</i>
ACh	<i>Acetylcholin</i>
ANK	<i>Ankyrin-Repeat-Domäne</i>
BCA	<i>Bicinchonic Acid Assay</i>
BSA	<i>bovines Serumalbumin</i>
CFU	<i>colony forming unit</i>
CGRP	<i>calcitonin-gene related peptides</i>
CHO	<i>Chinese hamster Ovarialzellen</i>
C _T	<i>threshold cycle (Schwellenwertzyklus)</i>
Cu	<i>Cuprum, Kupfer</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	<i>Ethylendinitrilotetraacetat</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescence protein</i>
FCS	<i>fetalem Kälberserum</i>
GABA	<i>γ-Aminobuttersäure</i>
GAPDH	<i>Glyceradehyd-3-Phosphatdehydrogenase</i>
HBSS	<i>Hanks' balanced salt solution</i>
HEK 293T/17	<i>humane embryonale Nierenzellen, Subklon 17</i>
HEPES	<i>2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure</i>
HRP	<i>horseradisch peroxidase (Meerrettichperoxidase)</i>
IP ₃	<i>Inositoltriphosphat</i>
LB	<i>lysogeny broth (Medium)</i>
MOPS	<i>3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure</i>
N	<i>Nitrogenium, Stickstoff</i>
NGF	<i>nerve growth Faktor</i>
OD	<i>Optische Dichte</i>
PBS	<i>Phosphat-gepufferte Saline</i>
PCR	<i>Polymerasekettenreaktion</i>
PHS	<i>paradoxical heat sensation</i>
PIP ₂	<i>Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat</i>

PKC	<i>Phosphokinase C</i>
PLC	<i>Phospholipase C</i>
PVDF	<i>Polyvinylidenflourid</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative real time PCR</i>
RFU	<i>relative Fluoreszenzeinheiten</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	<i>Raumtemperatur</i>
SDS	<i>Natriumdodecylsulfat</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SOB	<i>super optimal broth (Medium)</i>
SOC	<i>SOB with Catabolite repression</i>
Sulfo-NHS-SS-Biotin	<i>Sulfosuccinimidyl-2-(Biotinamido)Ethyl-1,3-Dithiopropionat</i>
TBS	<i>Tris-gepufferte Saline</i>
TBS-T	<i>Tris-gepufferte Saline Tween</i>
TBE	<i>Tris-Borat-EDTA</i>
TE	<i>Tris-EDTA</i>
Tris	<i>Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan</i>
TRPA1	<i>transient receptor potential Ankyrin 1-Kanal</i>
TRPV1	<i>transient receptor potential Vanilloid 1-Kanal</i>
Tween	<i>Polyoxyethylen(20)-sorbitan-Monolaurat</i>

1 Einleitung

1.1 Thermosensation

Die externe und interne Perzeption oder Wahrnehmung von Temperatur ist ein wichtiger sensorischer Mechanismus, der vor schädlichen Temperaturen warnen und so zur Vermeidung der Zerstörung von lebensnotwendigem Gewebe beitragen soll (McKemy 2007; Zurborg 2009). Die Thermosensation gehört zu dem komplexen System der Berührungsempfindung, das auch mechanische und chemische Reize umfasst. Menschen und andere Vertebraten können durch hoch spezialisierte Neuronen-Endungen des peripheren Nervensystems, die auf die Haut projizieren, verschiedene Qualitäten von Temperaturen wahrnehmen: nicht-schädliche Wärme (32-42 °C; wahrgenommen als angenehme Wärme), Kälte (15-30 °C; wahrgenommen als angenehme Kühlung), potentiell schädliche Hitze (>43 °C; wahrgenommen als schmerzhaft) und potentiell schädliche Kälte (<15 °C; ebenfalls als schmerzhaft wahrgenommen) (Hensel 1981; Spray 1986; Treede *et al.* 1992; Davis *et al.* 2002; Dhaka *et al.* 2006; Zurborg 2009; Nilius *et al.* 2012). Weiterhin ist das Gespür für Temperaturen bei Säugetiere wichtig für die Regulation der Körpertemperatur und z. B. beim Jagen, Schlafen und Essen unentbehrlich: wenn der Körper z. B. zu warm wird, kühlt die Perspiration. Umgekehrt sorgt das Kältezittern bei kalten Temperaturen für die Wiedererwärmung. Ohne diese Regulation könnte die Homöostase des Körpers, also das Streben nach Aufrechterhaltung des Gleichgewichts im inneren Milieu, nicht gesichert werden (Huang *et al.* 2006).

Menschen können minimale Temperaturveränderungen von bis zu wenigen Grad Celsius wahrnehmen. Untersuchungen haben gezeigt, dass bereits das Abkühlen der Haut um 1 °C wahrgenommen wird (Campero *et al.* 2001). Der Mechanismus der Thermosensation wird seit den 1950er Jahre intensiv erforscht und ist zwischenzeitlich zunehmend besser verstanden worden. Bei thermaler Stimulation feuern Thermorezeptoren Aktionspotentiale aus der Peripherie des Körpers in Richtung des zentralen Nervensystems, in dem das Signal weiter verarbeitet wird (Campero *et al.* 2001; Zurborg 2009). Bis vor etwa zwei Jahrzehnten wusste man wenig über den genauen molekularen Mechanismus von thermaler Transduktion. Die Entdeckung von TRPV1, einem Hitze-gekoppelten Ionen-Kanal der TRP-Familie durch Caterina *et al.* (1997), hat für einen enormen Durchbruch gesorgt.

1.2 Die TRP-Kanal Superfamilie

Die *transient receptor potential channel*-Superfamilie, kurz TRP-Kanäle, bezeichnet eine große Familie von Kationkanälen, die vor über 40 Jahren bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt wurden (Cosens *et al.* 1969). Die TRP-Kanäle spielen bei vielen unterschiedlichen Spezies eine wichtige Rolle. Sie tragen durch Aktivierung zu z. B. der sensorischen Funktion von Geschmack, der Detektion von Pheromonen, Licht und Schmerzreizen, aber auch zu Motilitätsfunktionen wie Muskel- und Vasokonstriktion bei (Nilius *et Owsianik* 2011). Die Kanäle sind entsprechend in vielen verschiedenen Organen vorhanden, sowohl bei Menschen als auch bei Nagern und Affen, wo sie sehr unterschiedliche Aufgaben erfüllen. Man findet sie z. B. im Gehirn, Rückenmark, Spinalganglien, Herz, Lunge, Leber, Nieren, Nebennieren, Milz, Pankreas, Dünndarm, Kolon, Harnblase, Testis, Prostata, Ovar, in der Plazenta und in spezifische Zellen wie Haar-Zellen, Keratinozyten, Geschmacks-Zellen, Endothelzellen und quergestreiften Muskelzellen (Venkatachalam *et al.* 2007; Nilius 2007; Clapham *et al.* 2011). TRP-Kanäle sind polymodal, werden also durch Reize unterschiedlicher Natur aktiviert – z. B. chemische, thermische und mechanische Reize sowie Veränderungen der Ionenkonzentration, etwa bei Prozessen wie der Osmose (Zhang *et al.* 2008). Sie werden nicht nach Funktion sondern gemäß strukturellen Ähnlichkeiten in sieben Familien unterteilt. Hierbei sind die Hauptmerkmale ihre sechs Transmembrandomänen und die Permeabilität für Kationen. Die Kanäle werden zudem in zwei Untergruppen unterteilt. Fünf Kanäle bilden die Untergruppe 1: TRPC (*Canonical*, 1-7), TRPV (*Vanilloid*, 1-6), TRPM (*Melastatin*, 1-8), TRPN (*nompC*, nicht in Vertebraten exprimiert), TRPA (*Ankyrin*) und zwei die Untergruppe 2: TRPP (*Polycystein*, 1-3) und TRPML (*Mucolipin*, 1-3) (Clapham 2007; Wu *et al.* 2010).

1.3 Der TRPA1-Kanal

Der *transient receptor potential Ankyrin 1*-Kanal oder TRPA1 (auch bekannt als ANKTM1 und P120, Jaquemar *et al.* 1999) ist das einzig bisher entdeckte Mitglied der TRPA-Familie beim Menschen. Nach heutigem Wissensstand gehört er zusammen mit TRPV und TRPM zu den sogenannten thermosensitiven TRP-Kanälen, die bei unterschiedlicher Temperatur aktiviert werden (Patapoutian *et al.*

2003; Abb. 1). Alle thermosensitiven TRP-Kanäle können zusätzlich auch noch von chemischen Substanzen (wie Capsaicin, Menthol, Wasabi, Zimt) und mechanischem Stress oder Scherkräfte aktiviert werden (Venkatachalam *et al.* 2007). Sie sind hauptsächlich in nozizeptive Nervenfasern des Typ C (nicht myelinisiert; vermittelt Hitze und Schmerz), Typ A δ (schwach myelinisiert; vermittelt Wärme bzw. Hitze, Kälte und Schmerz), Typ A β (stark myelinisiert; vermittelt den Tastsinn) und sensorischen Neuronen des peripheren Nervensystems exprimiert (Story *et al.* 2003; Patapoutian *et al.* 2003; Jordt *et al.* 2003; Nagata *et al.* 2005; Kwan *et al.* 2009).

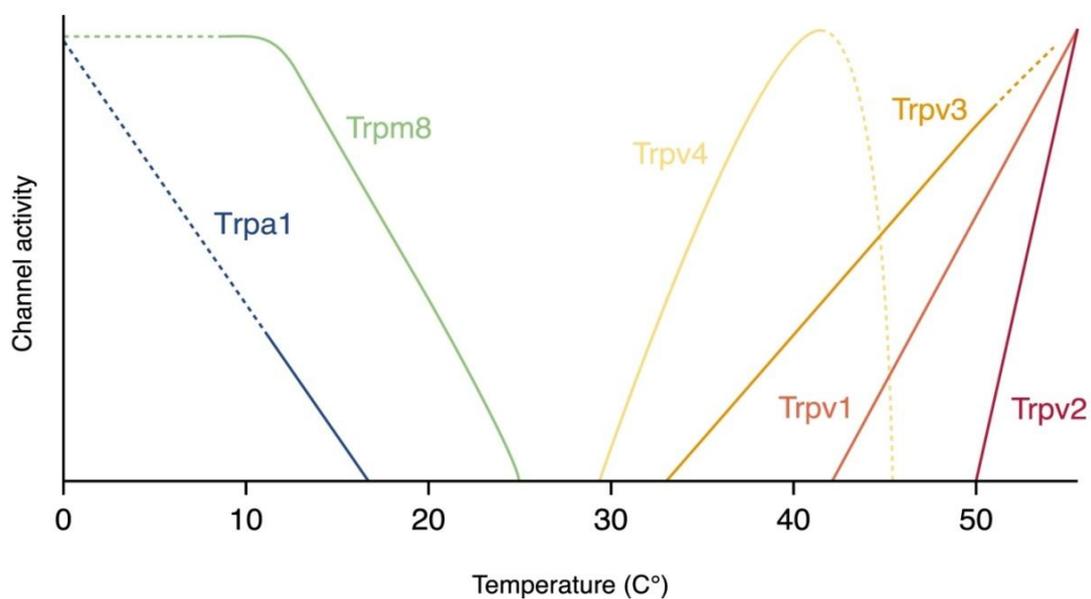


Abb. 1 Temperaturen ausgehend von schmerzhafter Kälte (<17 °C) bis zu schmerzhafter Hitze (>43 °C) aktivieren verschiedene Thermo-TRP-Kanäle. Die abgebildeten Schwellenwerte und das maximale Aktivitätsniveau basieren auf experimentellen Beobachtungen *in vitro*. Die Werte repräsentieren die Durchschnittswerte von mehreren Messungen. Gestrichelte Linien indizieren Unsicherheiten in der Steigung. Modifiziert nach Patapoutian *et al.* (2003).

1.3.1 Struktur und Expression des TRPA1-Proteins

Auf molekularer Ebene ist der TRPA1-Kanal mit spannungsgesteuerten Ionenkanälen verwandt (Gaudet 2008). Der aktivierte TRPA1-Kanal oligomerisiert und bildet ein Tetramer, wobei er auch Homo- und Heterotetramere mit anderen

thermosensitiven TRP-Kanäle bilden kann (Gaudet 2008; Bessac *et al.* 2008; Cvetkov *et al.* 2011; Nilius *et al.* 2012). Jedes Monomer besteht aus sechs Transmembrandomänen (die repetitorischen Helices S1-S6), wobei die Helices S5 und S6 die Basis der nicht selektiven Kationen-permeablen Poren bilden (Gaudet 2008; Cvetkov *et al.* 2011). Bei Aktivierung werden vorzugsweise die Kationen Ca^{2+} , Na^+ und zum Teil auch Mg^{2+} in die Zelle befördert (Nagata *et al.* 2005). Beide N- und C-Termini des Proteins sind zytosolisch lokalisiert. Diese zytosolischen Domänen sind durch ionische- und metabolische Komponenten in die Aktivierung des Kanals involviert (sog. *gating*). Der TRPA1-Kanal zeichnet sich durch eine hohe Anzahl an Ankyrin-Repeat-Domänen (ANK) am N-Terminus aus, insgesamt 14 bis 17 (Gaudet 2008; Bessac *et al.* 2008). Die ANKs bestehen aus 33 Aminosäuren, darunter Cystein, was eine anti-parallele *Helix-turn-Helix* Struktur formt, gefolgt von einem β -*hairpin Loop* (Abb. 2B, 3). Hier finden Protein-Protein-Interaktionen statt, wobei auch elektrophile Substanzen, endogene Entzündungsmediatoren und exogene chemische Substanzen eine kovalente Modifikation der Cystein-Reste in den ANKs verursachen können. Dies führt zur Sensibilisierung des Kanals (Hinman 2006; Macpherson 2007a; Gaudet 2008; Bessac *et al.* 2008; Nilius *et al.* 2011a, 2011b, 2012). Ein wichtiges Element liegt zwischen ANK11 und ANK12 und scheint für die Kalzium-Sensitivität (Ca^{2+}) des TRPA1-Kanals zuständig zu sein. Dort wurde eine EF-Hand-Domäne identifiziert. Diese beinhaltet geladene Aminosäuren, welche Ca^{2+} binden. Nach Bindung des Kalziums in der EF-Hand wird der TRPA1 durch Konformationsänderung aktiviert (Doerner *et al.* 2007; Zurborg *et al.* 2007; Bessac *et al.* 2008). Der ANK10 in humanem TRPA1 ist bekannt für seine Abweichung gegenüber den allgemeinen Ankyrin-Repeat-Domänen, wobei die genaue Funktion weiterhin ungeklärt ist (Story *et al.* 2003; Doerner *et al.* 2007; Gaudet 2008). Der konkave Teil des Kanals (Abb. 2B) wird durch die inneren Helices geformt und ist prädisponiert für die Interaktion mit verschiedenen Liganden (Gaudet 2008). Untersuchungen haben außerdem gezeigt, dass die ANKs auch in die mechanosensorische Funktion des TRPA1-Kanals involviert sind (Gaudet 2008).

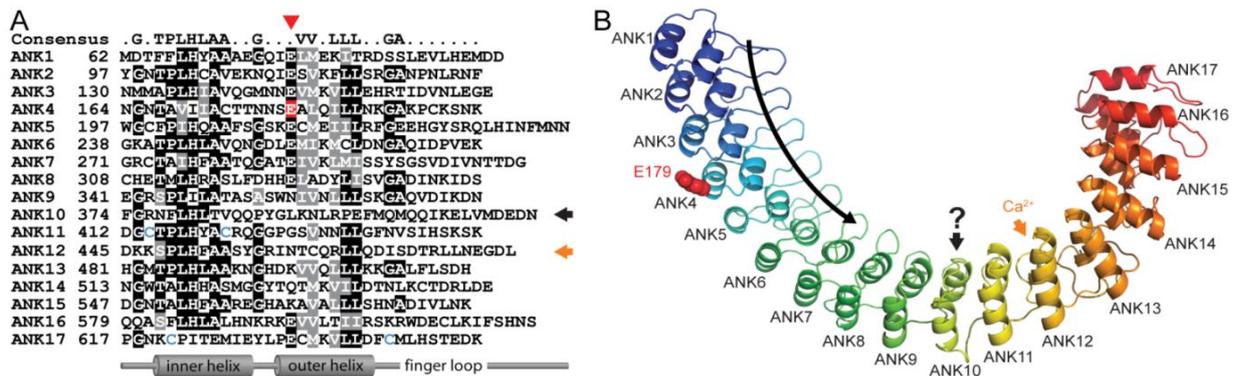


Abb. 2 Homologes Modell des Ankyrin-Repeats des humanen TRPA1-Kanals auf Basis des ankyrinR-Modells nach Michaley et al. (2002) **A** zeigt die Sequenz des Ankyrin-Repeats (ANK1-17) von AA 62 bis 649. E179 ist rot markiert. Glutamat scheint an dieser Position fixiert zu sein (roter Pfeilspitze). ANK10 (schwarzer Pfeil), ANK12 (oranger Pfeil) und Cystein (C, blau markiert) sind wichtig für die Interaktion zwischen TRPA1 und elektrophilen Substanzen. Ähnlichkeiten und Übereinstimmungen der TRPA1 und AnkyrinR sind jeweils grau und schwarz hinterfärbt. **B** zeigt das 3D-Modell (Markierungen wie in A). Der gebogene schwarze Pfeil repräsentiert die konkave Seite, an der Proteininteraktionen stattfinden. Die konvexe Seite ist der extrazellulären Matrix ausgesetzt. Die Grafik wurde von Frau Prof. Rachel Gaudet, Harvard University, Cambridge, Massachusetts, USA, erstellt.

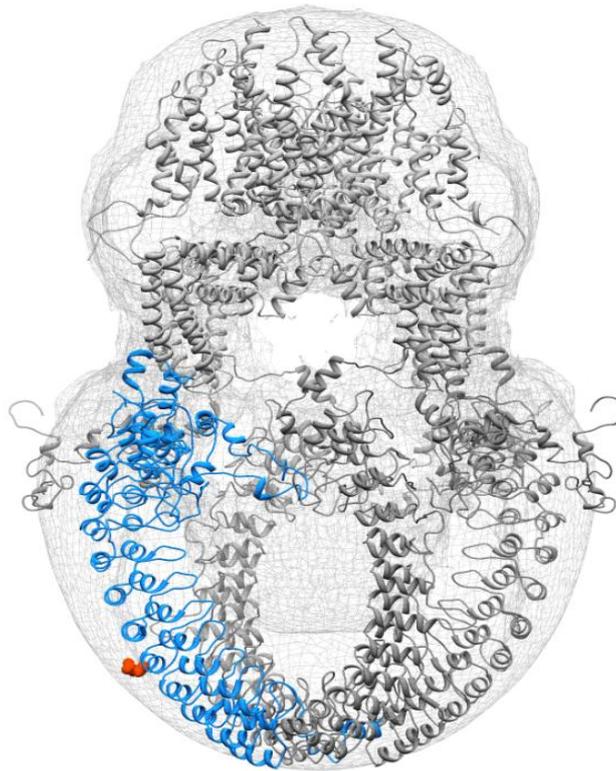


Abb. 3 Homologes 3D-Modell des TRPA1-Kanals der Maus, angepasst mit dem Monomer des humanen TRPA1-Kanals (blau markiert). Der Aminosäurerest 179 ist orange markiert. Die Abbildung wurde durch Ph. D. Vera Moiseenkova-Bell, Department of Pharmacology, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, USA, freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Modifiziert nach Cvetkov et al. (2011).

1.3.2 Lokalisation und somatosensorische Funktion

TRPA1 ist bisher in einer Subpopulation von humanen Nervenzellen im *Ganglion nodosum*, Spinalganglien und Trigeminalganglion nachgewiesen worden (Story et al. 2003; Jordt et al. 2004; Nilius et al. 2012). Neuere Untersuchungen belegen jedoch, dass der Kanal auch in anderen Geweben vorkommt. Hierzu gehört z. B. das zentrale Nervensystem, unter anderem in Koppelung mit dem cannabinoiden CB1-Rezeptor im Hippocampus und in Astrozyten und magnozellulären neurosekretorischen Zellen (Koch et al. 2011; Yokoyama et al. 2011; Nilius et al. 2012). Darüber hinaus wird der Kanal im inneren und äußeren Ohr von Mäusen und Ratten, dort vor allem in den Haar-Zellen und im Corti-Organ, exprimiert (Takumida et al. 2008; Stepanyan et al. 2011; Nilius et al. 2012). Weiterhin wurde der Kanal im

kardiovaskulären System von Mäusen und Ratten nachgewiesen, lokalisiert in Endothelzellen und perivaskulären Nervenzellen, die via Freisetzung der ‚*calcitonin-gene related peptides*‘ (CGRP) Vasodilatation hervorrufen (Early 2012; Nilius *et al.* 2012; Qian *et al.* 2013). In der Pankreas von Ratten ist der Kanal in Inselzellen nachgewiesen worden (Cao *et al.* 2012; Nilius *et al.* 2012). In Mukosazellen im Dün- und Dickdarm des gastrointestinalen Trakts sowie in enterochromaffinen Zellen beim Menschen und bei Ratten wurde das Vorkommen ebenfalls beschrieben (Kaji *et al.* 2011; Doihara *et al.* 2009; Nilius *et al.* 2012). Im humanen respiratorischen System findet man den Kanal in Keratinozyten. Dort verursacht er die Freisetzung von Chemokinen bei inflammatorischen Erkrankungen (Mukhopadhyay *et al.* 2011; Nilius *et al.* 2012). In der menschlichen Haut wurde er darüber hinaus in Keratinozyten sowie Melanozyten und Fibroblasten nachgewiesen. Dort ist die Freisetzung von Eikosanoiden und Zytokinen die Folge der Aktivierung (Atoyan *et al.* 2009; Jain *et al.* 2011; Nilius *et al.* 2012). Im humanen Zahn befindet sich der Kanal in Fibroblasten, deren Aktivierung dort mit Kältehypersensibilität verbunden wird (Edelmayer *et al.* 2011; Nilius *et al.* 2012). Des Weiteren ist der Kanal in neuronalen Stamm-Zellen von Mäusen nachgewiesen worden (Sviderskaya *et al.* 2009; Nilius *et al.* 2012). Die Tendenz lässt vermuten, dass TRPA1 zukünftig noch in weitere Gewebearten und Zellen in entdeckt werden wird.

