

## Abstract

Thrombospondins (TSPs) form a family of five large oligomeric extracellular matrix glycoproteins that can be subdivided into subgroups A (TSP-1 and -2) and B (TSP-3, -4 and -5/COMP) based on their oligomerization state (trimeric or pentameric, respectively) and domain structure. In the CNS, astrocyte-secreted TSPs were reported to promote the formation of excitatory synapses both *in vitro* and *in vivo* through interaction with the voltage-gated calcium channel subunit  $\alpha_2\delta$ -1. The  $\alpha_2\delta$  proteins ( $\alpha_2\delta$ -1–4) act as auxiliary subunits of voltage-gated calcium channels Cav1 and Cav2, being able to bind to the pore-forming subunits of the channels, modulating the trafficking, expression in the plasma membrane, and biophysical properties of the channels' complexes. Importantly, both  $\alpha_2\delta$ -1 and  $\alpha_2\delta$ -2 have been identified as binding sites for gabapentinoid drugs, however, only  $\alpha_2\delta$ -1 is able to mediate the analgesic effect of these drugs in neuropathic pain. Furthermore, several studies in animal models of neuropathic pain indicate the involvement of  $\alpha_2\delta$ -1 in neuropathic pain development, with nerve injuries leading to up-regulation of  $\alpha_2\delta$ -1 in both dorsal root ganglia and dorsal spinal cord neurons. The observed  $\alpha_2\delta$ -1 up-regulation is correlated with behavioral hypersensitivity, aberrant synaptogenesis, and increased excitatory synaptic transmission.

Injury-induced TSP-4 has similarly been reported to mediate central sensitization and neuropathic pain states. This effect is induced by activating a TSP-4/ $\alpha_2\delta$ -1-dependent pathway initiated by a direct molecular interaction between the two proteins.

Collectively, the TSP(-4)/ $\alpha_2\delta$ -1 interaction might serve as a novel target for developing a new class of analgesics against neuropathic pain. Therefore, the present work focuses on investigating the direct molecular interaction between different TSP members and  $\alpha_2\delta$ -1 variants.

Three recombinantly produced full-length TSPs, namely the trimeric TSP-2 and the pentameric TSP-4 and its structurally related COMP were studied for their direct binding to a soluble  $\alpha_2\delta$ -1 form ( $\alpha_2\delta$ -1<sub>S</sub>) in an ELISA-style binding assay. Only TSP-4 was able to bind to  $\alpha_2\delta$ -1<sub>S</sub>, indicating that  $\alpha_2\delta$ -1 binding is highly specific to TSP-4 and not redundant among other TSPs. The binding of TSP-4 to  $\alpha_2\delta$ -1<sub>S</sub> was found to be calcium independent, showing an apparent dissociation constant ( $K_D$ ) in the range of 150-200 nM. Using a stepwise protein fragmentation approach, the TSP-4/ $\alpha_2\delta$ -1 interaction was found to be mediated by avidity of the pentameric TSP-4 toward the  $\alpha_2$  region of  $\alpha_2\delta$ -1, with the epidermal growth factor (EGF)-like domains of TSP-4 being likely involved in this interaction.

Since gabapentin (GBP) inhibits the TSP/ $\alpha_2\delta$ -1 interaction on biochemical and functional levels, with no evidence for inhibition on a molecular level having been provided yet, the effect of GBP on the direct TSP-4/ $\alpha_2\delta$ -1<sub>s</sub> interaction was studied here as well. The data obtained in the ELISA-style assay indicate that GBP does not directly inhibit this protein/protein interaction, suggesting the possible involvement of other, yet unknown, factors in GBP-mediated inhibition of TSP-4/ $\alpha_2\delta$ -1 pathway.

To demonstrate the characteristics of the direct TSP-4/ $\alpha_2\delta$ -1 interaction in an environment closer to that of native cells, attempts were made to visualize the interaction of fluorescently labeled full-length TSP-4 with membrane-localized  $\alpha_2\delta$ -1 in a cell-based system (HEK293-EBNA). However, no interaction of the two proteins could be detected on the surface of HEK293-EBNA cells, suggesting very weak binding affinity under the conditions of the cell-based assay or the occurrence of this protein/protein interaction in an intracellular compartment.

In conclusion, the present work provides a substantial biochemical evidence for direct and specific GBP-insensitive TSP-4/ $\alpha_2\delta$ -1 interaction with rather a low affinity. Localizing the TSP-4/ $\alpha_2\delta$ -1 interaction in neuronal cells and deciphering the exact mechanism by which GBP inhibits this interaction will be of considerable importance for the development of target-specific analgesics against neuropathic pain.

## Zusammenfassung

Thrombospondine (TSPs) bilden eine Familie von fünf großen, oligomeren, extrazellulären Matrix-Glykoproteinen, die aufgrund ihres Oligomerisierungszustands (Trimer oder Pentamer) und ihrer Domänenstruktur in die Untergruppen A (TSP-1 und -2) und B (TSP-3, -4 und COMP) unterteilt werden können. Im ZNS fördern die durch Astrozyten sezernierten TSPs die Bildung von exzitatorischen Synapsen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch ihre Interaktion mit der Untereinheit  $\alpha_2