TRPA1 wird durch eine breite Spanne von Chemikalien, unter anderem Zimtaldehyd (aus Zimt), Methylsalicylat (aus Wintergrünöl), Isohiocyanat (aus Senfölen, Wasabi, Meerrettich und Tränengas (Bandell *et al.* 2004)), Allicin und Diallyldisulfid (aus Knoblauch (Bautista *et al.* 2005)), Acrolein (aus Rauch (Bautista *et al.* 2006)) und Δ^9 -tetrahydrocannabinol (aus Marijuana (Jordt *et al.* 2004)) aktiviert. Zusätzlich hat Menthol (auch ein TRPM8-Agonist) eine Doppelwirkung auf TRPA1, indem es in kleineren Konzentrationen den Kanal aktiviert, aber in höheren Konzentrationen inhibiert (Macpherson *et al.* 2006; Karashima *et al.* 2007; Bianchi *et al.* 2012).

Endogene Mediatoren wie die Eikosanoide Prostaglandin J2, -E2 und Leukotrien B4, Bradykinin, Histamin und ‚*Nerve Growth Factor*‘ (NGF), die in Zusammenhang mit Verletzungen, Entzündungen, Allergien und oxidativem Stress freigesetzt werden, wurden ebenfalls als Aktivatoren des Kanals beschrieben (Macpherson *et al.* 2007b; Bianchi *et al.* 2012). Dieser Aktivierung erfolgt wahrscheinlich über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) (Abb. 4): Die weitere Signaltransduktion führt über

die anschließende Aktivierung der Phospholipase C (PLC), zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) in Inositoltriphosphat (IP₃), wodurch intrazelluläres Ca²⁺ aus dem endoplasmatischen Retikulum der Zelle freigesetzt wird. Intrazelluläres Ca²⁺ ist in der Lage, den Kanal direkt zu aktivieren. Eine indirekte Aktivierung erfolgt durch Phosphorylierung über Proteinkinase C (PKC). Die Aktivierung resultiert im Einströmen von Kationen (Na⁺, Ca²⁺), was die Depolarisation der Membran auslöst. Erhöhtes intrazelluläres Ca²⁺ setzt wiederum pro-inflammatorische Neuropeptiden wie Substanz P und ‚*Calcitonin-Gene Related Peptide*‘ (CGRP) frei (Clapham 2003; Bessac *et al.* 2008; Nilius *et al.* 2012). PIP₂ könnte den TRPA1-Kanal inhibieren (Akopian 2011), obwohl auch gezeigt wurde, dass PIP₂ ihn aktiviert (Karashima *et al.* 2008). Darüber hinaus ist eine Koexpression des TRPA1s mit dem wärmesensitiven TRPV1-Kanal in sensorischen Ganglien und vermutlich auch Zellen der Haut beobachtet worden. Hier wird die gegenseitige Interaktion durch sog. ‚*cross-regulation*‘, also gegenseitige Regulation und ggf. Aktivierung vermutet (Diogenes *et al.* 2007, Bessac *et al.* 2008; Akopian 2011; Nilius *et al.* 2012). Es konnte vor kurzem gezeigt werden, dass die zwei Kanäle bei Koexpression in Zellen *in vitro* eine hetero-tetramere Formation (TRPA1V1 genannt) bilden. Die genannte Publikation zeigt zudem, dass wenn TRPA1, TRPV1 und TRPA1V1 zusammen in Zellen exprimiert werden, dies eine Veränderung des Agonismus und Antagonismus des einzelnen Kanals gegenüber bekannten Chemikalien in den Zellen bewirkt (Sadofsky *et al.* 2014).

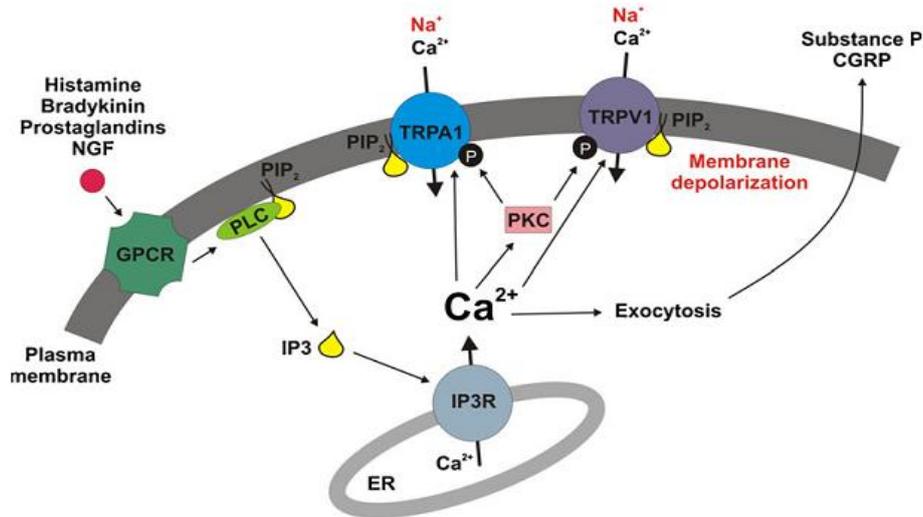


Abb. 4 Die Aktivierung des TRPA1-Kanals könnte über G-Protein gekoppelte Rezeptoren erfolgen, wobei Phospholipase C (PLC) aktiviert, Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat (PIP_2) in Inositoltriphosphat (IP_3) hydrolysiert und intrazelluläres Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum freigesetzt wird. Ca^{2+} aktiviert möglicherweise den Kanal direkt, indirekt wird er durch Phosphorylierung über Proteinkinase C (PKC) aktiviert: durch das Einströmen von Kationen (Na^+ , Ca^{2+}) depolarisiert die Zelle. Erhöhtes intrazelluläres Ca^{2+} setzt zusätzlich proinflammatorische Neuropeptiden wie Substanz P und ‚Calcitonin-Genes Related Peptide‘ (CGRP) frei. PIP_2 könnte zusätzlich TRPA1 und TRPV1 inhibieren oder ggf. aktivieren. Darüber hinaus werden eine Koexpression des TRPA1s mit TRPV1 und die gegenseitige Regulation vermutet. Abb. nach Nilius et al. (2012).

Bei der Aktivierung von TRPA1 kommt es zudem zu einer erhöhten Expression in der Plasmamembran der Zelle. Dies wird mit dem Vorhandensein von intrazellulären TRPA1-Vesikeln, die beim Kältereiz in die Zellmembran transloziert werden, erklärt (Schmidt et al. 2009).

Die Aktivierung des TRPA1-Kanals mit schmerzhafter Kälte ($<17\text{ °C}$) wird seit der ersten Beobachtung durch Story et al. in 2003 kontrovers diskutiert. Es ist mehrmals gelungen, diese Funktion des Kanals *in vitro* nachzuweisen, wobei ein eindeutiger Nachweis *in vivo* noch aussteht. Zwei Studien von Bautista et al. und Kwan et al. (beide 2006) untersuchten TRPA1-defizitäre Mäuse ($TRPA1^{-/-}$) und kamen zu gegensätzlichen Resultaten, indem Bautista et al. normale und Kwan et al.

herabgesetzte Reaktion auf Kälte bei den *Knock-out*-Mäusen zeigte. Die Diskrepanz dürfte im unterschiedlichen Verhalten, im unterschiedlichen Alter (die Expression von TRPA1 ist bei der Geburt der Mäuse niedrig und steigt danach während der ersten postnatalen Wochen stark an) und dem genetischen Hintergrund der *Knock-out*-Mäuse, sowie der Strategie zur Ausschaltung des TRPA1-Gens begründet sein (Karashima *et al.* 2009). Die Arbeit von Karashima *et al.* (2009) konnte jedoch belegen, dass TRPA1 sowohl für die akute als auch die verlängerte Detektion von schmerzhafter Kälte zuständig ist. Sie spielt somit definitiv eine wichtige Rolle in der Wahrnehmung von schmerzhafter Kälte *in vivo*. Obwohl es bei der Temperaturwahrnehmung des Kanals unterschiedliche Auffassungen gibt, ist man sich in den Studien einig, dass TRPA1^{-/-}-Mäuse eine verringerte Wahrnehmung von chemischen Reizen, z. B. gegenüber Senföl, haben.

Die Inhibition des Kanals kann mit A-967079 ((E)-1-(4-Fluorphenyl)-2-methylpent-1-en-3-onoxim), HC-030031 (2-(1,3-Dimethyl-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydropurin-7-yl)-N-(4-isopropyl-phenyl)-acetamid), AP18 ((E)-4-(4-Chlorphenyl)-3-methylbut-3-en-2-onoxim) oder Rutheniumrot erfolgen (Bianchi *et al.* 2012). Davon weist jedoch nur HC030031 die Eigenschaft eines TRPA1-selektiven Inhibitors auf (Bianchi *et al.* 2012). Nahezu jährlich werden neue Agonisten und Antagonisten entdeckt.

Es ist wichtig anzumerken, dass nicht alle Komponenten, die mit dem TRPA1-Kanal interagieren, denselben Effekt auf den humanen TRPA1-Kanal (hTRPA1) und den Nager/Rhesusaffe TRPA1-Kanal (mTRPA1/rTRPA1) haben. Eine neue Studie zeigt, dass Stoffe, die antagonistisch auf hTRPA1 wirken, einen agonistischen oder keinen Effekt auf den r/mTRPA1-Kanal haben und umgekehrt (Bianchi *et al.* 2012).

1.3.3 Polymorphismen im TRPA1-Gen und Rolle bei Schmerzerkrankungen

Das Gen für TRPA1 ist beim Menschen auf dem Chromosom 8q13 lokalisiert und wurde zum ersten Mal von Jaquemar *et al.* im Jahr 1999 beschrieben. Die erste nachgewiesene genetische Variante (engl. ‚*single nucleotide polymorphism*‘ (SNP)) im TRPA1-Gen war eine Transition von Adenin mit Guanin auf Exon 22 an Position 2564 (c.2564A>G) der TRPA1-DNA. Daraus folgt eine Substitution von Asparagin (N) durch Serin (S) (N855S) auf dem S4-Segment des Transmembranproteins. Dies wiederum verursacht einen Aktivitätsgewinn und ist demnach eine sog. *gain-of-*

function-Mutation: der Ca^{2+} -Influx des TRPA1-Kanals wird bei Aktivierung um das 5-fache erhöht (Kremeyer *et al.* 2010). Bei einer kolumbianischen Familie wurde diese Variante des zuvor unbekanntes ‚*familial Episodic Pain Syndrome*‘ (FEPS) nachgewiesen. FEPS wird autosomal dominant vererbt. Die Symptome werden ausgelöst durch Erschöpfung, Fasten und durch Kälte. Dieses verursacht über eine Prodromalphase extreme Schmerzen, vor allem in den oberen Körperregionen (Kremeyer *et al.* 2010). Es wurde gleichzeitig demonstriert, dass die Mutation im TRPA1 jedoch immer noch sensitiv gegenüber Inhibitoren von TRPA1 war, sodass diese möglicherweise in eine Therapie eingebunden werden könnten (Eid *et al.* 2008; Kremeyer *et al.* 2010).

Bei der Untersuchung von 371 Patienten mit neuropathischem Schmerz durch den Deutschen Forschungsverbund Neuropathischer Schmerz (DFNS) wurde 2011 eine genetische Variante des humanen TRPA1-Kanals identifiziert, die die Schmerzwahrnehmung beeinflusste (Binder *et al.* 2011). Der SNP 710G>A (rs920829) bedingte eine Glutamat- (E) zu Lysin- (K) Substitution an Position 179 (E179K) im N-terminalen ANK4-Segment. Bei Patienten mit neuropathischem Schmerz und sog. ‚*paradoxical heat sensation*‘ (PHS) trat 710A im Vergleich zu Kontrollpatienten 2,3 Mal seltener auf (Binder *et al.* 2011). PHS wird beschrieben als ein pathologisches brennendes Wärmegefühl bei Applikation von Kälte. Es ist eine Komponente verschiedener chronischer Schmerzerkrankungen. Eine Theorie zur Entstehung stellt die Hypothese auf, dass es durch Schädigung von A δ -Fasern, die Kälte leiten, zur Enthemmung von schmerz- und hitzeleitenden C-Fasern im peripheren Nervensystem kommt, was spinal PHS entstehen lässt. Eine andere Theorie beschreibt, dass Dysfunktion von Nervenzellen in dem *Thalamus* zu Disinhibition des zentral gesteuerten thermalen Signalübertragungswegs führen, was ebenfalls das schmerzhaftes Wärmegefühl erklären würde (Binder *et al.* 2011). Es wurde vermutet, dass die K179-TRPA1-Kanal-Variante eine gestörte Funktion im Vergleich zum Wildtyp, also dem häufiger vorkommenden TRPA1, hat, indem der Aminosäureaustausch mutmaßlich zu einer Konformationsänderung und somit zum Aktivitätsverlust (sog. ‚*loss-of-function*‘) führt. Dies würde im Zusammenhang mit PHS bedeuten, dass weniger Kältesignale übertragen werden und folglich, wie oben beschrieben, das physiologische Gleichgewicht zwischen Kälte- und Haltesignalen gestört und somit das schmerzhaftes Wärmegefühl verstärkt wird.

1.4 Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ermittelt werden, ob die TRPA1-E179K-Varianten in einem HEK 293T/17-Zell-*in-vitro*-Expressionssystem unterschiedliche Expression und/oder Funktion aufweisen. Die quantitative Expressionsmessung sollte auf mRNA-Ebene mittels rtPCR und auf Proteinebene mittels Westernblotting erfolgen. Die Funktionsprüfung sollte durch Kälte- bzw. Hitzereize bei 4 °C bzw. 49 °C mittels Kalziuminflux-Messungen erfolgen. Weiter sollte geklärt werden, ob der Transport vom Zytosol in die Plasmamembran (sog. ‚*trafficking*‘) durch die Variante beeinflusst wird.

2 Material und Methoden

Alle verwendete Standardchemikalien, soweit nicht anders aufgeführt, entstammen den Firmen PAA (Cölben), Carl Roth (Karlsruhe), Bio-Rad (München), Merck (Frankfurt) und Sigma-Aldrich (München). Zum Pipettieren wurden Pipetten samt autoklavierten Pipettenspitzen der Firma Eppendorf (Hamburg) benutzt. Alle Platten, Säulen und Behälter entstammen der Firma Sarstedt (Nümbrecht), soweit nicht anders aufgeführt.

2.1 Nukleinsäurekonzentrationsbestimmungen

Die Absorptionsmessungen zur Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration wurden teils mit einem Zweistrahl-Spektralphotometer (Biophotometer 6131, Eppendorf, Hamburg), teils vollautomatisch mit einem Monochromator (Infinite M200pro, Tecan, Crailsheim) durchgeführt. Nukleinsäuren (DNA und RNA) werden bei der Wellenlänge von 260 nm und Proteine bei 280 nm erfasst (Optische Dichte OD_{260} und OD_{280}). Um die Reinheit der Probe mit Nukleinsäuren zu bestimmen, sollte der Quotient zwischen Nukleinsäuren und Proteinen OD_{260}/OD_{280} bestimmte Grenzwerte nicht überschreiten, da sonst die lineare Abhängigkeit der Absorption bei 260 nm nicht gegeben ist. Eine optische Dichte von 1 entspricht 50 µg/ml DNA (doppelsträngig) und 40 µg/ml RNA (einzelnsträngig). Der OD_{260}/OD_{280} -Quotient bei Nukleinsäuren sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen (gemäß des Lambert-Beer'schen Gesetzes).

Das Aliquot der gereinigten Proteine oder Nukleinsäuren wurde in eine 10×10 mm Acrylküvette (Sarstedt, Nümbrecht) überführt und das Absorptionsspektrum gegen eine Referenzküvette gemessen. Die Küvetten besitzen keine Eigenabsorption der UV-Strahlung. Bei der Messung mittels Monochromator wurden die Proben auf eine Acryl 96-Well-Platte (Sarstedt, Nümbrecht) überführt und nach demselben Prinzip automatisch gemessen.

2.2 Klonieren des TRPA1-Vektors

Die kodierende Sequenz der humanen TRPA1-Varianten Wildtyp E179 (NM_007332.2) und Variante K179 (rs920829) wurden bei der Firma Geneart (Regensburg) synthetisiert. Die Klone wurden danach in einen Plasmidvektor umkloniert, um die Expression in den HEK 293T/17-Zellen zu ermöglichen.

2.2.1 Vektoren

Zur heterologen Expression von TRPA1-Proteinen in eukaryotischen HEK 239T/17-Zellen wurde die jeweilige DNA des TRPA1-Gens in den Expressionsvektor pcDNA3.1/V5-His-TOPO[®] (Invitrogen, Karlsruhe) eingebaut. Auf dem Vektor befindet sich ein β -Lactamase-Gen für eine Ampicillin-Resistenz. Durch Transformation von *E. coli* mit dem Vektor und anschließender Kultivierung in ampicillinhaltigem Nährmedium und ampicillinhaltigem Nährböden kommt es zur Selektion von Bakterienklonen, die den Vektor mit dem TRPA1-DNA (Abb. 5, ‚PCR-Product‘) exprimieren. Das V5-Epitop diente als Bindungspartner für später benutzte Antikörper im Rahmen der Western Blots und bei der Immunfluoreszenz.

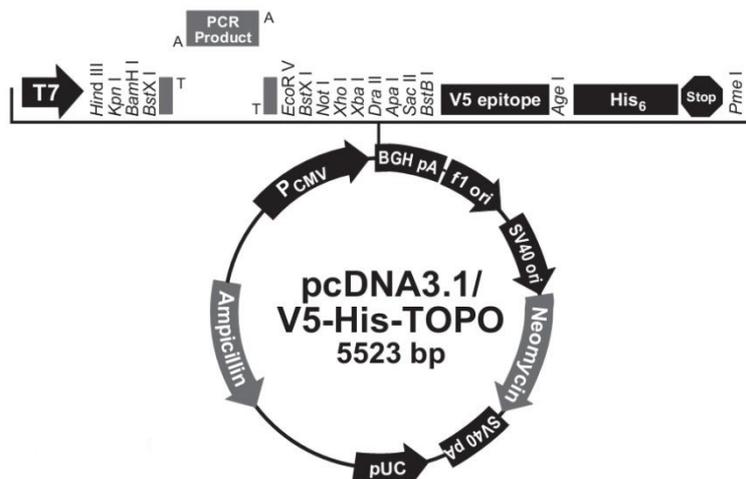


Abb. 5 pcDNA3.1/V5-His-TOPO-Vektor (©Invitrogen)

Zu Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde parallel der pEGFP-Vektor (Abb. 6, Zhang *et al.* 1996, Clontech, Heidelberg) genutzt. Das durch den Vektor exprimierte Reporterprotein EGFP wurde entweder quantitativ durch Fluoreszenz-Messungen bei 485-525 nm im Monochromator oder im Western Blot durch Anti-EGFP-Antikörper nachgewiesen.

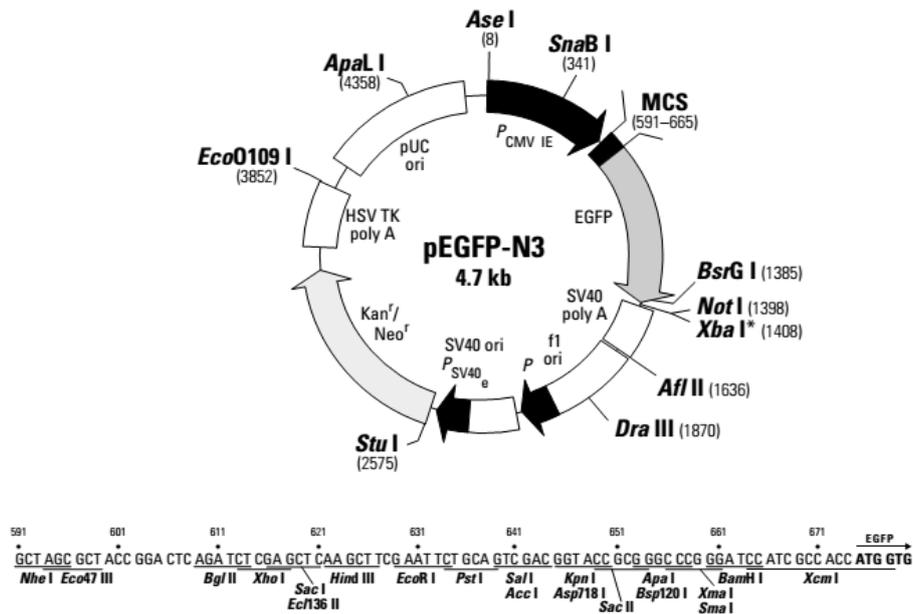


Abb. 6 pEGFP-N3-Vektor (©BD Biosciences Clontech)

2.2.2 Restriktion von DNA

Um zu kontrollieren, ob der pcDNA3.1/V5-His-TOPO[®]-Vektor mit dem TRPA1-Gen als DNA produziert wurde, wurden sog. Restriktionsendonukleasen eingesetzt. Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die an bestimmte Sequenzen von Nukleotiden der DNA andocken und die DNA anschließend zerschneiden (Smith *et Wilcox* 1970; Danna *et Nathans* 1971). Der Schnitt kann gerade sein: es entstehen zwei glatte Enden (sog. *blunt ends*), oder er kann versetzt sein: es entstehen zwei klebrige Enden (sog. *sticky ends*). *Sticky ends* sind leichter ligierbar als *blunt ends*, was man bei der Restriktion durch Hybridisierung mit z. B. einem Vektor ausnutzt. *In vivo* dienen Restriktionsendonukleasen vor allem Bakterien der Verteidigung gegen z. B. DNA, Viren und Bakteriophagen. Sie werden je nach Eigenschaften in die Typen I, II und III unterteilt (Roberts 1976; 2005).

Mit den Restriktionsenzymen *HindIII* (*Haemophilus influenzae*: erkennt 5'AAGCTT und 3'TTCGAA, produziert *sticky ends*) und *XhoI* (*Xanthomonas holcicola*: erkennt 5'CTCGAG und 3'GAGCTC, produziert *sticky ends*) (beide NEB, Frankfurt) wurde die DNA mit beiden TRPA1-Klonen bei Inkubation für 60 min bei 37 °C enzymatisch gespalten. Danach wurden die Banden für TRPA1 (3372 bp) und Vektor (5500 bp) mittels Gelelektrophorese auf 1 %igem Agarose-Gel dargestellt und anschließend mit den Resultaten der Spektrophotometrie verglichen. Korrekt klonierte Konstrukte wurden mithilfe einer Maxi-Präparation (QIAGEN Plasmid Maxi Kit, Qiagen, Hilden) vervielfältigt.

2.2.3 Agarose Gelelektrophorese

Bei der Agarose Gelelektrophorese werden PCR-Produkte der Größe nach im elektrischen Feld aufgetrennt und sichtbar gemacht um die Effizienz der PCR-Amplifikation nachzuweisen. Die zu analysierende DNA wandert je nach elektrischer Feldstärke der Nettoladung und dem Reibungskoeffizienten mit einer bestimmten Geschwindigkeit in Richtung der Elektrode (Tiselius 1937; 1958). Je nach Agarosekonzentration können verschiedene DNA-Größen exakt im Gel aufgetrennt werden. Zum Vergleich wird gleichzeitig ein Größenmarker mit bekannten DNA-Fragmenten auf das Gel aufgetragen. Mit Hilfe von nachfolgender Fototechnik und Ethidiumbromid wird das PCR-Produkt sichtbar gemacht. Dabei interkalieren einzelne Ethidiumbromid-Moleküle zwischen die Basen der DNA, was das Adsorptionsspektrum des Ethidiumbromid verändert. Bei ultravioletter Lichtbestrahlung (260-360 nm) fluoresziert die DNA in den Banden bei 590 nm (rot-orange), wobei das Gel, in dem sich keine DNA befindet, nicht fluoresziert. Die Lichtintensität ist hierbei proportional zu DNA-Konzentration und wird mit Hilfe einer sensitiven Kamera sichtbar gemacht und kann auf Fotopapier festgehalten werden.

Agarose (1 %) wurde in TBE-Puffer gelöst, 4 min bei 800 Watt in der Mikrowelle (800, Severin, Sundern) erhitzt, Ethidiumbromid (10 mg/ml, Invitrogen, Karlsruhe) zugesetzt und in eine Form gegossen (Bio-Rad, München). Im noch flüssigen Gel wurde ein Kamm platziert, um beim Erkalten Taschen für die Proben zu erzeugen. Als sich das Gel nach 20-30 min Wartezeit auspolymerisiert hatte, wurde es im Gelträger in eine Elektrophoresekammer (Bio-Rad, München) gelegt und mit

Ethidiumbromid-haltigem TBE-Puffer bedeckt. Die PCR-Proben wurden in die Taschen pipettiert, ebenso wie der zum Vergleich dienende Größenmarker (Bp-Ladder, Invitrogen, Karlsruhe) und die Kammer für 30 min an 120 V angeschlossen. Dem PCR-Produkt wurde Blue Juice (10 x, Invitrogen, Karlsruhe) zugefügt, um die Proben, die zuvor schon in die Geltaschen pipettiert worden waren zu erkennen. Mit einem Entwicklungsgerät (Image Station 440CF, Kodak, New York, USA) wurde danach ein Bild erzeugt, indem die Banden mithilfe von UV-Belichtung dargestellt wurden. Das Resultat wurde auf Fotopapier gedruckt.

2.2.4 Transformation von One-Shot[®] Top10 *E. coli* Bakterien

One-Shot[®] Top10 *E. coli* Bakterien (Invitrogen, Karlsruhe) eignen sich mit einer Transfektionseffizienz von 1×10^9 CFU/ μ g Plasmid DNA sehr gut zur Transformation. Der Vektor pcDNA3.1/V5-His-TOPO[®] mit den eingebrachten TRPA1-E179 und TRPA1-K179-Varianten wurde in gleichen Verhältnissen und leicht modifiziert nach der Methode von Brown *et al.* (1979) beschrieben, behandelt.

1 μ l von dem jeweiligen Vektor wurde in 10 μ l H₂O_{bidest} verdünnt (10 ng/ μ l), in 0,5 - 1 ml One-Shot[®]TOP10 *E. coli* hineinpipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Um die Bakterien empfindlich für die Aufnahme des Vektors zu machen, folgten 30 sec Hitzeschock im Wasserbad (GFL, Burgwedel) bei 42 °C und anschließend 2 min Inkubation auf Eis. Danach wurden 250 μ l auf 37 °C vorgewärmtes SOC-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) zugefügt und die Bakterien 30 min bei 37 °C und 200 rpm im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Im Anschluss wurden die Bakterien auf ampicillinhaltigem Nährböden in Petrischalen ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.5 DNA-Isolation mittels QIAGEN Plasmid Kit

Nach erfolgreicher Transformation der One-Shot[®] TOP10 *E. coli* Bakterien wurde am Folgetag zur Überprüfung des TRPA1-DNA-Gehalts 10 x 15 ml Falcon[™]-Röhrchen (BD Biosciences Clontech, Heidelberg) vorbereitet: Sie wurden jeweils mit 5 ml autoklaviertem LB-Medium (Autoclave Steam Sterilizer 3850 EL, Tuttnauer, Gießen) gefüllt und mit 50 μ l/ml Ampicillin (Gibco, Karlsruhe) versehen. Die Bakterien wurden

anschließend über Nacht bei 37 °C und 180 rpm im Thermoschüttler (Innova™ 4000 incubator shaker, New Brunswick Scientific, New Jersey, USA) inkubiert. Am folgenden Tag wurden im Hinblick auf spätere Nutzung jeweils 1 ml transformierter *E. coli*-Stamm für Glycerol-Konserven abgenommen, zentrifugiert und das Pellet in 100 %igen Glycerol aufgenommen. Die anschließende Konservierung erfolgte bei -80 °C. Die übrigen Bakterien wurden, nach dem Protokoll des Herstellers Qiagen, 5 min bei 4 °C und 6.000 rpm zentrifugiert (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg). Der Überstand wurde entsorgt und das Pellet in 0,3 ml P1-Puffer (ohne LyseBlue, vorher mit 100 µg/ml RNase A-Lösung versehen) gelöst und gevortext (Vortex Mixer, NeoLab, Heidelberg). Danach wurden 0,3 ml P2-Puffer hinzugefügt, das Falcon™-Röhrchen (BD Biosciences Clontech, Heidelberg) mehrmals invertiert und 5 min bei Raumtemperatur (15-20 °C) inkubiert. Um Proteine, Debris (Zellschrott) usw. zu präzipitieren, wurden 0,3 ml P3-Puffer (4 °C) hinzugefügt und 4-6 Male invertiert, bis das Lysat nicht mehr viskös war. Es folgte eine 5-minütige Inkubation auf Eis. Als Vorbereitung für die Filtration wurden Zentrifugations-Filter (Qiagen, Hilden) mit 1 ml QBT-Puffer equilibriert. Der Plasmid-DNA enthaltende Überstand wurde auf den Filter pipettiert und 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Filter, in dem sich die DNA befand, wurde anschließend zwei Mal mit 2 ml QF-Puffer gewaschen. Um die DNA zu eluieren, wurden dem Filter 0,8 ml QF-Puffer hinzugefügt und abschließend in 2 ml Mikrozentrifuge-Röhrchen gesammelt. Um die DNA zu präzipitieren, wurden 0,7 ml Isopropanol zu der eluierten DNA hinzugefügt und für 30 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und entsorgt; das DNA-Pellet wurde in 70 %igem Ethanol gewaschen und 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Das Ethanol wurde vorsichtig abgesaugt, das Pellet 5-10 min luftgetrocknet und anschließend in H₂O_{bidest} wieder gelöst. Die DNA-Konzentration wurde fotometrisch bei 260 nm gemessen. Für die Herstellung größerer DNA-Mengen für weitere Versuche wurden QIAGEN Plasmid Maxi Kits eingesetzt.

2.3 Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellen erfolgten unter sterilen Verhältnissen im Hera Safe® (Thermo Scientific, Langenbold). Die Zellen wurden in den Inkubator Hera Cell® (Haereus, Hanau) inkubiert. Zum Pipettieren wurden Pipetten samt sterilen Pipettenspitzen von der Firma Eppendorf (Hamburg) und Pipetboy acu® (Integra Biosciences, Fernwald)

benutzt. Alle Platten, Säulen und Behälter entstammen der Firma Sarstedt (Nümbrecht), soweit nicht anders aufgeführt. Zum Zentrifugieren wurde eine Centrifuge 5810 (Eppendorf, Hamburg) benutzt.

2.3.1 Zelllinie

Für alle anschließenden Versuche im humanen Zellsystem wurde der HEK 293 Subklon T17 (*human embryonal kidney cells*) gewählt, da diese Zellen nativ kein TRPA1 exprimieren (Shaw *et al.* 2002, Thomas *et al.* 2005) und der Subklon T/17 eine besonders hohe Transfektionseffizienz aufweist (Pear *et al.* 1993). Darüber hinaus verhalten die Zellen sich ähnlich wie neuronale Zellen, indem sie nativ unter anderem neuronale Proteine wie Rezeptoren für GABA_A-, GABA_B- (γ -Aminobuttersäure) sowie nACh- (nikotinerge Acetylcholinrezeptoren), mACh- (muskerinerge Acetylcholinrezeptoren) und D₂-Rezeptoren (Doperminrezeptor) exprimieren (Shaw *et al.* 2002; Thomas *et al.* 2005). Man findet bei der Zelle auch ‚*neurite-outgrowth*‘-Ausstülpungen und Haar-ähnlichen Filopodien (Thomas *et al.* 2005, Abb. 15 und 16). Weitere Beweise für den neuronalen Ursprung lieferten Experimente durch Madhusudana *et al.* (2010), indem sich die Zelllinie genauso gut wie neuronalen Zellen zum Schnelldiagnose des neurotrophen Rabies-Virus (Erreger der Tollwut) eignete. Der neuronale Ursprung der Zellen wurde berücksichtigt, da der TRPA1-Kanal vor allem in Nervengewebe exprimiert wird (siehe Einleitung). Die Zellen sind zudem bei 37 °C adhäsiv, was das Arbeiten in der Zellkultur deutlich erleichtert (Thomas *et al.* 2005). Berjukow *et al.* zeigten 1996 außerdem, dass die Zelllinie sich gut sowohl für biochemische als auch funktionelle Experimente mit Ionen-Kanälen eignet.

Die HEK 293-Zellen wurden erstmals 1969 von van der Eb und später 1977 von Graham *et al.* beschrieben. Hier wurden humane Nierenzellen vom gesunden humanen Fötus mit Fragmenten des Adenovirus-5-DNA (Ad5) transformiert. Nach der Transformation wurde das Fragment permanent auf Chromosom 19 der Zelle eingebaut (Louis *et al.* 1997). Dies führt zu ‚*hijacking*‘ der Protein-Translations-Maschinerie und erleichtert die Transfektion der Zellen mit Ad5-kompatiblen pcDNA bzw. Plasmiden (Louis *et al.* 1997; Thomas *et al.* 2005). Der Subklon HEK 293T/17 exprimiert das große Simian Virus 40 T-Antigen (SV40) auf Chromosom 17, was die

Transfektion mit Vektoren vom SV40-Typ (wie z. B. den pcDNA3.1/V5-His-TOPO[®]-Plasmidvektor) begünstigt (Pear *et al.* 1993).

Die HEK 293T/17-Zellen (ATCC[®] CRL-11268[™], Manassas, USA) wurden gemäß Herstellervorschriften im Inkubator in Kulturen bei 37 °C und 5 % CO₂ und mit DMEM mit hohem Glukosegehalt und 10 % FCS gehalten. Das DMEM wurde alle 24 h gewechselt. Die Zellen wurden solange inkubiert, bis eine Konfluenz-Rate von ~70 % erreicht war, wonach sie dann passagiert, eingefroren oder für Versuche eingesetzt wurden. Für sämtliche Analysen wurden Zellen mit niedrigen Passagen (1-8) genutzt, um die optimale Transfektionseffizienz zu gewährleisten.

2.3.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Für das Einfriermedium wurden DMSO, FCS und DMEM in einem Falcon[™]-Röhrchen (BD Biosciences Clontech, Heidelberg) vorbereitet. Eine Zellkulturflasche mit >70 %iger Zelldichte wurde mit vorgewärmtem 1 x PBS (37 °C) gespült und mit 5 ml Accutase[®] durch 5 min Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) vom Flaschenboden gelöst. Die Zellen wurden in ein mit 5 ml DMEM gefülltes Falcon[™]-Röhrchen pipettiert und 5 min bei 1.200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 ml Einfriermedium aufgenommen. Kryotubes mit jeweils 1 ml der Zellsuspension wurden zügig bei -80 °C eingefroren.

Zum Auftauen für weitere Verwendung wurde 1 ml der eingefrorenen Zellen in 10 ml DMEM resuspendiert und 5 min bei 1.200 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem DMEM resuspendiert und in 3-4 70cm²-Flaschen (vorgefüllt mit jeweils 15 ml DMEM + 10 % FCS) verteilt und weiter inkubiert.

2.3.3 Passagieren von Zellen

Alle 24 h wurde die Dichte und Konfluenz der Zellen unter einem Lichtmikroskop kontrolliert. Solange die Konfluenz bei <70 % lag, wurden die Zellen mit 37 °C 1 x PBS gewaschen und das Medium erneuert. Nach ca. 72 h hatten sie eine Konfluenz von >80 %, was ~2,6 x 10⁶ Zellen /ml entspricht. Die Zellen wurden wie bereits beschrieben vom Boden der Flasche gelöst und zentrifugiert. Das Zellpellet

wurde in 10 ml DMEM resuspendiert. Zum Zählen wurden 50 µl Zellsuspension in 450 µl frischem DMEM verdünnt und 30 µl davon auf eine Zählplatte (Hofer Kammer; 0,2 mm, 0,0625 mm², LO Laboroptik, Friedrichsdorf) aufgetragen. Unter einem Lichtmikroskop (Olympus 8K2, Tokio, Japan) wurden die Zellen zwei Mal gezählt und ein Mittelwert x ermittelt. Dieser wurde in die Formel $\frac{x * 5}{8} * 10^4$ eingesetzt und so die Gesamtzellzahl errechnet. Für das Passagieren (Splitten) der Zellen wurden 500 µl der Zellsuspension in 15 ml DMEM pipettiert und 72 h bei 37 °C mit 5 % CO₂ inkubiert.

2.3.4 Transiente Transfektion der Zellen mit TRPA1-DNA

Um DNA in eine eukaryotischer Zelle einzubringen braucht man einen Transporter (sog. ‚carrier‘). Dieser muss imstande sein, durch eine Zellmembran mit angehängter DNA zu wandern. Eine Methode, um DNA in die adhäsiven HEK 293T/17-Zellen einzubringen, ist Lipofectamine™ 2000. Lipofectamine™ 2000 ist ein polykationisches Liposom, das keinen Einfluss auf den Kalziumhaushalt der Zelle ausübt. Liposome sind kleine Transporter, die z. B. DNA (aber auch verschiedene Arzneimittel) aufnehmen und via Endozytose von Zellen aufgenommen werden. Lipofectamine™ 2000 ist nur für ca. 6 h stabil, danach löst sich das Liposom auf und die DNA wird freigesetzt. Es ist äußerst wichtig, dass das zur Verdünnung eingesetzte Medium kein Serum enthält, denn Bestandteile im Serum, wie Proteoglykane und Proteine, konkurrieren mit der DNA um die Bindung an die kationische Lipide und reduzieren so die Effizienz der Transfektion (Ciccarone *et al.* 1995; Shih *et al.* 1997; Ciccarone *et al.* 1999).

24 h vor der Transfektion wurden 2 ml Zellen/Well in eine Konfluenz von 5×10^5 Zellen/ml in DMEM auf 6-Well-Platten ausgesät und 24 h im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am Tag der Transfektion wurde das Kulturmedium mit 1,5 ml FCS-freiem DMEM ersetzt. 4 µg DNA und 10 µl Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, Karlsruhe) wurden getrennt in jeweils 250 µl FCS-freiem DMEM aufgenommen und nach Inkubation für 5 min bei RT zusammengemischt (Endvolumen 500 µl) und anschließend 20 min bei RT inkubiert, um Lipofectamin-DNA-Komplexe zu erhalten. 500 µl/Well der Transfektionslösung wurden zu den Zellen pipettiert und diese 4-6 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurde die Lösung mit 2 ml/Well frischem

DMEM ausgetauscht und für 24 h inkubiert. Hiernach erfolgte die thermale Stimulation.

2.4 Proteinanalyse

2.4.1 Proteinisolierung

Die HEK 293T/17-Zellen exprimierten primär TRPA1 in der Zeitspanne zwischen 18 und 22 h nach der Transfektion (siehe Ergebnis- und Diskussions-Teil). Um die Expression von TRPA1 zu visualisieren wurden verschiedene Methoden angewandt. Hierbei war es von großer Bedeutung, die Proteine in ausreichender Menge von den Zellen zu isolieren. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford- oder BCA-Assay fotometrisch bestimmt. Hierfür sind die genaue Optimierung des Lyse-Prozesses, die konkreten Pufferbedingungen, die Detergenzien und deren Konzentrationen, die Salz-Konzentration und unterstützende Prozeduren wie Ultraschall oder die ‚freeze-thaw‘-Methode von großer Bedeutung. Für alle hier dargestellten Analysen wurde der Mammalian Lysis-Puffer (Qiagen, Hilden) in Kombination mit Ultraschallbad (Sonorex RK 510, Bandelin GmbH, Berlin) und drei Zyklen von ‚freeze-thaw‘ in flüssigem N₂ genutzt. Die TRPA1-exprimierenden Zellen wurden wie zuvor beschrieben mit 1 x PBS gewaschen und von der Oberfläche des Wells gelöst. Nach Zentrifugation wurde der Zellpellet in Lysis-Puffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zerstörung der Zellmembran wurde durch 1 min Inkubation in Ultraschall-Bad und wiederholtes Einfrieren mit N₂ erreicht. Nach dieser Behandlung wurden die Proben zentrifugiert (Centrifuge 5418), das Pellet mit Zellbestandteilen isoliert und der Überstand mit Proteinen entweder bei -20 °C eingefroren oder sofort weiter verarbeitet.

2.4.1.1 Proteinnachweis mittels Bradford-Assay

Das Bradford Assay dient zur Protein-Konzentrationsbestimmung. Es basiert auf direkter Bindung von Coomassie brilliant blue G-250-Farbe (CBBG) mit Proteinen, proportional zum Inhalt von Proteinen mit den Resten der Aminosäuren Arginin, Tryptophan, Tyrosin, Histidin und Phenylalanin, nicht aber freien Aminosäuren

(Bradford 1976). Bei der Bindung entsteht eine Umwandlung in der Absorption bei einer Wellenlänge von 465 nm zu einem Peak von 595 nm. Diese Umwandlung wird mit Hilfe von Spektrophotometrie nachgewiesen.

Um die lineare Regression zu berechnen, braucht man eine Standardreihe mit bekannter Proteinkonzentration (Albumin) und eine entsprechende optische Dichte (OD). Die Standardreihe hatte demnach eine Protein-Konzentration von 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 12µg/ml, 62,5 µg/ml, 31,25 µg/ml und 0µg/ml. Die Proben für die Proteinbestimmung wurden vor der Messung 1:10 mit H₂O_{bidest} verdünnt. Danach wurden 20µl von jedem Standard in 1000µl Bradford-Lösung (Bio-Rad, München, 1:4 unter Lichtschutz verdünnt) hineinpipettiert. Die Mischungen wurden 5 min gevortext und bei Raumtemperatur (15-25 °C) 20 min inkubiert, um nachfolgend im Photometer bei OD₅₉₅ gemessen zu werden. Die einzelnen Werte wurden in ein Excel-Dokument (Microsoft Office Professional™) eingetragen. Anhand der linearen Regression konnte die genaue Konzentration der Zell-Lysate bestimmt werden.

2.4.1.2 Proteinnachweis mittels BCA Protein Assay

Bicinchoninic Acid Assay, kurz BCA-Assay, ist eine Methode zum Nachweis von Proteinen (Smith *et al.* 1985). Sie wurde erst als eine Verbesserung der Lowry-Methode (Lowry *et al.* 1951) beschrieben, später stellte sich aber heraus, dass es sich um zwei verschiedene Methoden handelt (Wiechelman *et al.* 1988). Der erste Schritt ist die sog. Biuret-Reaktion, bei der Cu²⁺ zu Cu⁺ reduziert wird. Die Menge von reduziertem Cu²⁺ ist proportional zum Proteingehalt der Lösung. Da die Reaktion sehr unspezifisch ist, fügt man BCA hinzu, was mit den Cu⁺-Ionen Chelate bildet und dabei die Lösung violett färbt. Diese Farbe hat einen Peak bei einer Wellenlänge von 562 nm, ist fast linear proportional zum Proteininhalt und kann in einem Spektrophotometer nachgewiesen werden. Um die Spezifität der Probe zu verbessern, empfiehlt es sich, die Reaktionen bei 60 °C zu messen, da die Adsorption bei dieser Temperatur konstant bleibt. Arbeitet man bei Raumtemperatur (15-25 °C) oder 37 °C, verstärkt sich der Adsorption mit 2,5 % pro 10 min (Smith *et al.* 1985).

Der BSA-Standardreihe (Stammlösung 2 mg/ml, Thermo Scientific Pierce, Rockford, USA) wurde zum Kalibrieren in folgenden Verdünnungen hergestellt: 1000 µg/ml,

500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,5 µg/ml und 31,25 µg/ml. Das gesuchte Protein wurde 1:10 in H₂O_{bidest} verdünnt. Danach wurde die BCA-workingsolution (Thermo Scientific Pierce, Rockford, USA) mit einer Konzentration von 50:1 vorbereitet und mit 200 µl/Well auf der Platte verteilt. Vor der Messung wurden die Proteine für 30 sec gevortext und 30-60 min bei 60 °C inkubiert (Thermomixer, Eppendorf, Hamburg). Danach wurde die Adsorption bei einer Wellenlänge von 562 nm (OD₅₆₂) mit einem Referenzwert von 650 nm (OD₆₅₀) im Monochromator gemessen und verglichen.

2.4.2 Aceton Präzipitation

Da Lösungen mit Proteinen häufig Substanzen beinhalten, die mit den weiteren Nachbehandlungsprozessen interferieren könnten, müssen diese eliminiert werden. Es gibt viele verschiedene Methoden, um diese Faktoren zu beseitigen, je nachdem, was für Substanzen ausfiltriert werden soll. Eine Methode ist, die Proteine mittels Aceton zu präzipitieren (auszufällen) (Jiang *et al.* 2004). Weil Proteine in Aceton, besonders bei niedrigen Temperaturen, unlöslich sind und sich viele kleine Moleküle, die sich z. B. in den Purifikations-Puffern der Vorbehandlung befinden, damit leicht auflösen lassen, isoliert man die Proteine mit Hilfe von Zentrifugation. Das dadurch entstandene Protein-Pellet wird wieder in einen Puffer, der mit der Nachbehandlung kompatibel ist, aufgelöst.

Die Proteine wurden gevortext und in 5-fachem Volumen an kaltem, 100 %igem Aceton gefällt. Im Anschluss wurden die Proben 20 min bei -20 °C gelagert. Die präzipitierten Proteine wurden 10 min bei 4 °C und 13.200 rpm zentrifugiert (Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg). Die restlichen Protein-Pellets wurden in 15 µl Laemmli-Puffer resuspendiert, 10 min bei 80 °C gekocht (Thermomixer, Eppendorf, Hamburg), danach kurz zentrifugiert und zum Lagern bei -20 °C eingefroren. Dieser Schritt erfolgte als Vorbereitung für die SDS-PAGE.

2.4.3 SDS-PAGE

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese, kurz SDS-PAGE ist eine Technik zur Auftrennung von Proteinen nach deren Größe im elektrischen Feld

(Maizel 1966; Shapiro *et al.* 1967; Weber *et al.* 1969; Laemmli 1970). Als Trennmedium wird entweder ein kontinuierliches oder diskontinuierliches Polyacrylamidgel eingesetzt (Laemmli 1970). Die Diskontinuität beruht auf Unterschieden im pH der Puffer und bewirkt, dass die Proteine besser aufgetrennt dargestellt werden können. SDS ist eine ionische Detergenz, welche die Ladung der Proteine im anionischen Bereich verändert. Dies führt zu gegenseitiger Abstoßung der negativ geladenen Proteine sowie einer gleichmäßigen Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine während der Elektrophorese. Durch die Denaturierung bei 80 °C und dem Zerstören von Disulfid-Brücken mittels β -Mercaptoethanol wird bei der Elektrophorese eine geordnete Auftrennung nach der Kettenlänge proportional zu Molekülgröße erreicht, wobei nur Primärstrukturen erhalten bleiben. Das Polyacrylamidgel dient bei Anlage von elektrischer Spannung als Sieb, wobei kleinere Proteine schneller wandern als größere. Nach abgeschlossener Elektrophorese können die Proteinbanden im Gel mit einem Proteinstandard bekannter Größe verglichen werden.

In allen Versuchen wurde ein diskontinuierlicher SDS-PAGE verwendet, wobei das Polyacrylamidgel einen Gradienten von 4-20 % aufwies (Nupage[®] Bis-Tris Gradient, Invitrogen, Karlsruhe). 8 μ l des Standards (Fermentas SM1841, Thermo Scientific Pierce, Rockford, USA) und 15 μ l der Proben wurden in die Geltaschen (Invitrogen, Karlsruhe) pipettiert. Leere Geltaschen wurden mit Laemmli-Puffer (Bio-Rad, München) gefüllt, um ein kontinuierliches Elektrophoreseergebnis zu gewährleisten. Die Kammer wurde mit gekühltem MOPS-Lauf-Puffer (20 x, Invitrogen, Karlsruhe) aufgefüllt und ca. 90 min bei 140 V belassen. Nachfolgend wurde das Gel für Western Blot benutzt.

2.4.4 Western Blot

Dieses Verfahren wurde eingesetzt, um das von HEK 293T/17-Zellen produzierte TRPA1-Protein nachzuweisen. Western Blot, auch Immunoblot genannt, ist eine Methode zum Nachweis von Proteinen. Beim Western Blot wird nach z. B. SDS-elektrophoretischen Auftrennung der einzelnen Proteine ein Wet-Blotting-Transfer (Tankblot) durchgeführt. Hierbei werden die Proteine unter Einsatz einer konstanten Spannung von 100 V auf z. B. eine PVDF-Membran übertragen (engl. *blotting*;

Towbin *et al.* 1979; Burnette *et al.* 1981; Pluskal *et al.* 1986). Somit werden die Proteine für immunologische Nachweisverfahren zugänglich. Dabei binden sich monoklonale Primärantikörper an das Protein und bilden Antikörper-Antigen-Komplexe. Um die Protein-Ak-Komplexe zu detektieren, wird ein Sekundär-Ak, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (HRP), eingesetzt. In Anwesenheit von HRP entsteht durch das Substrat ECL Chemolumineszenz, das die Proteinbanden auf fotosensitivem Film gut visualisiert. Als Ladekontrolle werden Anti- β -Aktin-Antikörper eingesetzt. β -Aktin kommt ubiquitär in eukaryotischen Zellen vor und zeigt die homogene Anwesenheit von Protein in jeder Probe. Hiermit ist es möglich, im Vergleich die Menge der gesuchten Probe zu quantifizieren. In allen durchgeführten Versuchen wurde kein Pharmakon eingesetzt, um Modifikationen des β -Aktins in den Zellen zu vermeiden, wie bereits 2006 von Dittmer *et al.* beschrieben.

Der PVDF-Membran (Merck-Millipore, Darmstadt) wurde vor dem Einsatz in Methanol äquilibriert, in H_2O_{bidest} gewaschen und anschließend in PVDF-Puffer (Merck-Millipore, Darmstadt) inkubiert. Es wurde bei dem Aufbau des Blots darauf geachtet, dass keine Luftblasen zwischen Membran und Gel vorhanden sind. Der Tankblot benötigt kalten PVDF-Puffer und konstante Spannung (100 V), um die Proteine vollständig vom Gel auf die Membran zu übertragen. Nach dem Übertragen der Proteine auf die PVDF-Membran, wurde die Membran mindestens 1 h blockiert (5 % Milch in TBS-T-Puffer), um freie Bindungsstellen der PDVF-Membran, die zu falsch-positiven Banden führen könnten, zu besetzen. Als primärer Antikörper wurde Mouse-Anti-V5-Antikörper (1:500, AlexaFluor™, Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe) und als Kontrolle Mouse-Anti-Human- β -Aktin (1:7.000, Sigma-Aldrich, München) benutzt, die bei 4 °C über Nacht auf einem Schüttler (Polymax 2040 Shaker, Heidolph, Schwabach) mit der Membran inkubierten. Die Membran wurde 3 x 10 min mit 1 x TBS-T-Puffer gewaschen. Der sekundäre Goat-Anti-Mouse-Antikörper (1:1.000; Sigma-Aldrich, München) wurde in 5 % Milch-TBS-T-Puffer verdünnt und 1 h unter Schütteln bei RT inkubiert. Anschließend wurde sie 3 x 10 min mit TBS-T gewaschen. Zur Entwicklung des Films (CEA, Hamburg) wurde ECL-Substrat (GE Healthcare, Buckinghamshire, U.K.) auf die Membran aufgetragen. In einer Entwicklungs-Kassette (Rego X-Ray GmbH, Augsburg) wurden nach beendeter ECL-Inkubation die Filme für 15 sec, 30 sec, 1 min, 2 min und 5 min auf die PVDF-Membran gelegt. Mittels des Entwicklungsgeräts (Curix 60, AGFA, Greenville, USA) wurden die Banden abschließend auf dem Film sichtbar gemacht. Dargestellt wurde

immer das TRPA1-Kanal-Protein (ca. 130 kDa), β -Aktin (als Kontrolle der identischen Proteinbeladung, ca. 40 kDa groß) und das EGFP-Protein (als Kontrolle der Transfektions-Effizienz, ca. 40 kDa groß).

2.4.5 Biotinylierungsassay

Diese Methode wurde benutzt, um TRPA1-Protein-Einbau in die Zelloberfläche nachzuweisen. Avidine (Streptavidin, NeutrAvidin und CaptAvidin) sind kleine Proteine, die sich mit hoher Affinität an Biotin (Vitamin H) binden können. Konjugiert man vorher Streptavidin bzw. Avidin mit HRP, kann es bei Zugabe von Luminol in der nachfolgenden Western Blot Analyse nachgewiesen werden (Becker *et* Wilchek 1971). In den dargestellten Versuchen wurde das humane Oberflächenprotein TRPA1 mit EZ Link[®] Sulfo-NHS-SS-Biotin, was die Plasmamembran der Zellen nicht überwinden kann, markiert (Abb. 7). Nach Lyse der Zellen kann die folgende Bindung des Biotins an NeutrAvidin[™] Agarose Kunstharz mittels SDS-PAGE und nachfolgender Western Blot isoliert und nachgewiesen werden.

Zwei 6-Well-Platten mit >70 % konfluierenden ($\sim 2 \times 10^5$ Zellen/Well), zuvor mit TRPA1 transfizierten HEK 293T/17-Zellen wurden über Nacht in DMEM inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen wie in den vorausgegangenen Versuchen thermisch über 10 min stimuliert, um eine Translokation von TRPA1-Protein in die Zellmembran analysieren zu können. Gemäß dem Protokoll von Thermo Scientific wurde 2 ml Sulfo-NHS-SS-Biotin-Reagenz (Thermo Scientific Pierce, Rockford, USA) in 48 ml 4 °C kaltem PBS verdünnt, nach 10 min wurden je 2 ml/Well zu den Zellen pipettiert und 30 min inkubiert. Für die Zellyse wurden 100 μ l Quenching-Puffer/Well (Thermo Scientific Pierce, Rockford, USA) zugefügt, die Zellen mit 1 ml/Well kaltem TBS gewaschen und in Falcon[™]-Röhrchen überführt. Nach 3 min bei 4 °C und 500 rpm Zentrifugation wurden die Pellets in neue Eppis pipettiert und zwei Mal mit kaltem TBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Pellets in 500 μ l Lysis-Puffer (Qiagen, Hilden) resuspendiert und für die Protein-Lyse wie bereits beschrieben genutzt. Von insgesamt 500 μ l Proteinsuspension wurden 100 μ l für Proteinkonzentrations-Bestimmung mittels Bradford-Assay abgenommen und die restlichen 400 μ l für die Avidin-Aufreinigung bei -20 °C aufbewahrt. Für jede Probe wurde ein Eppi mit 100 μ l Avidin-Sepharose-Beads (Thermo Scientific Pierce,

Rockford, USA) vorbereitet. Diesen wurden mit 500 µl Washing-Puffer zugeführt und für 3 min bei 1.500 rpm zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Lysat zu den Beads pipettiert und 1 h bei RT in einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Im Anschluss wurde es wieder für 3 min bei 1.500 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Beads folgend drei Mal mit Washing-Puffer gewaschen. Anschließend wurde 40-50 µl Laemmli Puffer (Bio-Rad, München) zu den Proben pipettiert und für 5 min bei 95 °C gekocht. Die Zentrifugation der Proben für 5 min bei 5.000 rpm ergab den proteinhaltigen Überstand, der für weitere Western Blot Analysen bei -20 °C aufbewahrt wurde.

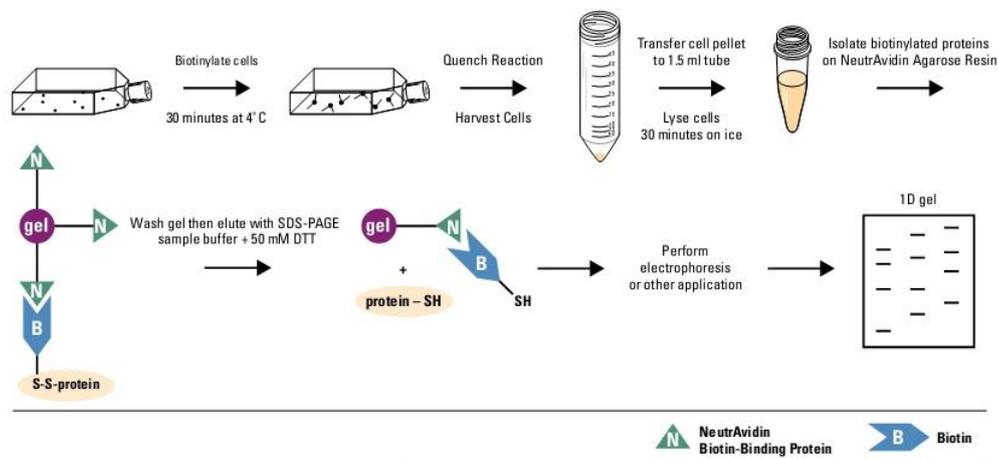


Abb. 7 Biotinylierungsassay (©Thermo Fisher Scientific Inc.)

2.5 Relative mRNA Quantifizierung

Die quantitative mRNA Analyse erfolgte, um die Expression von dem TRPA1 in den HEK 293T/17-Zellen vor und nach thermaler Behandlung zu bestimmen. Hierbei wurde der Wildtyp E179 mit der K179-Variante verglichen. Die mRNA wurde erst aus den Zellen isoliert, dann in cDNA umgeschrieben, um sie danach mittels Real-Time Reverse Transkriptions-PCR zu amplifizieren und zu analysieren.

2.5.1 RNA Isolation

Die gesamte mRNA wurde mittels RNeasy™ Mini Kit (Qiagen, Hilden) isoliert. Das genutzte Protokoll basiert auf der von Chomczynski *et Sacchi* (1987) entwickelten Methode. Aus der Zell-Probe wird die mRNA in mehreren Schritten isoliert, in einer Membran aus Silikatgel gebunden und nach anschließender Reinigung und Resuspendierung mittels Spektrophotometrie bei 260 nm die RNA-Konzentration ermittelt.

Vorbereitend wurden die Zellen gezählt und geteilt, sodass nicht mehr als $\sim 1 \times 10^5$ Zellen/Well in der Zellschicht vorhanden waren. Das Zellmedium wurde abgesaugt und die Zellen drei Mal mit 1 x PBS gereinigt. 30 ml RLT-Puffer wurden mit 300 µl 14,3 M β-Merkaptoethanol (1:10.000) in einem Falcon™-Röhrchen bei 4 °C gemischt und 600 µl/Probe zu den Zellen pipettiert, um sie zu lysieren. Danach wurden die Proben in QIAshredder™ spin columns pipettiert und bei 10.000 rpm zentrifugiert, um sie zu homogenisieren. 600 µl 70 % Ethanol wurden zugefügt und mit dem Lysat gemischt. Der Rest des Lysats wurde in RNeasy™ mini spin Säulen mit passenden Auffangssäulen überführt und 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert (Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg), wobei der Durchfluss entsorgt wurde. In dieselben Auffangssäulen wurden 700 µl RW1-Puffer pipettiert und es wurde noch mal 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die aufgefangene Lösung wurde ebenfalls entsorgt. Nachfolgend wurden 500 µl RPE-Puffer (vorher gemäß Hersteller-Empfehlung mit 70 %igem Ethanol gemischt) zugefügt, wieder zentrifugiert und die aufgefangene Lösung entsorgt. Um Reste des Reinigungsprozesses zu eliminieren, wurde abermals 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Zum Eluieren der RNA wurden 35 µl RNase-freies H₂O auf die Säule pipettiert und für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde im Anschluss mit der aufgefangenen Lösung wiederholt, um eine 15-30 % höhere RNA-Konzentration zu erreichen. Die genaue Konzentration wurde mittels Spektrophotometrie bei 260 nm Wellenlänge ermittelt. Die RNA wurde bei -80 °C aufbewahrt.

2.5.2 Umschreibung von RNA in cDNA

Um die RNA mittels Real-time PCR zu quantifizieren, ist es notwendig, sie mittels des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) in cDNA umzuschreiben. Die Umwandlung

wird hauptsächlich durchgeführt da cDNA stabiler ist als RNA. Bei der real time RT-PCR wird zusätzlich zu dem Nachweis von spezifischen DNA-Sequenzen die genaue Menge an DNA-Produkt in Echtzeit ermittelt. Dieses wird bei dem Einbau eines Fluoreszenz-Markers im DNA-Produkt gewährleistet. Der *random hexamer* Primer beim Umschreiben der RNA in cDNA wurde gemäß Herstellerangaben eingesetzt.

Es wurde ein Master-Mix nach der Transcripter One-Step RT-PCR-Kit (Roche, Mannheim) hergestellt, wovon jeder RNA-Probe 8,6 µl zugefügt wurden. Da die Konzentration jeder RNA-Probe unterschiedlich ist und die RT-PCR mit einer Konzentration von 1 µg RNA/Probe arbeitet, wurden die genauen Mischverhältnisse mit der Formel

$$\frac{1 \mu\text{g RNA}}{\frac{(\text{RNA})(\mu\text{g})}{\text{ml}}} = V [\mu\text{l}] (1\mu\text{g RNA enthaltend})$$

ausgerechnet. Das ausgerechnete Volumen wurde zusammen mit einem *random hexamer* Primer in eine 96-Well-Platte pipettiert und mit insgesamt 11,4 µl mit H₂O_{bidest} aufgefüllt. Hiernach wurde es 10 min bei 65 °C inkubiert (*Annealing*) und anschließend auf Eis gelagert (*Termination*). Danach folgten eine Inkubation über 30 min bei 50 °C (*Elongation*) und 5 min bei 80 °C (*Denaturierung*).

2.5.3 Taqman™ Expression Assay und quantitative *real-time* RT-PCR

Hierbei handelt es sich um eine Quantifizierungs-Methode von hergestelltem cDNA-Produkt mittels Fluoreszenz-Sonden. Die Methode wurde erstmals 1991 von Holland *et al.* beschrieben, wobei hier nach der PCR eine lange und aufwendige Auswertung folgte. Diese Hürde wurde 1993 von Lee *et al.* behoben, indem man eine fluoreszierende Sonde in dem gesuchten cDNA-Produkt einbaute. Die sog. FRET-Sonde (Fluoreszenz- bzw. Förster-Resonanz-Energie-Transfer-Sonde) ist ein Oligonukleotid mit einem eingebauten fluoreszierenden Reporter-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat: Peak bei 520-540 nm) am 5'-Ende und einem sog. Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat, Peak bei 570-600 nm) am 3'-Ende. Bei Beleuchtung mit einer Lichtquelle (z. B. Laser) gibt der Reporter-Farbstoff einen Teil der Lichtenergie an den Quencher ab. Dieses erfolgt nur, wenn sie wie auf der FRET-Sonde eng beieinander liegen. Der Quencher unterdrückt somit die Fluoreszenz des Reporters. Wächst dagegen der Abstand zwischen den beiden Farbstoffen, nehmen

die Fluoreszenzübertragung an der Quencher ab und der Reporter fluoresziert. Als Reporter-Farbstoff wurde eine FAM-Sonde (6-Carboxyfluorescein, Applied Biosystems, Darmstadt) und als Quencher TAMRA (Tetramethylrhodamin, Applied Biosystems, Darmstadt) genutzt. Die FRET-Sonde (Applied Biosystems, Darmstadt) lagert sich durch Hybridisierung während der Denaturierung an die cDNA an. Bei der nachfolgenden Elongation der cDNA baut die Taq-Polymerase das 5'-Ende der Sonde durch seine Exonuklease-Aktivität ab. Sequenzspezifisch und proportional zur produzierten cDNA wird so immer mehr Reporter-Farbstoff freigesetzt. Dieser wird nun von einem Messgerät (ABI PRISM 7900 HT Sequence Detector System, Applied Biosystems, Darmstadt) zyklusabhängig in Echtzeit erfasst. Die Ergebnisse werden von dem Messgerät protokolliert, visualisiert und gespeichert.

Um die Expression des gesuchten Zielgens (TRPA1) genau zu quantifizieren, bezieht man sich auf ein Referenzgen (sog. *housekeeping gene*, HKG), hier 18S (Eukaryotic 18S rRNA, Applied Biosystems, Darmstadt) oder GAPDH (Glyceradehyd-3-Phosphatdehydrogenase, Applied Biosystems, Darmstadt), das für jede Probe einen Referenzwert darstellt. Da in den Phasen der PCR nicht immer gleichmäßig viel Fluoreszenz freigesetzt wird, verwendet man den sog. C_T -Wert (Schwellenwert-Zyklus (*threshold cycle*)) für weitere Berechnungen. Dieser Wert beschreibt den Teil des PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenz des Zielgens erstmals signifikant die Hintergrund-Fluoreszenz übersteigt. Dieser Zyklus findet immer während Elongationsphase statt (Higuchi *et al.* 1993; Gibson *et al.* 1996; Bustin 2000). Die Berechnung des Expressionsunterschiedes erfolgt mit der sog. ΔC_T -Methode. Hierbei errechnet man erst den ΔC_T -Wert, indem man C_T des Zielgens (TRPA1) vom C_T des Kontrollgens (18S bzw. GAPDH) subtrahiert und somit die Varianz der Expressionsergebnisse normalisiert. Im folgenden Schritt wird vom ermittelten ΔC_T -Wert der ΔC_T -Wert einer Kontrolle abgezogen. So erhält man den $\Delta\Delta C_T$ -Wert. Abschließend wird das relative Verhältnis (*Ratio*) zwischen Kontrolle und Probe ermittelt (Livak *et al.* 2001; Pfaffl 2004):

$$\Delta C_T = C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ Referenzgen} = \text{Behandlung}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ Behandlung} - \Delta C_T \text{ Kontrolle}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Als Vorbereitung wurden 96-Well-Platten mit einem TRPA1-Assay-Mix (Zielgen) und einem 18S-Assay-Mix bzw. GAPDH-Assay-Mix (Kontrollgen) 92 µl/Well und Probe pipettiert und anschließend gevortext. Im Anschluss wurden 8 µl/Well zuvor synthetisierte cDNA dazupipettiert, gemischt und für 6 min bei 1.200 rpm zentrifugiert (Multifuge 3 S-R, Haereus, Hanau). Die Proben wurden danach mit 23µl/Well auf Taqman™-96-Well-Platten verteilt und, um Luftblasen zu beseitigen, kurz bei 1.200 rpm zentrifugiert. Nachfolgend wurden die 96-Well-Platten in dem ABI PRISM 7900 HT Sequence Detector (Applied Biosystems, Darmstadt) vermessen und die Software gemäß Hersteller verwendet.

2.6 Kalzium-Influx-Messung mittels Fluo-4 NW Calcium Assay™

Fluo-4 NW (No-Wash) Calcium Assay (Invitrogen, Karlsruhe) ist ein Farbstoff, der zur Quantifizierung von intrazellulärem Kalzium in einer Zelle eingesetzt wird. Dabei wird das Fluo-4 extrazellulär appliziert, was passiv in das Zytosol der Zelle diffundiert, wo es in der aktiven Kalzium-bindenden Form durch zelluläre Esterasen umgewandelt wird. Probenecid wird benutzt, um den aktiven Transport von Fluo-4-markiertem Kalzium durch Anionen-Transporter aus der Zelle heraus zu blockieren. Bei Beleuchtung mit einer Wellenlänge von 494 nm emittiert Fluo-4 mit einer Wellenlänge von 516 nm, was mit Hilfe der Absorptionsspektrometrie gemessen werden kann (Minta *et al.* 1989; Gee *et al.* 2000).

Zellkulturen mit HEK 239T/17 Zellen wurden in einer Konzentration von 5×10^4 Zellen/Well auf eine 96-Well-Platte ausgesät. Zuvor wurden die Zellen mit dem TRPA1-E179-Wildtyp oder der TRPA1-K179-Variante transfiziert und am Versuchstag thermisch mit Hitze (49 °C) oder Kälte (4 °C) für 0 min, 2 min, 5 min, 10 min und 15 min behandelt. Zu Kontrolle dienten nicht-transfizierte Zellen und der spezifische TRPA1-Hemmstoff HC-030031 (Eid *et al.* 2008; Sigma Aldrich, München). Der Fluo-4 NW Farbstoffmix (2 µM Fluo-4: Komponente A), 2,5 mM wasserlösliches Probenecid (Komponente B) und der Assay Puffer (1 x HBSS) samt 20 mM HEPES (Komponente C) (alles Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe) wurden gemäß Herstellerangaben vorbereitet. 100 ml der Komponente C und 1 ml der Komponente B wurden zu der Komponente A hinzugefügt, um die Farbstoffladelösung vorzubereiten. Das Medium wurde sorgfältig von den Zellen

abpipettiert und sofort 100 µl/Well Farbstoffladelösung zu den Zellen hinzugefügt. Hiernach folgte eine Inkubation über 30 min bei 37 °C. Im Anschluss wurde die 96-Well-Platte 30 min bei RT inkubiert und nachher automatisch im Monochromator gemessen. Für den TRPA1-Inhibitor-Versuch wurden zzgl. 15 µl HC-030031 (Sigma Aldrich, München) kurz vor der thermalen Stimulation der Zellen hinzugefügt.

2.7 Rasterelektronenmikroskopie

Mit der Elektronenmikroskopie ist es möglich, hohe Auflösungen der ultrastrukturellen Morphologie von Objekten zu visualisieren. Hierbei wird das Objekt mit einem Elektronenstrahl abgetastet (eng. *sampling*) und Auflösungen bis zu 1 nm erreicht. Man unterscheidet zwei verschiedene Elektronenmikroskop-Typen. Bei der Transmissionselektronenmikroskopie (tEM) erzeugt man Durchleuchtungsbilder, bei der Rasterelektronenmikroskopie (rEM) Oberflächenbilder eines Objektes. In der Rasterelektronenmikroskopie können nur leitende Oberflächen dargestellt werden. Um die Oberfläche eines biologischen Objektes, z. B. Zellen, leitend zu machen, dämpft man eine dünne Gold-Schicht auf. Hierbei ist es wichtig, dass die Schicht nicht zu dick wird, da die feinen Strukturen so nicht dargestellt werden können. Die Abtastung mit dem Elektronenstrahl findet im Hochvakuum statt. Daher müssen die Objekte vor dem Bedampfen absolut wasserfrei sein. Bei der Messung rastert ein fokussierter Elektronenstrahl das Objekt ab und regt dabei die Atome im Objekt an. Dabei werden reflektierte und wieder austretende Signale punktweise gesammelt, verstärkt, detektiert und der Intensitätswert bestimmt. Die Daten werden in Echtzeit auf einen Monitor dargestellt und elektronisch gespeichert (Reimer *et Pfefferkorn* 1999).

Zur ultrastrukturellen Darstellung der kultivierten HEK 293T/17 Zellen mittels Rasterelektronenmikroskop mussten die Zellen zunächst fixiert werden. Hierbei wurden die Zellen 24 h vor Fixierung auf Objektträger (Thermo Scientific, Menzel-Gläser, Braunschweig) in einer Konzentration von $\sim 2,5 \times 10^3$ Zellen/Glasträger ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Transfektion und Temperaturbehandlung erfolgte wie im vorherigen Methodenteil beschrieben. Am nächsten Tag wurden die Zellen als Vorbereitung für die Fixierung drei Mal mit 1 % PBS gespült. 1 ml 3 %iges Glutaraldehyd (in Phosphatpuffer verdünnt) wurde zu den

Zellen hinzugefügt und für die Fixierung für 45 min bei RT inkubiert. Nachfolgend wurde das Glutaraldehyd abpipetiert und die Zellen drei Mal für 5 min mit Phosphatpuffer gespült. Um die Zellen nachzufixieren wurden sie ein Mal 30 min mit 2 %igem Osmium (Merck, Darmstadt) inkubiert. Es folgte die Dehydrierung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 % und zwei Mal 100 % Ethanol) für je 10 min. Daraufhin wurde eine Kritische-Punkt-Trocknung (CPD 030 critical point dryer, Balzers, Witten) durchgeführt, die Objektträger abschließend auf einen Aluminium Stiftprobenteller mit Leit-Tabs (Durchmesser 25 mm, Plano GmbH, Wetzlar) festgeklebt und unter Hochvakuum 30 min mit Gold bedampft, sog. ‚sputtering‘ (Sputter, Ion Tech Ltd., Teddington, U.K.). Die prozessierten Kulturen wurden danach mit dem Rasterelektronenmikroskop Philips XL 20 (Philips Export B.V. Eindhoven, Holland) analysiert. Die elektronenmikroskopischen Messungen wurden im Institut für Anatomie der Christian-Albrichts-Universität zu Kiel (CAU) durchgeführt.

2.8 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine gut etablierte Methode, die zum Nachweis von Antigenen (z. B. Proteinen) in Zellen dient. Die Antigene werden in den unterschiedlichen Zellkompartimenten lokalisiert, was Rückschlüsse auf Zellstrukturen zulässt. Es gibt die direkte und indirekte Immunhistochemie, wobei die direkte Methode eine geringere Spezifität aufweist (Lamvik *et al.* 2001). Hierbei binden zuerst spezifische primäre Antikörper (Anti-V5-IgG_{2a}, Invitrogen, Karlsruhe) ihr Antigen (V5-Epitop vom Paramyxovirus SV5: Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr) und bilden Antigen-Antikörper-Komplexe. Mit einem Sekundärantikörper (Goat-Anti-Mouse, AlexaFluor 488[™], Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe), der gegen die Spezies, in der die Primärantikörper erzeugt wurden, gerichtet ist, werden die Komplexe markiert. An dem Sekundärantikörper ist ein Fluorochrom ankonjugiert, mit dem es unter UV-Bestrahlung einer bestimmten Wellenlänge, z. B. grün, emittiert. Die Emission wird in einem Epifluoreszenzmikroskop (Axiovert 200 M mit AxioCam MRm und ApoTome[™], Carl Zeiss, Göttingen) erfasst und mit Hilfe von der Computersoftware AxioVision 4.7[®] (Carl Zeiss, Göttingen) weiter bearbeitet. Das ApoTome[™] ermöglicht es, optische Schnittbilder von ca. 1 µm Dicke mit Hilfe von Gitterprojektionstechnik zu erzeugen

(sog. Z-Stapel). Somit können die Antikörper-Komplexe lokalisiert werden. Um die Zellkerne darzustellen werden sie mit Mayers Hämalaunlösung (Merck, Darmstadt) gefärbt, welches an die DNA im Zellkern und nicht an die Zellmembran bindet.

Zuerst wurden die Zellen in drei Gruppen aufgeteilt: eine Gruppe Wildtyp-TRPA1 (E179), eine Gruppe mit der Varianten TRPA1 (K179) und eine Gruppe mit nativen Zellen ohne TRPA1. Dabei wurden die HEK 293T/17 Zellen, wie vorher beschrieben, mit dem Wildtyp TRPA1-Kanal oder die TRPA1 Variante transfiziert. Die Zellen wurden in einer Konzentration von $\sim 2,5 \times 10^5$ Zellen auf Objektträger (Carl Roth, Karlsruhe) mit einer Poly-D-Lysin-Schicht ausgesät. Diese Schicht sichert die Adhäsion. 24 h später wurden die drei Zell-Gruppen jeweils mit 5, 10, 15 min Kälte (4 °C), Hitze (49 °C) und unveränderter Temperatur (37 °C) behandelt und sofort danach mit 1 x PBS gespült und fixiert. Bei der Fixierung wurden sie für 10 min bei -20 °C in 100 %igem Aceton inkubiert und danach in 1 x PBS aufbewahrt. Um unspezifische Immunbindungen zu vermeiden, wurden die Zellen danach erst drei Mal für 5 min in Tris-NaCl gespült, anschließend für 30 min in 0,6 %igem H₂O₂-Methanol inkubiert. Hiernach wurde der Mouse-Anti-V5-Primär-Antikörper in Antibody Diluent Reagent Solution™ (beide Invitrogen, Karlsruhe) 1:400 verdünnt und auf 200 µl/Deckglas verteilt, um nachfolgend im Kühlschrank bei 4 °C für 20 h inkubiert zu werden. Darauf folgend wurden die Objektträger drei Mal für 5 min in Tris-NaCl gespült und mit 200 µl/Deckglas 1:700 in Antibody Diluent Reagent Solution™ verdünntem Alexa Fluor 488™ Goat-Anti-Mouse-Sekundärantikörper (grün, Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe) für 60 min inkubiert. Anschließend folgten drei Spülungen für 5 min in Tris-NaCl. Um den Zellkern zu färben wurde Bisbenzimid (Sigma-Aldrich, München) in H₂O_{seradest} (Millipore, Darmstadt) verdünnt und mit 200 µl/Deckglas für 2 min inkubiert. Es folgte drei weitere Spülungen für 5 min in Tris-NaCl. Die Objektträger wurden im Anschluss mit Ethanol entfettet und mit Dako Cytomation Fluorescent Mounting-Medium (blau; Dako, Hamburg) betropft. Abschließend wurden die Objektträger mit einem zweiten Deckglas verschlossen und 1-5 Tage im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt, bevor sie im Fluoreszenzmikroskop beurteilt werden konnten. Um die Spezifität der Antikörper zu überprüfen, wurden Negativ-Kontrollen etabliert. Hier wurde statt Primärantikörper 1 x PBS und die Alexa Fluor 488™ Goat-Anti-Mouse-Sekundärantikörper aufgetragen, um zu zeigen, dass der Sekundärantikörper keine Hintergrundfärbung verursachte. Die ApoTome-

Messungen und immunhistochemischen Färbungen wurden im Institut für Anatomie der CAU durchgeführt.

2.9 Statistische Auswertung

Der p-Wert wurde anhand des Chi-Quadrat-Tests ermittelt, nicht-parametrische Größen wurden mittels Kruskal-Wallis H-Test bzw. Mann-Whitney U-Test verglichen. Die Berechnungen erfolgten mittels IBM SPSS Software.

3 Ergebnisse

3.1 mRNA- und Protein-Expression der TRPA1-Varianten

Die mit den TRPA1-Varianten E179 und K179 transfizierten HEK 293T/17-Zellen, wurden mit Kälte (4 °C) oder Hitze (49 °C) für 0, 5, 10 und 15 min stimuliert. Abb. 8 zeigt die Ergebnisse der Stimulation über 10 min mit Kälte oder Hitze im Vergleich zur Kontrolle. Die weiteren Versuche (Stimulation über 0, 5 und 15 min) zeigten keine signifikanten Unterschiede. Die mit dem TRPA1-Wildtyp E179 transfizierten Zellen zeigten bei Stimulation über 10 min einen signifikanten Anstieg ($p < 0.05$) von TRPA1-mRNA im Vergleich zur Kontrolle. Dieser Effekt war sowohl bei 4 °C als auch bei 49 °C zu beobachten. Dagegen blieb die mRNA-Expression der mit der Variante K179 transfizierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle unverändert. Diese Resultate deuten an, dass sowohl Kälte als auch Hitze die Expression der mRNA des Wildtyp E179 TRPA1-Kanals beeinflussen.

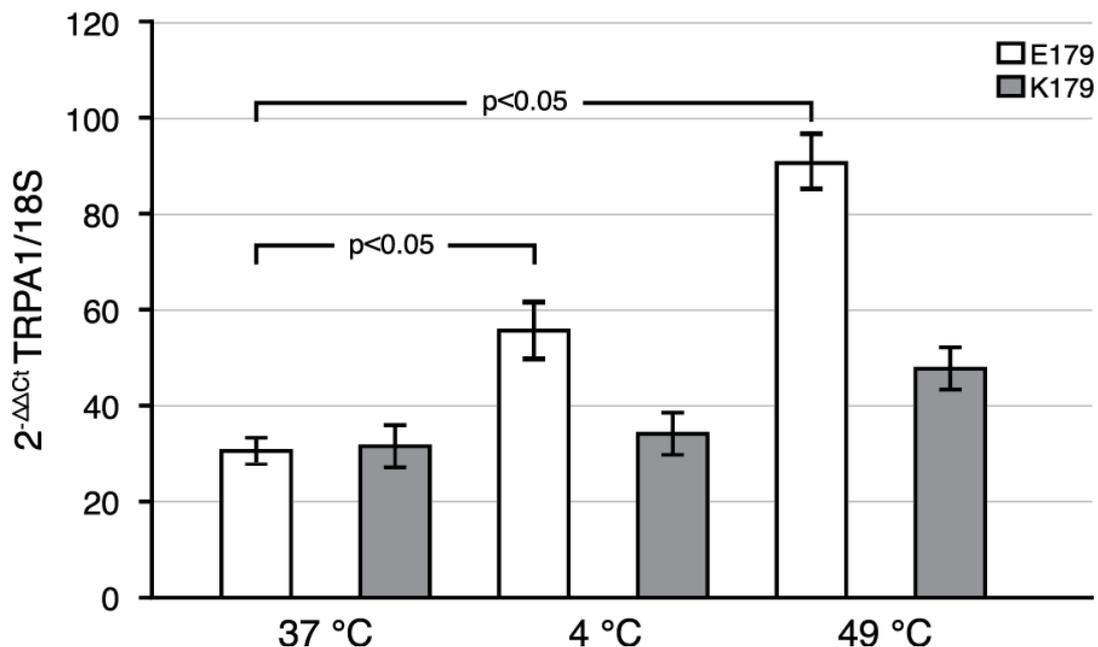


Abb. 8 mRNA-Expression bei Stimulation von mit Wildtyp E179-TRPA1 (weiße Balken) und mit der TRPA1-K179-Variante (graue Balken) transfizierten Zellen. Zur Kontrolle dienten transfizierte Zellen ohne Stimulation (37 °C).

Neben der mRNA-Bestimmung wurden unmittelbar nach der Stimulation auch Proteine isoliert. Die parallele Messung der Fluoreszenz bestätigte die gleichmäßige Transfektions-Effizienz jeder Probe. Die genaue Proteinkonzentration wurde bestimmt und identische Mengen mittels Western Blot analysiert (Abb. 9). Im Blot konnten die unterschiedlichen Regulationen des E179- und K179-Proteins gut erkannt werden: Die 5-minütige Stimulation bei 4 °C (Abb. 9A) erhöhte die Expression des TRPA1-E179 Proteins signifikant. Die Variante K179 blieb, verglichen mit der Kontrolle, dabei unverändert. Es konnten keine Veränderungen der Proteinexpression beider Varianten nach Hitzestimulation festgestellt werden. Die Stimulation des Wildtyps E179 mit Kälte über 10 Minuten führte zu einem starken Expressionsanstieg (Abb. 9B), interessanterweise aber auch bei Stimulation mit Hitze. Eine moderate Erhöhung wurde bei Stimulation mit Kälte auch bei der K179-Variante beobachtet. Bei der Variante verursachte Hitze keinen Expressionsanstieg. Weitere Stimulation mit Kälte oder Hitze über 15 min führte, verglichen mit Stimulation über 5 und 10 min, eher zu einer Abnahme der Expression (Abb. 9C). Einzige Ausnahme war die noch signifikant starke Expression des Wildtyps E179 bei Hitze. Die Resultate haben sich in drei voneinander unabhängigen Experimenten bestätigt.

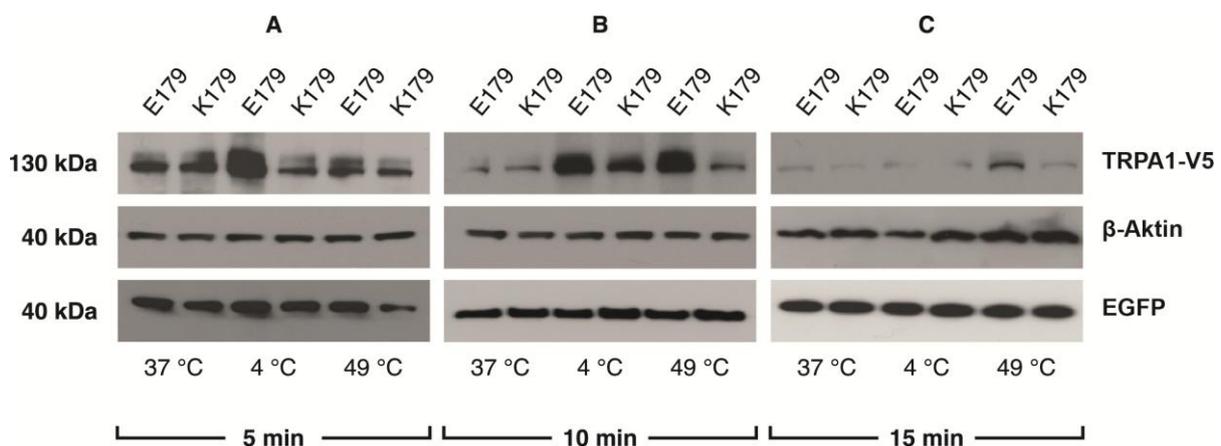


Abb. 9 Proteinexpression der TRPA1-Varianten E179 und K179b nach Thermostimulation (4 °C bzw. 49 °C, verglichen mit 37 °C) über 5 (A), 10 (B) und 15 min (C) im Western Blot.

3.2 Trafficking der TRPA1-Proteine in der Plasmamembran

Durch transiente Transfektion konnten beide TRPA1-Varianten erfolgreich in der Zelle exprimiert werden. Die Präsenz des Proteins in der Zellmembran ist Voraussetzung für dessen Funktionalität. Weiterführend stellte sich die Frage, ob die exprimierten TRPA1-Proteine wie die nativen Proteine in der Zelle lokalisiert sind und ob die Proteine womöglich subzellulär in Abhängigkeit von der Temperatur in die Plasmamembran transportiert werden. Um diese Fragen zu beantworten, wurden zwei Methoden ausgewählt: Der Biotinylierungsassay als Nachweis des Proteins in der Zellmembran vor und nach thermaler Stimulation und die Immunfluoreszenzmikroskopie zur Analyse der Lokalisation des Kanals innerhalb der Zelle.

3.2.1 Biotinylierung der TRPA1-Oberflächenproteine

Es ist bekannt, dass TRPA1-Kanäle, nachdem sie einem stimulierenden Reiz chemischer Natur ausgesetzt wurden, komplexe Strukturen innerhalb der Plasmamembran der Zelle bilden. Eine basale TRPA1-Expression ist bereits ohne Stimulation vorhanden. Vermutet wird jedoch eine erhöhte Expression des TRPA1-Proteins wenn die Zelle noxischen Temperaturen ausgesetzt wird. Um diese Hypothese zu belegen, wurden erneut HEK 293T/17-Zellen mit den beiden TRPA1-Varianten E179 und K179 transfiziert, erneut über 5, 10 und 15 min mit thermischen Reizen stimuliert und anschließend die Biotinylierungsassay durchgeführt. Nach Aufreinigung der markierten Oberflächenproteine und SDS-PAGE-Gelelektrophorese konnte das TRPA1-Protein mittels Western Blot mit dem spezifischen Anti-V5-Antikörper detektiert werden. Die basale Menge von TRPA1-Protein wurde bei einer Kontrolltemperatur von 37 °C festgestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Menge an membrangebundenem TRPA1-Protein bei 37 °C sehr gering ist. Die Stimulation mit Kälte (4 °C) über 10 min verursachte bei dem TRPA1-E179-Wildtyp einen deutlichen Anstieg des Proteins in der Plasmamembran, während dies bei der K179-Variante nicht der Fall war (Abb. 10). Bei Stimulation mit Hitze (49 °C) war umgekehrt die Menge an membrangebundenen K179 erhöht, die von E179 dagegen nicht. Bei thermaler Stimulation über 5 und 15

min war insgesamt keine erhöhte Menge membrangebundenen TRPA1-Protein (weder E179 noch K179) festzustellen (Ergebnissen nicht gezeigt).

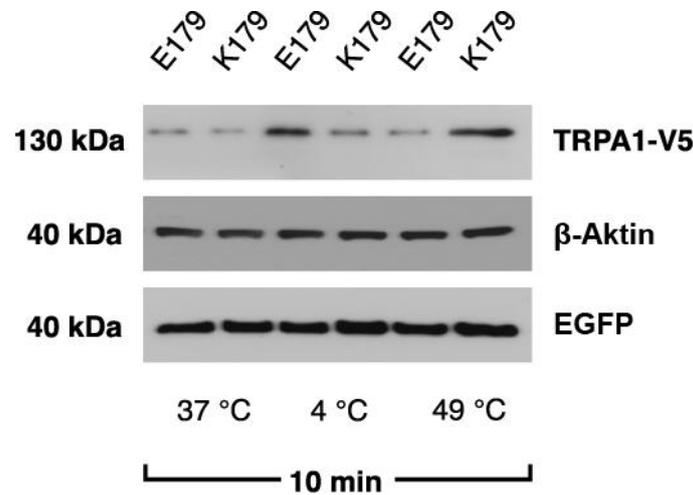


Abb. 10 Nachweis der Menge an Proteinen der TRPA1-Varianten in der Plasmamembran der Zellen vor und nach thermaler Stimulation bei 4 °C bzw. 49 °C über 10 min, verglichen mit 37 °C.

3.2.2 Zelluläre Lokalisation der TRPA1-Varianten

Um den Zusammenhang zwischen thermaler Stimulation und zellulärer Lokalisation des Wildtyps E179 und der Variante K179 TRPA1-Kanal zu ermitteln, wurde eine Immunofluoreszenz-Mikroskopie der transfizierten HEK 293T/17-Zellen durchgeführt. Der Proteineinbau in der Plasmamembran und die Lokalisation in den Zellkompartimenten lagen bei diesen Versuchen im Fokus. Mithilfe der ApoTome™-Technologie wurden Schnittbilder erzeugt, mit denen die Position der fluoreszierenden TRPA1-Proteine ermittelt werden konnten.

Abbildungen 11 A und B zeigen die Anwesenheit von Proteinen der beiden TRPA1-Varianten im Zytoplasma der Zellen bei einer Temperatur von 37 °C. Die HEK 293T/17-Zellen sind, wie im Methodenteil erwähnt, neuronalen Zellen sehr ähnlich, da sie ‚neurite-outgrowth‘-Ausstülpungen und Filopodien besitzen. Diese Ausstülpungen scheinen der Adhäsion der Zelle am Boden und der Zell-Zell-Interaktionen zu dienen (weiteres siehe Ergebnisse und Diskussion der Rasterelektronmikroskopie). Die beiden TRPA1-Varianten wurden bis in diese Ausstülpungen exprimiert (weißer Pfeil, Abb. 11 A und B). Bei Stimulation mit Kälte

(4 °C, Abb. 11 C und D) über 10 min konnte beobachtet werden, dass sich die Konzentration beider Varianten in der Plasmamembran erhöhte, wobei sich weiterhin TRPA1-Proteine im Zytoplasma nachweisen ließen. Dem gegenübergestellt wurde bei Stimulation mit Hitze (49 °C, Abb. 11 E und F) über 10 min eine fast komplette Translokation der Proteine beider Varianten in der Plasmamembran der HEK 293T/17-Zellen beobachtet. Hierbei verschwanden sie dafür zum Teil aus dem Zytosol.

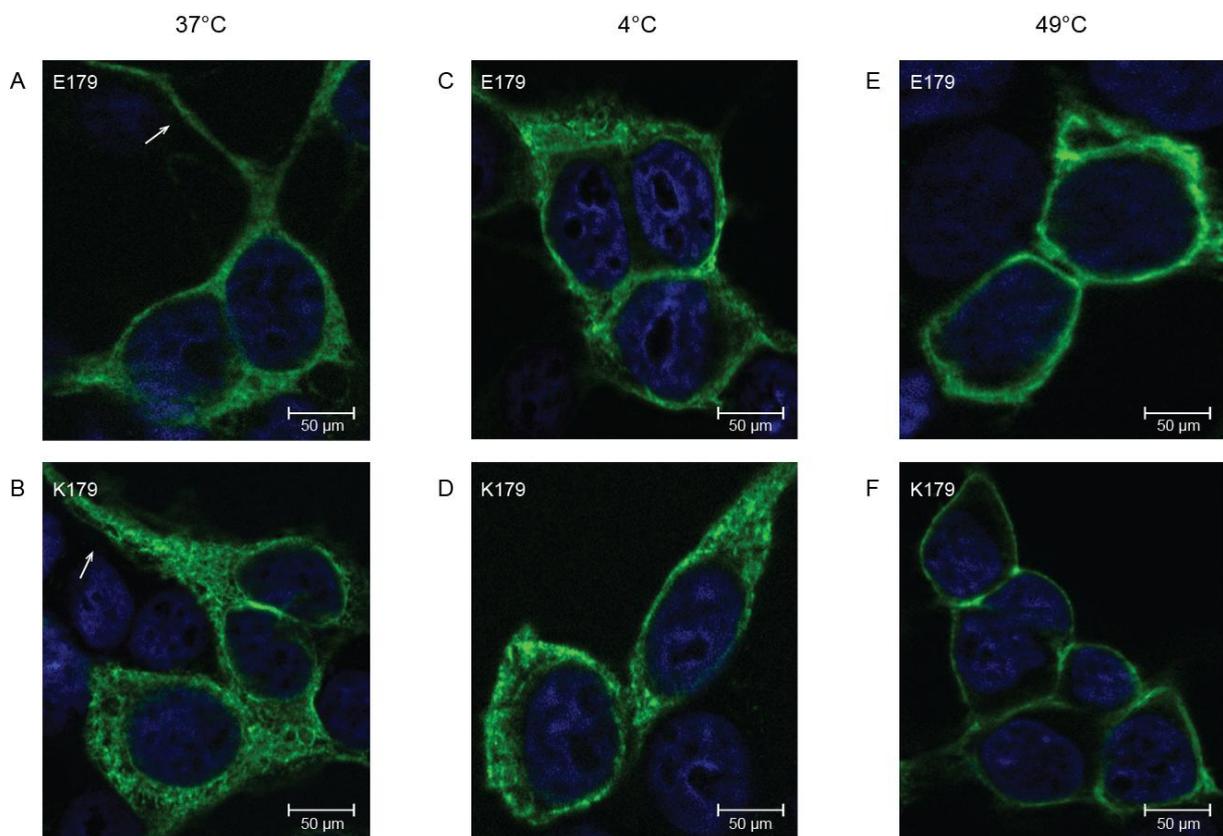


Abb. 11 Immunhistochemischer Nachweis von TRPA1-E179 bzw. K179 in transfizierten HEK 293T/17-Zellen. **A** und **B** zeigen beide Varianten nach 10 min bei 37 °C, **C** und **D** bei Stimulation mit Kälte (4 °C) über 10 min, **E** und **F** bei Stimulation mit Hitze (49 °C) über 10 min.

3.3 Funktionalitätsmessung der TRPA1-Varianten

Wie bereits erwähnt, gehört der TRPA1-Kanal zu der Familie der Ionenkanäle, was bedeutet, dass er bei Aktivierung Ionen in die Zelle hinein transportiert. Somit war es

naheliegender, das Aktivitätsniveau des Kanals über Messungen der Pumpleistung, also die Konzentrationsveränderung der Kationen im Zellinneren, zu messen. Da der Kanal bei Aktivierung hauptsächlich Ca^{2+} befördert, wurde der Ca^{2+} -Influx mit Hilfe des Fluo4NW-Assays im Monochromator gemessen. Mit dem Wildtyp E179 oder der K179-Variante transfizierte HEK 293T/17-Zellen wurden, wie in den anderen Versuchen, über eine Periode von 0 min bis zu 15 min bei Kälte (4 °C) oder Hitze (49 °C) inkubiert.

3.3.1 Funktionalität während thermaler Stimulation

Da bei HEK 293T/17-Zellen nicht auszuschließen ist, dass andere endogene Kanäle bei Temperaturstimulation Kalzium (Ca^{2+}) pumpen, wurden als Kontrolle native nicht-transfizierte HEK 293T/17-Zellen (Abb. 12, schwarze Linie) Kälte und Hitze ausgesetzt und nachfolgend der Kalzium-Influx gemessen. Ferner wurde das Aktivitätsniveau in Zellen, die mit Wildtyp E179 (Abb. 12, grüne Linie) oder der K179-Variante (Abb. 12, rote Linie) bei 37 °C gemessen, um einen Schwellenwert zu bestimmen. Hier wurden keine Unterschiede in der Aktivität unter den beiden Varianten gemessen. Die relativen Fluoreszenzeinheiten (*Relative Fluorescence Units*, RFU) wurden berechnet als die Differenz der Fluoreszenz während Stimulation mit Kälte (4 °C) bzw. Hitze (49 °C) und dem Schwellenwert (37 °C).

Bei Kältestimulation wurde kein signifikanter Anstieg von intrazellulärem Ca^{2+} in den nicht-transfizierten nativen Zellen und den Zellen, die K179 exprimierten, beobachtet. Dagegen war der Ca^{2+} -Influx in den Zellen, die Wildtyp E179 TRPA1 exprimierten, signifikant erhöht ($p < 0.05$). Die maximale Ca^{2+} -Konzentration in diesen Zellen war schon nach 5 min Stimulation erreicht. Jedoch zeigte E179 weiterhin bis zum Zeitpunkt von 15 min Kältestimulation erhöhte Ca^{2+} -Influx-Raten, verglichen mit K179 und den nativen nicht-transfizierten Zellen. Die Ca^{2+} -Konzentration war nach 15 min Stimulation bei allen Zellen wieder auf das Ausgangsniveau abgefallen.

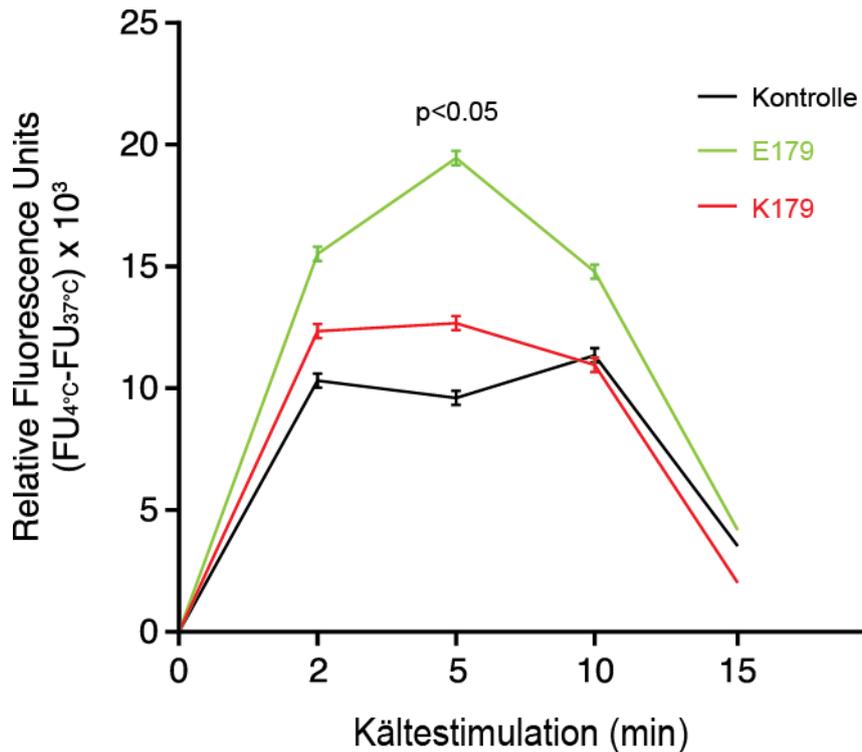


Abb. 12 Ca^{2+} -Influx bei Stimulation der HEK 293T/17-Zellen mit Kälte (4 °C).

Ein ähnliches Experiment diente dem Beweis, dass der TRPA1 Wildtyp E179 und die Variante K179 nicht durch Hitze (49 °C) aktiviert werden (Abb. 13). Hierbei wurde beobachtet, dass die Ca^{2+} -Konzentration bei allen Zellen während der Stimulation im Vergleich zur Kontrolle unverändert blieb. Nur die Variante K179 hatte eine leicht niedrigeren Ca^{2+} -Influx-Konzentration als die anderen. Es wurde zudem abermals festgestellt, dass sich die HEK 293T/17-Zellen nach einer Hitze-Stimulation von über 15 min hinaus vom Boden des Wells lösten und abzusterben schienen.

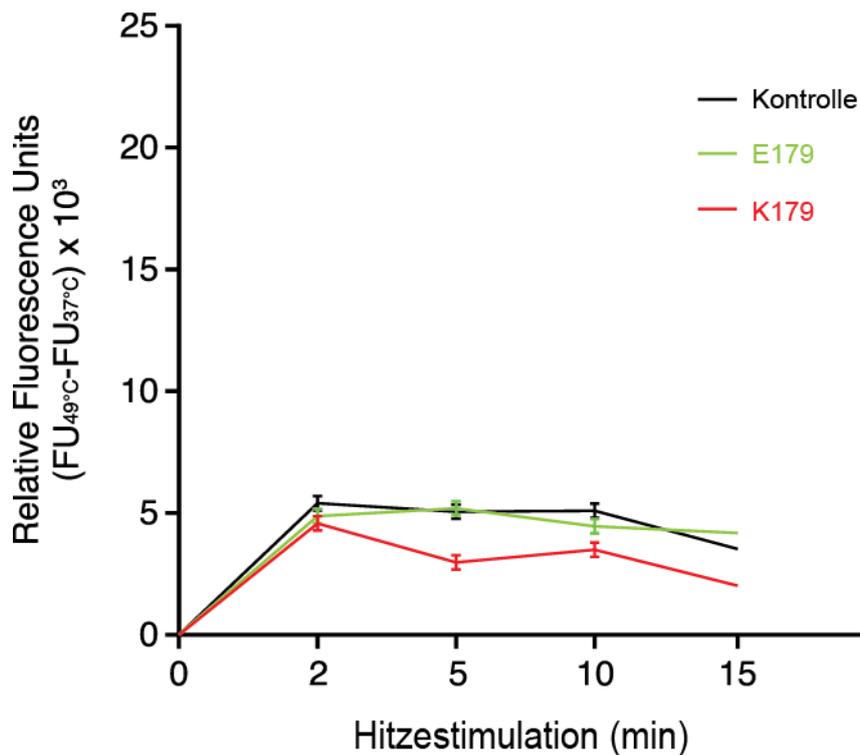


Abb. 13 Ca^{2+} -Influx bei Stimulation der HEK 293T/17-Zellen mit Hitze (49 °C).

3.3.2 Inhibition von TRPA1 mittels HC-030031

Um zu überprüfen, ob der Anstieg des Ca^{2+} -Influxs in mit E179-TRPA1 transfizierten Zellen bei Stimulation mit Kälte tatsächlich vom Kanal verursacht wurde, wurde ein Experiment mit dem spezifischen TRPA1-Inhibitor HC-030031 durchgeführt. HC-030031 hemmt ab einer Konzentration von ca. 15 μ M den TRPA1-Kanal (Eid *et al.* 2008). Wie in Abb. 14 gezeigt, ist in den Zellen mit HC-030031 initial bis zu 2 min lang ein Ca^{2+} -Influx festzustellen (gestrichelte grüne Linie), wobei danach der Influx komplett aufgehoben wird. Bei weiterer Stimulation wird der Kalziuminflux bis zu 5 min fortgesetzt, wonach in der Folge der Kalziumfluss reduziert wird (grüne Linie). Zur Kontrolle dienten native nicht-transfizierte Zellen mit (gestrichelte schwarze Linie) und ohne (schwarze Linie) Zusatz von HC-030031. Bei der Inhibition der nativen Zellen war kein Unterschied festzustellen.

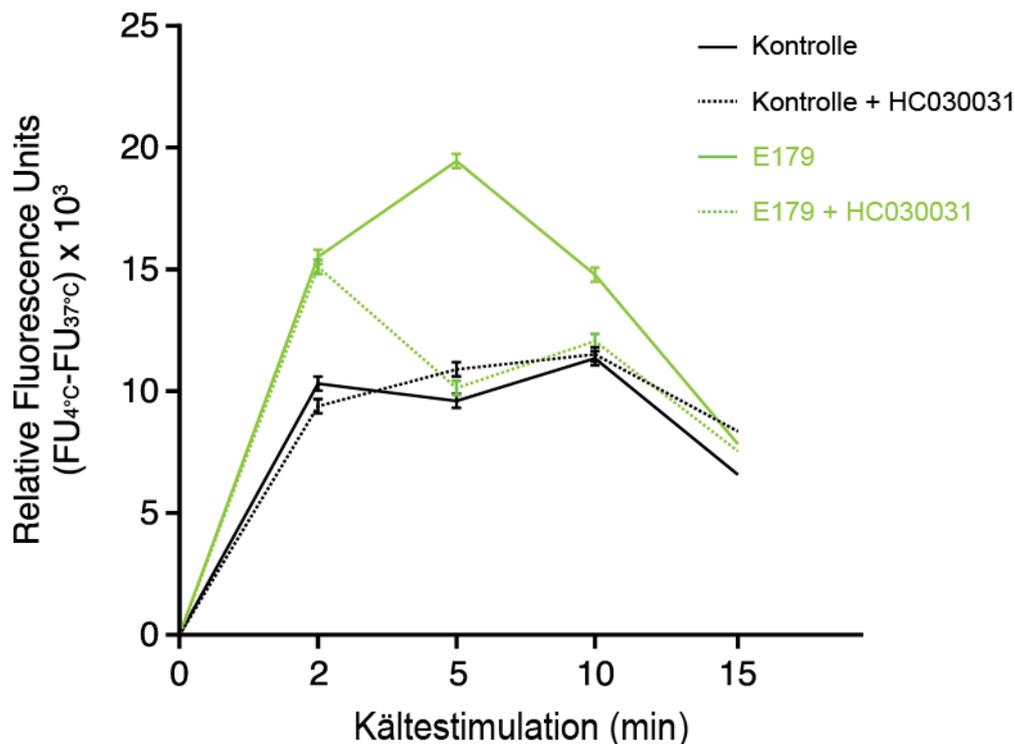


Abb. 14 Ca^{2+} -Influx bei Stimulation des Wildtyp TRPA1-Kanals mit Kälte (4 °C) und spezifische Inhibition durch HC030031.

3.4 Morphologie der HEK 293T/17-Zellen während thermaler Stimulation

Die Zelllinie wurde im Rasterelektronenmikroskop (rEM) untersucht und nach thermaler Stimulation mit Kälte (4 °C) und Hitze (49 °C) über 0, 5, 10 und 15 min und mit Zellen ohne Stimulation (37 °C) verglichen. Dieser Vorgang wurde zusätzlich mit transfizierten Zellen wiederholt und mit den vorherigen Untersuchungen verglichen.

Wie in anderen Arbeiten beschrieben, konnte in den meisten Fällen die typische pyramidenartige oder rhomboide Form der Zellen beobachtet werden. Es wurde bestätigt, dass die Zelle adhäsiv ist, indem unterhalb der Zellen eine Art Biofilm gesichtet wurde, was ebenfalls in immunohistochemischen Bildern im ApoTome™-Z-Stapel beobachtet werden konnte (Ergebnisse nicht gezeigt). Zudem schienen die Zellen mit unzähligen kleinen Filopodien am Boden zu adhären (Abb. 15, 16, weiße Pfeile). Gleichzeitig wurde verdeutlicht, dass diese Ausstülpungen auch dazu benutzt werden, andere Zellen aufzuspüren und mit diesen zu interagieren und/oder zu adhären (Abb. 16).

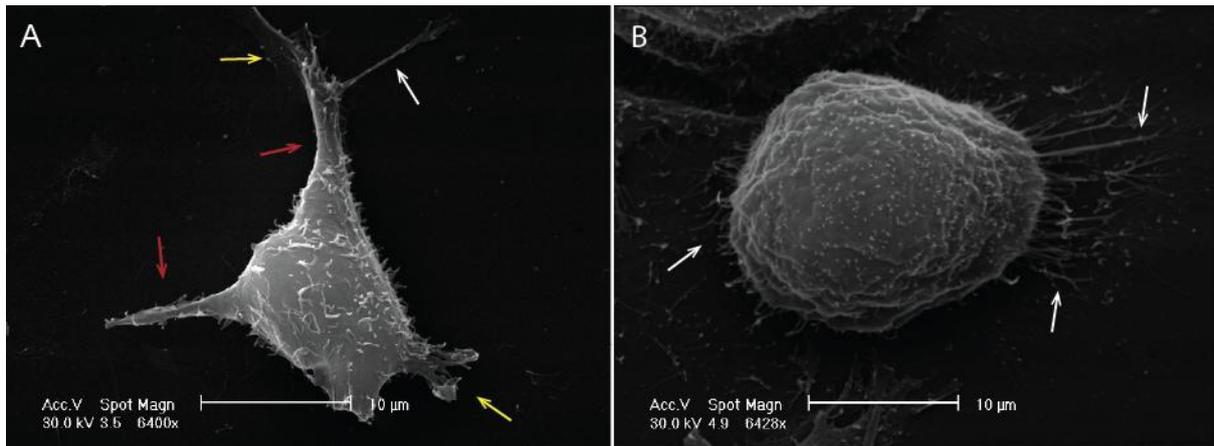


Abb. 15 HEK 293T/17 Zellen ohne thermale Stimulation, rEM Bild. **A** 6400-fach vergrößert mit Wildtyp TRPA1-E179 transfiziert: typische pyramidenartige Form mit neurite-outgrowth-Ausstülpungen (rote Pfeile) und Wachstumskegel (sog. ‚growth-cone‘, gelbe Pfeile). **B** 6428-fach vergrößert mit der Variante TRPA1-K179 transfiziert: ebenfalls typische rhomboide Form. Die Adhäsion am Boden findet mittels einer Art Biofilm und kleinen Haar-ähnlichen Filopodien statt (weiße Pfeile).

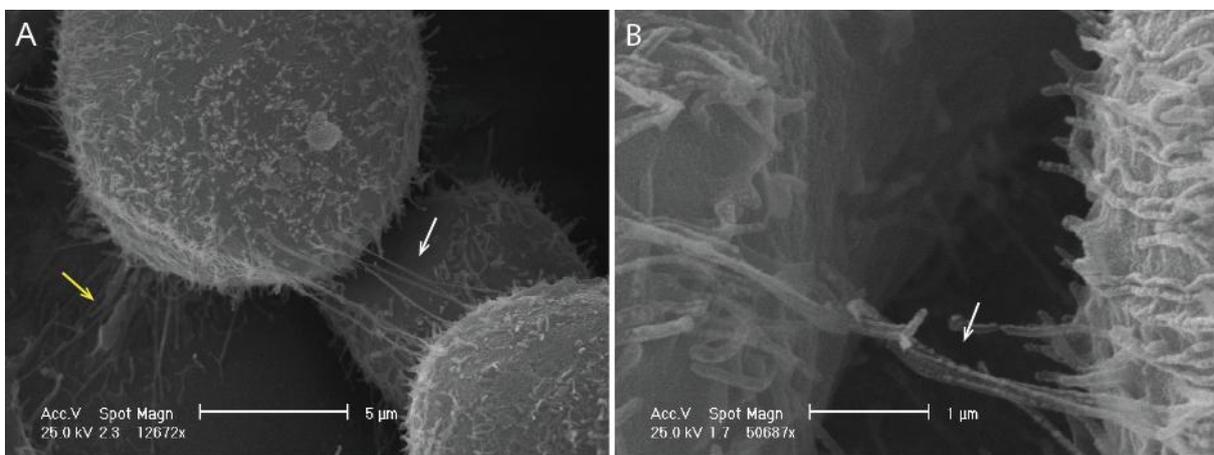


Abb. 16 HEK 293T/17 Zellen ohne thermale Stimulation, rEM Bild. **A** 12.672-fach und **B** 50.687-fach vergrößert. Typisch beobachtete Zell-Zell-Interaktion und/oder Adhäsion mithilfe der Filopodien (weiße Pfeile). Zudem die Haftung am Boden sichtbar (gelber Pfeil).

Wie in den anderen Versuchen beobachtet, wurde im Übrigen gesehen, wie vor allem bei den mit TRPA1 transfizierten Zellen nach Stimulation mit Hitze nach 10 min manche Zellen und nach 15 min ungefähr die Hälfte der Zellen eine runde Form annahmen und ihre Adhärenz sowie zum Teil die *neurite-outgrowth*-Ausstülpungen und Filopodien verloren (Abb. 17). Bei Zellen stimuliert mit Kälte und ohne thermale Stimulation wurde dieses Phänomen nicht beobachtet.

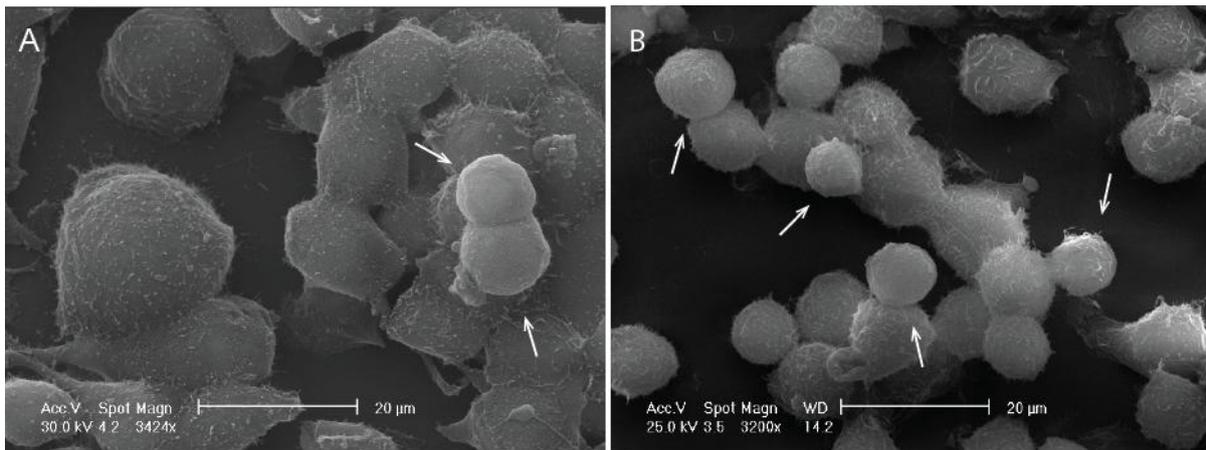


Abb. 17 HEK 293T/17 Zellen, mit TRPA1 transfiziert, rEM Bild, **A** 3424-fach und **B** 3200-fach vergrößert. Bei Stimulation mit Hitze über jeweils 10 min (**A**) und 15 min (**B**) nahmen im Vergleich zu Zellen stimuliert mit Kälte oder ohne thermale Stimulation mehr Zellen auf dem Objektträger eine runde Form an und verloren ihre Adhäsion sowie zum Teil auch die oberflächliche *neurite-outgrowth*-Ausstülpungen und Filopodien.

4 Diskussion

TRP-Kanäle sind elementare Moleküle, die potentiell schädliche Reize als Aktionspotentiale über sensorische Neuronen in die Ursache-Wirkungs-Kette der Nozizeption weiterleiten (Stucky *et al.* 2009). Wie komplex die sensorische Signal-Verarbeitung ist, zeigen die zum Teil sehr unterschiedlichen Ergebnissen der letzten zehn Jahre. Der dem TRPA1-Kanal verwandte TRPM8-Kanal ist z. B. für die Mehrzahl der Kälte-Antworten beim Säuger zuständig (Bautista *et al.* 2007; Colburn *et al.* 2007; Dhaka *et al.* 2007; Stucky *et al.* 2009). Das haben Bautista *et al.* 2007 bei TRPM8-*knock-out*-Mäusen gezeigt: Hierbei blieb eine begrenzte Sensibilität gegenüber Kälte erhalten, vor allem im Bereich der schmerzhaften Kälte (<17 °C). Somit wurde angenommen, dass es einen weiteren (TRP-)Rezeptor gibt, der die Perzeption der schmerzhaften Kälte übermittelt. Die Ergebnisse und der heutige wissenschaftlichen Stand legen nahe, dass der gesuchte Kanal TRPA1 entspricht.

Die Rolle des TRPA1 in der Wahrnehmung von schmerzhafter Kälte ist umstritten. Auf der einen Seite zeigten die Ergebnisse, dass in heterologen Systemen exprimiertes TRPA1 (wie etwa in HEK 293- oder CHO-Zellen) bei Temperaturen unterhalb von 17 °C aktiviert wurde. Dies sind Temperaturen, die schmerzhaft für Menschen sind (Story *et al.* 2003; Sawada *et al.* 2007). Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass die exprimierten Kanäle nicht durch schmerzhafte Kälte aktiviert wurden (Jordt *et al.* 2004; Kwan *et al.* 2006) und darüber hinaus eine Aktivierung durch intrazelluläres Ca²⁺ möglich ist (Zurborg *et al.* 2007). Diese sich widersprechenden Ergebnisse könnten 1) durch Zellkulturbedingungen, 2) unterschiedliches Setting der Stimulationsversuche und/oder 3) durch unterschiedliche genetische Profile des TRPA1-Klones bedingt worden sein.

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden unter ähnlichen Voraussetzungen wie von Sawada *et al.* (2007) beschrieben durchgeführt. Sawada *et al.* hatten darauf hingewiesen, dass die Expression des TRPA1-Kanals in HEK 293-Zellen von mehr als 24 h zu Funktionsverlust und damit Verlust der Kältesensitivität führen könnte. Weiterhin wurde beobachtet, dass beim TRPA1-vermittelten Ionen-Einstrom ein Maximum nach einer Stimulation von ca. 5 °C erreicht wurde. Es ist außerdem beschrieben worden, dass eine Stimulation mit 4 °C über kurze Zeit ausreicht, um die Expression des TRPA1-Kanals im Hinterstrang-Ganglion bei Ratten zu steigern (Obata *et al.* 2005). Es wurde somit eine Stimulation bei 4 °C in verschiedenen

Zeitintervallen durchgeführt, insgesamt 20 h nach der transienten Transfektion von HEK 293T/17-Zellen mit dem TRPA1-Kanal. Die TRPA1-DNA, welche in den pcDNA3.1-V5/His-Vektor eingeführt wurde, bestand lediglich aus der kodierenden Sequenz des TRPA1-Kanals, versehen mit dem V5-Epitop und dem His-tag, was spätere Analysen deutlich vereinfacht hat. Die regulatorische Sequenz, welche bei natürlich vorkommendem TRPA1 die Genexpression bestimmt, fehlte somit. Gleichzeitig hat das Modell der vorliegenden Arbeit die Limitierung, dass zurzeit unbekannt ist, ob der in dem pcDNA3.1-V5/His-Vektor befindliche CMV-Promotor selbst temperaturempfindlich ist.

Im Anschluss stellte sich die Frage, ob die Lys-179-Variante in gleichem Maße wie der Glu-179-Wildtyp TRPA1 dazu imstande ist, auf Kältestimulation zu reagieren. Die korrekte Lokalisation in der Plasmamembran der Zelle ist eine Voraussetzung für die aktive Funktion. Es wurde beschrieben, dass die durch Exozytose vermittelte Translokation in die Plasmamembran ein wichtiger Kontrollmechanismus der aktiven Funktion des TRPA1-Kanals ist (Schmidt *et al.* 2009). Auch in dieser Arbeit konnte immunhistochemisch der Nachweis erbracht werden, dass TRPA1 die richtige Lokalisation des aktivierten Kanals aufweist. Beide Glu-179 und Lys-179 TRPA1-Kanäle wurden in der Plasmamembran lokalisiert und der Transport war in beiden Fällen kälteabhängig. Interessanterweise wurden die TRPA1-Varianten bei Stimulation mit Hitze stärker in der Plasmamembran transloziert als bei Stimulation mit Kälte. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die veränderte Temperatur der Umgebung einen Einfluss auf den subzellulären Transport und das *Trafficking* von TRPA1-Protein in der Plasmamembran hat. Zusammenfassend lässt sich folgern, dass die Protein-Expression der genetischen Varianten des TRPA1-Kanals durch schmerzhafte Kälte und Hitze auf unterschiedliche Weise reguliert werden. Dabei scheint der Wildtyp E179 stärker durch thermale Reize induzierbar zu sein als die Variante K179.

Um die Funktionalität der beiden TRPA1-Varianten zu überprüfen, wurde der TRPA1-vermittelte Kalziumtransport durch Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($_{\text{ic}}\text{Ca}^{2+}$) untersucht. Zellen, in denen die Lys-179-Variante exprimiert wurde, zeigten im Vergleich zu nativen nicht-transfizierten Zellen bei Stimulation mit Kälte keinen Anstieg des $_{\text{ic}}\text{Ca}^{2+}$. Dieses könnte man im Vergleich zum Glu-179-Wildtyp als ‚*loss of function*‘, also Funktionsverlust des Kanals, interpretieren. Es gibt Evidenz, dass

andere kältesensitive Kanäle in den HEK 293-Zellen vorkommen, welche über Aktivierung und damit Anstieg des $_{i_c}Ca^{2+}$ indirekt auch zur Aktivierung des TRPA1-Kanals beitragen können (Zurborg *et al.* 2007; Bessac *et al.* 2008; Wang *et al.* 2008; Nilius *et al.* 2012). Im experimentellen Aufbau der vorliegenden Arbeit konnte beobachtet werden, dass die nicht-transfizierten Zellen sowie Zellen, in denen Lys-179 TRPA1 exprimiert wurde, bei kurzzeitiger Stimulation mit 4 °C nur einen moderaten Anstieg des $_{i_c}Ca^{2+}$ auslösten. Somit scheint sich diese Hypothese zu bewahrheiten, der Mechanismus wurde allerdings nicht weiter untersucht. Es konnte aber ein signifikanter Anstieg ($p < 0.05$) des $_{i_c}Ca^{2+}$ in Zellen, die Glu-179 TRPA1 exprimierten gegenüber nicht-transfizierten Zellen festgestellt werden. Dieses wurde, wie in der Literatur schon mehrmals bestätigt, als intakte Sensitivität für schmerzhafte Kälte interpretiert. Zusätzlich wurde gezeigt, dass sich der $_{i_c}Ca^{2+}$ -Influx von Zellen, die Glu-179-TRPA1 exprimierten, bei kurzer Kälte-Aktivierung von bis zu zwei Minuten nicht mit dem spezifischen TRPA1-Inhibitor HC-030031 inhibieren ließ. Dies könnte darauf hinweisen, dass HC-030031 nur aktivierte Kanäle binden können und dass die folgende Inaktivierung nicht durch zweiminütige Inkubation mit dem Inhibitor ausreicht. Hiervon könnte man ableiten, dass das *Trafficking* in der Plasmamembran und die nachfolgende Aktivierung bis zu zwei Minuten dauert. Die Experimente mit dem Inhibitor haben jedoch überzeugende Hinweise darauf geliefert, dass der kälteaktivierte Kalzium-Influx ausdrücklich mit der Aktivierung des Wildtyps Glu-179 TRPA1 einhergeht. Berichte über Interaktion mit dem in den Ca^{2+} -Influx-Versuchen benutzten Probenecid und dem TRPA1-Kanal von McClenaghan *et al.* (2012) und vor kurzem Morgan *et al.* (2014) konnten in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Es ist dennoch empfehlenswert, bei künftigen Versuchsreihen auf Probenecid zu verzichten.

Es wurde nicht erwartet, dass der TRPA1-Kanal auf Hitze reagiert. Trotz Hochregulation des Wildtyps Glu-179 sowie zum Teil der Variante Lys-179 TRPA1-Kanäle bei Hitze und korrekter Lokalisation in der Plasmamembran wurden sie dementsprechend auch nicht von Hitze aktiviert. Obwohl Experimente gezeigt haben, dass eine sogenannte ‚*cross-regulation*‘, also eine gegenseitige Aktivierung bzw. Regulation zwischen dem Hitzerezeptor TRPV1 und TRPA1 stattfindet (Story *et al.* 2003; Bessac *et al.* 2008; Akopian 2011; Nilius *et al.* 2012), konnte dies im *in vitro* Modell der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Das liegt vermutlich hauptsächlich daran, dass TRPV1 nicht koexprimiert wurde. Es wäre unter

Umständen interessant, diesen Mechanismus im Zusammenhang mit PHS weiter zu verfolgen, vor allem weil die Publikation von Sadofsky *et al.* (2014) zeigte, dass die Kanäle ihr Agonisten- und Antagonisten-Profil verändern, wenn sie *in vitro* koexprimiert werden. Dieses muss entsprechend die Hypothese zur Folge haben, dass die sensorische Wahrnehmung ggf. *in vivo* ebenfalls verändert wird. Hier wären weitere Versuchsreihen erstrebenswert.

Schließlich unterstützen die Ergebnisse *in vitro* die früher von Binder *et al.* publizierte klinische Assoziation zwischen dem Genotyp TRPA1-710A und dem Auftreten von PHS und Genotyp TRPA1-710G mit Auftreten von Kältehypersensibilität. Die verstärkte TRPA1-Expression im Träger des Wildtyps-TRPA1 könnte somit Kältehypersensibilität der nozizeptiven Nervenfasern bei Patienten mit neuropathischen Schmerzen verursachen. Des Weiteren konnte nur der Wildtyp Glu-179 TRPA1-Kanal durch Kältestimulation aktiviert werden, jedoch nicht die Lys-179 Variante. Dieser Fakt könnte darauf hinweisen, dass die Unfähigkeit der K179-Variante, auf Kältestimulus zu reagieren, in Zusammenhang mit inkorrektter Faltung und Oligomerisation steht.

Änderungen der Zellmorphologie durch Transfektion sind schon von Thomas *et al.* (2005) beobachtet worden. Hier wurde gleichzeitig beschrieben, wie über die *neurite-outgrowth*-Ausstülpungen zusammenhaftende Zellen elektrophysiologisch über ‚*gap-junctions*‘ miteinander kommunizieren, was Folgen für die Untersuchungen von elektrischen Strömungen in ‚*patch-clamp*‘-Versuchen hat. Die morphologische Veränderung der mit TRPA1-Varianten transfizierten Zellen im rEM während der Stimulation mit Hitze (49 °C), bei der auffällig viele Zellen eine rundliche Form annahmen, muss als Apoptose, also eine von den Zellen eingeleitete Selbstzerstörung, interpretiert werden. Hierbei verloren die Zellen gleichzeitig die Adhäsion, die *neurite-outgrowth*-Ausstülpungen und die Haar-ähnlichen Filopodien. Unter dem Lichtmikroskop konnte die Apoptose der Zellen durch Verlust der Bodenhaftung in allen anderen Versuchen bestätigt werden. Ob dieses Absterben nun direkt durch die Hitzeeinwirkung oder indirekt durch die festgestellte erhöhte Expression von TRPA1-mRNA und TRPA1-Protein durch Hitze (wie in RT-PCR, Western Blot und Immunhistochemie beobachtet) verursacht wurde, bleibt aber weiterhin unklar. Die Versuchsreihen mit nicht-transfizierten Zellen zeigten jedoch bei Stimulation mit Hitze weniger ausgeprägte Apoptose.

TRPA1 in heterologen Systemen, wie etwa der HEK 293-Zellreihe *in vitro* zu exprimieren und Funktionsfähigkeit zu erreichen, ist schon mehreren Arbeitsgruppen gelungen. Die vorliegende Arbeit beleuchtet funktionelle Konsequenzen bei zwei natürlich vorkommenden TRPA1-Varianten. Es existieren bereits Publikationen über die Modulation der Schmerzwahrnehmung beim Menschen in Zusammenhang mit genetischen Varianten des TRPA1-Gens (Kim *et al.* 2006; Zurborg *et al.* 2007; Wang *et al.* 2008; Kremeyer *et al.* 2010; Binder *et al.* 2011; Morgan *et al.* 2014). Der von Binder *et al.* (2011) beschriebene TRPA1-Polymorphismus bei PHS-Patienten war unabhängig von der Ätiologie der Grunderkrankung und dem Geschlecht des Patienten.

Zusätzlich deutet der Zusammenhang zwischen dem Auftreten von PHS bei chronischen Schmerzpatienten mit der erhöhten Expression der Lys-179-TRPA1-Variante auf eine abweichende Sensitivität gegenüber schmerzhafter Kälte hin. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, haben Binder *et al.* 2011 die Hypothese aufgestellt, dass dies eventuell an einer *loss-of-function* des Kanals liegen könnte, was zur Modifikation des Signalwegs führt. Durch Disinhibition des Hitze-Signalwegs oder Aktivierung zentraler thalamischer Zellen wäre dies die Ursache des schmerzhaften Hitzeempfindens. Da in anderen Publikationen festgestellt worden ist, dass TRPA1 mit dem hitzeempfindlichen TRPV1-Kanal über sog. ‚*cross-regulation*‘ interagiert, wäre es denkbar, dass der Wegfall des TRPA1-Kanals eine veränderte Signaltransduktion des TRPV1-Kanals erzeugen könnte und damit ein gestörtes Hitzeempfinden mit sich führt. Dieser Fakt unterstützt die Tatsache, dass es bei Stimulation mit Hitze zu Translokation des Proteins in die Plasmamembran der Zellen kam, obwohl zugleich nachgewiesen werden konnte, dass TRPA1 nicht funktionstüchtig bei dem Hitzereiz war. Ob die verlorene Funktionalität von TRPA1-K179, die unveränderte Expression bei Kältereiz oder gar die Translokation von TRPA1 in der Zellmembran bei Hitzereiz tatsächlich der Grund für das Auftreten von PHS ist, müssen weiteren Untersuchungen zeigen.

Zusammenfassend kann mit Blick auf die Ergebnisse festgestellt werden, dass die mit Lysin substituierte TRPA1-Kanal-Variante K179 nicht funktionsfähig ist und die von Binder *et al.* aufgestellte Hypothese von einer *loss-of-function*-Mutation somit unterstützt werden kann.

5 Zusammenfassung

Der TRPA1-Kanal gehört zur Familie der ‚*transient receptor potential*‘-Kanäle (TRPs) und wird nach heutigem Wissensstand der Untergruppe der thermosensitiven TRP-Kanäle zugeordnet. Er wird bevorzugt im Nervensystem exprimiert, wo er hauptsächlich die Aufgabe eines Kälterezeptors, insbesondere für schmerzhafte Kälte erfüllt. Er wurde inzwischen auch in zahlreichen anderen Organen lokalisiert und neuere Untersuchungen haben ergeben, dass der Kanal auch von einzelnen Chemikalien sowie durch mechanischen Stress und inflammatorische Vorgänge aktiviert werden kann. Eine selektive Hemmung des Kanals erfolgt durch HC-030031. Eine Transition von Guanin zu Adenin an Position 710 der TRPA1 DNA (710G>A) führt zu einer Aminosäuresubstitution von Glutamat (E) zu Lysin (K) an Position 179 (E179K) in der N-terminalen Ankyrin-Repeat-Domäne 4. Bei chronischen Schmerzpatienten, die unter ‚*paradoxical heat sensation*‘ (PHS) litten, wurde diese E179K-Variante signifikant häufiger beobachtet. Es wurde folglich die Hypothese aufgestellt, dass die Variante zu einer ‚*loss of function*‘ des TRPA1-Kanals führt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ermittelt werden, ob die TRPA1-E179K-Varianten in einem HEK 293T/17-Zell-*in-vitro*-Expressionssystem unterschiedliche Expression und/oder Funktion aufweisen. Auf mRNA-Ebene zeigten die Ergebnisse, dass der Wildtyp 710G im Vergleich zur Variante 710A nach thermaler Stimulation signifikant stärker exprimiert wurde. Auf Proteinebene wurde nach Stimulation mit Kälte und Hitze ebenfalls eine erhöhte Expression von p.E179 im Vergleich zur p.K179 festgestellt. Bei den Versuchen zum Nachweis des *Trafficking* des TRPA1-Proteins wurde gezeigt, dass der Wildtyp E179-TRPA1 in der Zellmembran bei Stimulation mit Kälte transloziert wird. Bei der Variante K179-TRPA1 war dies nicht zu beobachten, jedoch bei Stimulation mit Hitze. In der Immunhistochemie wurden bei Stimulation mit Kälte Proteine beider Varianten zum Teil in der Zellmembran transloziert, jedoch bei Stimulation mit Hitze ausschließlich die Variante K179. Bei Experimenten zur Prüfung der Funktionalität zeigte der Kalzium-Influx beim Wildtyp E179 nach 5 min die maximale Ca²⁺-Konzentration. Bei der K179-Variante war dagegen kein erhöhter Influx zu messen. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die E179K-Variante nicht funktionsfähig ist und dass womöglich diese *loss-of-function* zu Disinhibition des physiologischen Gleichgewichtes zwischen kälte- und wärmevermittelten Signalkaskaden und damit zu PHS führen kann.

6 Literaturverzeichnis

Akopian A. Regulation of nociceptive transmission at the periphery via TRPA1-TRPV1 interactions. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2011;12(1):89-94.

Atoyan R, Shander D, Botchkareva NV. Non-neuronal expression of transient receptor potential type A1 (TRPA1) in human skin. *J. Invest. Dermatol.* 2009;129(9):2312-5.

Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian A. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron.* 2004;41(6):849-57.

Bautista DM, Movahed P, Hinman A, Axelsson HE, Sterner O, Högestätt ED, Julius D, Jordt SE, Zygmunt PM. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2005;102(34):12248-52.

Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, Yamoah EN, Basbaum AI, Julius D. TRPA1 Mediates the Inflammatory Actions of Environmental Irritants and Proalgesic Agents. *Cell.* 2006;124(6):1269-82.

Bautista DM, Siemens J, Glazer JM, Tsuruda PR, Basbaum AI, Stucky CL, Jordt SE, Julius D. The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature.* 2007;448(7150):204-8.

Becker JM, Wilchek M. Inactivation by avidin of biotin-modified bacteriophage. *Biochim. Biophys. Acta.* 1972;264(1):165-70.

Benarroch EE. TRP channels: functions and involvement in neurologic disease. *Neurology.* 2008;70(8):648-52.

Bessac BF, Jordt SE. Breathtaking TRP Channels: TRPA1 and TRPV1 in Airway Chemosensation and Reflex Control. *Physiology (Bethesda).* 2008;23:360-370.

Berjukow S, Döring F, Froschmayr M, Grabner M, Glossmann H, Hering S. Endogenous calcium channels in human embryonic kidney (HEK293) cells. *Br. J. Pharmacol.* 1996;118(3):748-54.

Bianchi BR, Zhang XF, Reilly RM, Kym PR, Yao BB, Chen J. Species comparison and pharmacological characterization of human, monkey, rat and mouse TRPA1 channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2012;341(2):360-8.

Binder A, May D, Baron R, Maier C, Tölle TR, Treede RD, Berthele A, Faltraco F, Flor H, Gierthmühlen J, Haenisch S, Hüge V, Magerl W, Maihöfner C, Richter H, Rolke R, Scherens A, Uçeyler N, Ufer M, Wasner G, Zhu J, Cascorbi I. Transient receptor potential channel polymorphisms are associated with the somatosensory function in neuropathic pain patients. *PLoS One.* 2011;6(3):e17387.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976;72:248-254.

Brown MGM, Weston A, Saunders JR, Humphreys GO. Transformation of *Escherichia coli* C600 by plasmid DNA at different phases of growth. *FEMS Microbiology Letters.* 1979;5:219-222.

Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 1981;112(2):195-203.

Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. mol. Endocrinol.* 2000;25(2):169-93.

Campero M, Serra J, Bostock H, Ochoa JL. Slowly conducting afferents activated by innocuous low temperature in human skin. *J. Physiol.* 2001;535(Pt 3):855-65.

Cao DS, Zhong L, Hsieh TH, Abooj M, Bishnoi M, Hughes L, Premkumar LS. Expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) and its role in insulin release from rat pancreatic beta cells. *PLoS One.* 2012;7(5):e38005.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 1997;389(6653):816-24.

Ciccarone C, Chu Y, Schifferli K, Pichet, JP, Hawley-Nelson P, Evans K, Roy L, Bennett S. LipofectAmine 2000 Reagent for rapid, efficient transfection of eukaryotic cells. *Focus.* 1999;21(2):54-55.

Ciccarone C, Hawley-Nelson P. Lipofectin transfection activity increased by protocol improvement. *Focus.* 1995;17:103.

Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature.* 2003;426(6966):517-24.

Clapham DE. Snapshot: mammalian TRP channels. *Cell.* 2007;129(1):220.

Clapham DE, Nilius B, Owsianik G. Transient Receptor Potential channels: TRPA1. Last modified on 30/11/2011. Accessed on 12/12/2012. IUPHAR database (IUPHAR-DB), <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/ObjectDisplayForward?objectId=485>.

Coons AH, Creech HJ, Jones RN. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.* 1941;47:200-202.

Coons AH, Creech HJ, Jones RN, Berliner E. The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. *J. Immunol.* 1942;45:159-170.

Colburn RW, Lubin ML, Stone DJ Jr, Wang Y, Lawrence D, D'Andrea MR, Brandt MR, Liu Y, Flores CM, Qin N. Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. *Neuron*. 2007;54(3):379-86.

Cordero-Morales JF, Gracheva EO, Julius D. Cytoplasmic ankyrin repeats of transient receptor potential A1 (TRPA1) dictate sensitivity to thermal and chemical stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 2011;108(46):E1184-91.

Cosens DJ, Manning A. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature*. 1969;224(5216):285–287.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem*. 1987;162(1):156-9.

Cvetkov TL, Huynh KW, Cohen MR, Moiseenkova-Bell VY. Molecular Architecture and Subunit Organization of TRPA1 Ion Channel Revealed by Electron Microscopy. *J. Biol. Chem*. 2011;286(44):38168-76.

Danna K, Nathans D. Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of *Haemophilus influenzae*. *Proc. Natl. Sci. USA*. 1971;68(12):2913-7.

Davis KD, Pope GE. Noxious cold evokes multiple sensations with distinct time courses. *Pain*. 2002;98(1-2):179-85.

Dhaka A, Murray AN, Mathur J, Earley TJ, Petrus MJ, Patapoutian A. TRPM8 is required for cold sensation in mice. *Neuron*. 2007;54(3):371-8.

Diogenes A, Akopian AN, Hargreaves KM. NGF up-regulates TRPA1: implications for orofacial pain. *J. Dent. Res*. 2007;86(6):550-5.

Doerner JF, Gisselmann G, Hatt H, Wetzel CH. Transient potential channel A1 is directly gated by calcium ions. *J. Biol. Chem*. 2007;282(18):13180-9.

Doihara H, Nozawa K, Kawabata-Shoda E, Kojima R, Yokoyama T, Ito H. TRPA1 agonists delay gastric emptying in rats through serotonergic pathways. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol*. 2009;380(4):353-7.

Dong Y, Shi HL, Shi JR, Wu DZ. Transient receptor potential A1 is involved in cold-induced contraction in the isolated rat colon smooth muscle. *Sheng Li Xue Bao*. 2010;62(4):349-56.

Early S. TRPA1 channels in the vasculature. *Br. J. Pharmacol*. 2012;167(1):13-22.

Edelmayer RM, Le LN, Yan J, Wei X, Nassini R, Materazzi S, Preti D, Appendino G, Geppetti P, Dodick DW, Vanderah TW, Porreca F, Dussor G. Activation of TRPA1 on dural afferents: a potential mechanism of headache pain. *Pain*. 2012;153(9):1949-58.

Eid SR, Crown ED, Moore EL, Liang HA, Choong KC, Dima S, Henze DA, Kane SA, Urban MO. HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity. *Mol. Pain.* 2008;4:48.

Gaudet R. A primer on ankyrin repeat function in TRP channels and beyond. *Mol. Biosyst.* 2008;4(5):372-9.

Gee KR, Brown KA, Chen WN, Bishop-Stewart J, Gray D, Johnson I. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes. *Cell Calcium.* 2000;27(2):97-106.

Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 1996;6(10):995-1001.

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 1977;36(1):59-74.

Hawley-Nelson P, Ciccarone V, Moore ML. Transfection of cultured eukaryotic cells using cationic lipid reagents. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2008;Chapter 9:Unit 9.4.

Hensel H. Thermoreception and temperature regulation. *Monogr. Physiol. Soc.* 1981;38:1-321.

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology.* 1993;11(9):1096-30.

Hill K, Schaefer M. Ultraviolet light and photosensitising agents activate TRPA1 via generation of oxidative stress. *Cell Calcium.* 2009;45(2):155-64.

Hinman A, Chuang HH, Bautista DM, Julius D. TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006;103(51):19564-8.

Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991;88(16):7276-80.

Hu H, Tian J, Zhu Y, Wang C, Xiao R, Herz JM, Wood JD, Zhu MX. Activation of TRPA1 channels by fenamate nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Pflugers Arch.* 2010;459(4):579-92.

Huang J, Zhang X, McNaughton PA. Modulation of Temperature-sensitive TRP channels. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 2006;17(6):638-45.

Jain A, Brönneke S, Kolbe L, Stäb F, Wenck H, Neufang G. TRP-channel-specific cutaneous eicosanoid release patterns. *Pain.* 2011;152(12):2765-72.

Jaquemar D, Schenker T, Trueb B. An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 1999;274(11):7325-33.

Jiang L, He L, Fountoulakis M. Comparison of Protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *J. Chromatogr. A.* 2004;1023(2):317-20.

Jordt SE, McKemy DD, Julius D. Lessons from peppers and peppermint: the molecular logic of thermosensation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2003;13:487–492.

Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Högestätt ED, Meng ID, Julius D. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature.* 2004;427(6971):260-5.

Kaji I, Karaki S, Kuwahara A. Effects of luminal thymol on epithelial transport in human and rat colon. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2011;300(6):G1132-43.

Karashima Y, Damann N, Prenen J, Talavera K, Segal A, Voets T, Nilius B. Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1. *J. Neurosci.* 2007;27(37):9874-84.

Karashima Y, Prenen J, Meseguer V, Owsianik G, Voets T, Nilius B. Modulation of the transient receptor potential channel TRPA1 by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate manipulators. *Pflugers Arch.* 2008;457(1):C92-99.

Karashima Y, Talavera K, Everaerts W, Janssens A, Kwan KY, Vennekens R, Nilius B, Voets T. TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009; 106(4):1273-8.

Kim H, Mittal DP, Iadarola MJ, Dionne RA. Genetic predictors for acute experimental cold and heat pain sensitivity in humans. *J. Med. Genet.* 2006;43(8):e40.

Koch M, Kreutz S, Böttger C, Grabiec U, Ghadban C, Korf HW, Dehghani F. The cannabinoid WIN 55,212-2-mediated protection of dentate gyrus granule cells is driven by CB1 receptors and modulated by TRPA1 and Cav 2.2 channels. *Hippocampus.* 2011;21(5):554-64.

Kremeyer B, Lopera F, Cox JJ, Momin A, Rugiero F, Marsh S, Woods CG, Jones NG, Paterson KJ, Fricker FR, Villegas A, Acosta N, Pineda-Trujillo NG, Ramírez JD, Zea J, Burley MW, Bedoya G, Bennett DL, Wood JN, Ruiz-Linares A. A gain-of-function mutation in TRPA1 causes familial episodic pain syndrome. *Neuron.* 2010;66(5):671-80.

Kwan KY, Allchorne AJ, Vollrath MA, Christensen AP, Zhang DS, Woolf CJ, Corey DP. TRPA1 contributes to cold, mechanical and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron*. 2006;50(2):277-89.

Kwan KY, Glazer JM, Corey DP, Rice FL, Stucky CL. TRPA1 modulates mechanotransduction in cutaneous sensory neurons. *J. Neurosci*. 2009;29(15):4808-19.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.

Lamvik J, Hella H, Liabakk NB, Halaas Ø. Nonlabeled secondary antibodies augment/maintain the binding of primary, specific antibodies to cell membrane antigens. *Cytometry*. 2001;45(3):187-93.

Lee LG, Connell CR, Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res*. 1993;21(16):3761-6.

Leffler A, Lattrell A, Kronewald S, Niedermirtl F, Nau C. Activation of TRPA1 by membrane permeable local anesthetics. *Mol. Pain*. 2011;7:62.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.

Lous N, Evelegh C, Graham FL. Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology*. 1997;233(2):423-9.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 1951;193(1):265-275.

Macpherson LJ, Hwang SW, Miyamoto T, Dubin AE, Patapoutian A, Story GM. More than cool: promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds. *Mol. Cell. Neurosci*. 2006;32(4):335-43.

Macpherson LJ, Dubin AE, Evans MJ, Marr F, Schultz PG, Cravatt BF, Patapoutian A. Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature*. 2007(a);445(7127):541-5.

Macpherson LJ, Xiao B, Kwan KY, Petrus MJ, Dubin AE, Hwang S, Cravatt BF, Corey DP, Patapoutian A. An ion channel essential for sensing chemical damage. *J. Neurosci*. 2007(b);27(42):11412-5.

Madhusudana SN, Sundaramoorthy S, Ullas PT. Utility of human embryonic kidney cell line HEK-293 for rapid isolation of fixed and street rabies viruses: comparison with Neuro-2a and BHK-21 cell lines. *Int. J. Infect. Dis*. 2010;14(12):e1067-71.

Maizel JV Jr. Acrylamide-gel electrophorograms by mechanical fractionation: radioactive adenovirus proteins. *Science*. 1966;151(3713):988-90.

McClenaghan C, Zeng F, Verkuyl JM. TRPA1 agonist activity of probenecid desensitizes channel responses: consequences for screening. *Assay Drug Dev. Technol.* 2012;10(6):533-41.

McKemy DD. Temperature sensing across species. *Pflugers Arch.* 2007;454(5):777-91.

Michaely P, Tomchick DR, Marchiusi M, Anderson RG. Crystal structure of a 12 ANK repeat stack from human ankyrinR. *EMBO J.* 2002;21(23):6387-96

Minta A, Kao JPY, Tsien RY. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J. Biol. Chem.* 1989;264:8171–8178.

Montell C. The TRP Superfamily of Cation Channels. *Sci. STKE.* 2005;(272):re3.

Morgan K, Sadofsky LR, Crow C, Morice AH. Human TRPM8 and TRPA1 pain channels, including a gene variant with increased sensitivity to agonists (TRPA1 R797T), exhibit differential regulation by Src-tyrosine kinase inhibitor. *Biosci Rep.* 2014.

Mukhopadhyay I, Gomes P, Aranake S, Shetty M, Karnik P, Damle M, Kuruganti S, Thorat S, Khairatkar-Joshi N. Expression of functional TRPA1 receptor on human lung fibroblast and epithelial cells. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* 2011;31(5):350-8.

Nagata K, Duggan A, Kumar G, García-Anoveros J. Niciceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *J. Neurosci.* 2005;25(16):4052-61.

Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev.* 2007;87(1):165-217.

Nilius B, Owsianik G. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol.* 2011(a);12(3):218.

Nilius B, Prenen J, Owsianik G. Irritating channels: the case of TRPA1. *J. Physiol.* 2011(b);589(Pt 7):1543-9.

Nilius B, Appendino A, Owsianik G. The transient receptor potential channel TRPA1: from gene to pathophysiology. *Pflugers Arch.* 2012;464(5):425-58.

Obata K, Katsura H, Mizushima T, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Fukuoka T, Tokunaga A, Tominaga M, Noguchi K. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *J. Clin. Invest.* 2005;115(9):2393-401.

Olsen BJ, Markwell JSC. Assays for the determination of protein concentration. *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, Inc. 2007;3.4.1-3.4.29.

Patapoutian A, Peier AM, Story GM, Viswanath V. Thermo TRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat. Rev. Neurosci.* 2003;4(7):529-39.

Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993;90(18):8392-6.

Pfaffl MW. Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum, Sonderausgabe PCR.* 2004;10:92-95.

Pluskal MG, Przekop MB, Kavonian MR, Vecoli C, Hicks DA. Immobilon PVDF transfer membrane: a new membrane substrate for western blotting of proteins. *Biotechniques.* 1986;4:272-283.

Qian X, Francis M, Solodushko V, Early S, Taylor MS. Recruitment of dynamic endothelial Ca²⁺ signals by the TRPA1 channel activator AITC in rat cerebral arteries. *Microcirculation.* 2013;20(2):138-48.

Ramsey IS, Delleng M, Clapham DE. An introduction to TRP channels. *Annu. Rev. Physiol.* 2006;68:619-47.

Reimer L, Pfefferkorn G. Raster-Elektronenmikroskopie. 2. erw. Auflage. Springer, Berlin, Heidelberg, New York. 1999:ISBN 3-540-08154-2.

Roberts RJ. Restriction endonucleases. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 1976;4(2):123-64.

Roberts RJ. How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005;102(17):5905-8.

Sadofsky LR, Sreeriscna KT, Lin Y, Schinaman R, Gorka K, Mantri Y, Haught JC, Huggins TG, Iswfort RJ, Bascom CC, Morice AH. Unique Responses are Observed in Transient Receptor Potential Ankyrin 1 and Vanilloid 1 (TRPA1 and TRPV1) Co-Expressing Cells. *Cells* 2014;3(2):616-26. doi: 10.3390/cells3020616

Sawada Y, Hosokawa H, Hori A, Matsumora K, Kobayashi S. Cold sensitivity of recombinant TRPA1 channels. *Brain Res.* 2007;1160:39-46.

Schmidt M, Dubin AE, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian A. Nociceptive signals induce trafficking of TRPA1 to the plasma membrane. *Neuron.* 2009;64(4): 498-509.

Shapiro AL, Vinuela E, Maizel JV Jr. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1967;28(5):815-20.

Shaw G, Morse S, Ararat M, Graham FL. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB. J.* 2002;16(8):869-71.

Shih PJ, Evans K, Schifferli K, Ciccarone V, Lichaa F, Masoud M, Lan J, Hawley-Nelson P. High efficiency transfection with minimal optimization using the LipofectAmine Plus Reagent. *Focus.* 1997;19(3):52-56.

Smith HO, Wilcox KW. A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*. I. Purification and general properties. *J. Mol. Biol.* 1970;51(2):379-91.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 1985;150(1):76-85.

Spray DC. Cutaneous temperature receptors. *Annu. Rev. Physiol.* 1986;48:625-38.

Stepanyan RS, Indzhykulian AA, Vélez-Ortega AC, Boger ET, Steyger PS, Friedman TB, Frolenkov GI. TRPA1-mediated accumulation of aminoglycosides in mouse cochlear outer hair cells. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 2011;12(6):729-40.

Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell.* 2003;112(6):819-29.

Stucky CL, Dubin AE, Jeske NA, Malin SA, McKemy DD, Story GM. Roles of transient receptor potential channels in pain. *Brain Res. Rev.* 2009;60(1):2-23. doi:10.1016/j.brainresrev.2008.12.018.

Sviderskaya EV, Easty DJ, Lawrence MA, Sánchez DP, Negulyaev YA, Patel RH, Anand P, Korchev YE, Bennett DC. Functional neurons and melanocytes induced from immortal lines of postnatal neural crest-like stem-cells. *FASEB J.* 2009;23(9):3179-92.

Tai C, Zhu S, Zhou N. TRPA1: the central molecule for chemical sensing in pain pathway? *J. Neurosci.* 2008;28(5):1019-21.

Takumida M, Ishibashi T, Hamamoto T, Hirakawa K, Anniko M. Expression of transient receptor potential channel melastin (TRPM) 1-8 and TRPA1 (ankyrin) in mouse inner ear. *Acta Otolaryngol.* 2009;129(10):1050-60.

Tiselius A. Electrophoresis of serum globulin: Electrophoretic analysis of normal and immune sera. *Biochem. J.* 1937;31(9):1464-77.

Tiselius A. Electrophoresis, past, present and future. *Clin. Chim. Acta.* 1958;3(1):1-9.

- Thomas P, Smart TG. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 2005;51(3):187-200.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979;76(9):4350-4354.
- Treede RD, Meyer RA, Raja SN, Campbell JN. Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia. *Prog. Neurobiol.* 1992;38(4):397-421.
- Venkatachalam K, Montell C. TRP channels. *Annu. Rev. Biochem.* 2007;76:387-417.
- Voets T, Talavera K, Owsianik G, Nilius B. Sensing with TRP channels. *Nat. Chem. Biol.* 2005;1(2):85-92.
- Wang YY, Chang RB, Waters HN, McKemy DD, Liman ER. The nociceptor ion channel TRPA1 is potentiated and inactivated by permeating calcium ions. *J. Biol. Chem.* 2008;283(47):32691-703.
- Wang L, Cvetkov TL, Chance MR, Moiseenkova-Bell VY. Identification of in vivo disulfide conformation of TRPA1 ion channel. *J. Biol. Chem.* 2012;287(9):6169-76.
- Weber K, Osborn M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 1969;244(16):4406-12.
- Wiechelman K, Braun RD, Fitzpatrick JD. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.* 1988;175(1):231-7.
- Wu LJ, Sweet TB, Clapham DE. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *Pharmacol. Rev.* 2010;62(3):381-404.
- Yokoyama T, Ohbuchi T, Saito T, Sudo Y, Fujihara H, Minami K, Nagatomo T, Uezono Y, Ueta Y. Allyl isothiocyanates and cinnamaldehyde potentiate miniature excitatory postsynaptic inputs in the supraoptic nucleus in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2011;655(1-3):31-7.
- Zhang G, Gurtu V, Kain SR. An enhanced fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996;227(3):707-11.
- Zhang XF, Chen J, Faltynek CR, Moreland RB, Neelands TR. Transient receptor potential A1 mediates an osmotically activated ion channel. *Eur. J. Neurosci.* 2008;27(3):605-11.
- Zurborg S, Yurgionas B, Jira JA, Caspini O, Heppenstall PA. Direct activation of the ionchannel TRPA1 by Ca²⁺. *Nat. Neurosci.* 2007;10(3):277-9.

Zurborg S. Defining a function for the ion channel TRPA1. Dissertation Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin der Medizinischen Fakultät Charité Universitätsmedizin Berlin 2009.

7 Lebenslauf

Name	Jonas Marius Baastrup
Geboren	13.09.1978 in Karlebo, Dänemark
Nationalität	dänisch
Familienstand	verheiratet, ein Kind

Schulischer Werdegang

1984 - 1989	Grundschule „Rudolf Steiner Skolen i Allerød“, Allerød, Dänemark
1989 - 1993	Mittelstufe „Rudolf Steiner Skolen i Nordsjælland“, Kvistgård, Dänemark
1993 - 1997	Gymnasium mit Abitur an der „Vidar Skolen“, Gentofte, Dänemark

Hochschullaufbahn

2007 - 2013	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
08/2009	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08/2012 - 12/2012	Erstes Tertial des Praktischen Jahres im Fachgebiet Chirurgie: Klinik für Allgemein- und Thoraxchirurgie, UKSH, Kiel Klinik für Unfallchirurgie (Traumatologie), UKSH, Kiel Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie, UKSH, Kiel
12/2012 - 04/2013	Zweites Tertial des Praktischen Jahres im Wahlfach Dermatologie, UKSH, Kiel
04/2013 - 07/2013	Drittes Tertial des Praktischen Jahres im Fachgebiet Innere Medizin, Franziskushospital und Diakonissenhospital, Flensburg
10/2013	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
ab 01/2014	Assistenzarzt an der Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Thorax-, Transplantations- und Kinderchirurgie des UK-SH, Campus Kiel (Direktor Prof. Dr. med. Thomas Becker)
2010 - 2014	Erstellung der Dissertation am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie unter Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Ingolf Cascorbi

8 Veröffentlichungen

Teile dieser Dissertation wurden vorab publiziert:

- 03/2011 Baastrup J, May D, Binder A, Baron R, Cascorbi I. The hereditary anchored susceptibility to altered sensory nociception. Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology. 2011;383:38. (Abstract)
- 10/2011 May D, Baastrup J, Binder A, Baron R, Cascorbi I. A variant in the TRPA1 nociceptive receptor contributes to the development of pathological pain sensation. Br. J. Clin. Pharmacol. 2011;72 (suppl. 1):1. (Abstract)
- 08/2012 May D, Baastrup J, Nientit MR, Binder A, Schünke M, Baron R, Cascorbi I. Differential expression and functionality of TRPA1 genetic variants in conditions of thermal stimulation. J. Biol. Chem. 2012;287(32):27087-94.

9 Danksagung

Ich widme diese Arbeit meiner Familie, besonders meinen Großeltern und meiner Mutter, ohne deren finanzielle Unterstützungen mein Medizinstudium nicht möglich gewesen wäre.

In erster Linie bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Ingolf Cascorbi für das spannende Thema und die stets nette und konstruktive Betreuung. Mein Dank gilt ebenfalls der Cascorbi-Arbeitsgruppe, insbesondere Frau Dr. rer. nat. Denisa May für die detaillierte Einführung in die Methoden, die hervorragende Zusammenarbeit im Labor und die stetige Geduld bei den Korrekturen sowie ihrer freundliche und liebevolle Art. Ohne ihre Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Weiter möchte ich Herrn Dr. sci. agr. Oliver Bruhn, Frau Approb. Apothekerin Henrike Bruckmüller, Frau Dr. rer. nat. Anneke Werk, Herrn Jun.-Prof. Dr. rer. nat. Sierk Haenisch, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Dr. Juraj Culman, Herrn Prof. Dr. sc. hum. Peter Gohlke samt Herrn Prof. Dr. med. Thomas Herdegen mitsamt Arbeitsgruppe für ihre kollegiale Unterstützung und stets gute Laune während der gesamte Arbeitszeit im Institut bedanken.

Besonderen Dank gilt meinem Mentor Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Michael Schünke, Anatomisches Institut der CAU Kiel, der durch kritische und inspirative Diskussionen, nicht nur fachlich, sondern auch im Hinblick auf meine berufliche und persönliche Weiterentwicklung, mich und mein Studium stets gefördert hat. Nicht weniger möchte mich bei der gesamten Schünke-Arbeitsgruppe bedanken, besonders bei Herrn Frank Lichte sowie Frau Rita Kirsch.

Für zusätzliche Korrekturen und hilfreichen Input danke ich Frau Prof. Dr. med. Renate Lüllmann-Rauch, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Andreas Binder und Frau Dr. rer. nat. Anneke Werk.

Mein großer Dank gilt darüber hinaus allen, die mich den letzten vier Jahren bei der Erstellung dieser Dissertation unterstützt und geholfen haben.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Frau Vera Baastrup danken. Sie hat mich durch ihre Geduld, Liebe und tatkräftige Unterstützung, nicht nur bei den Korrekturen dieser Arbeit, sondern mein gesamtes Studium hindurch unterstützt.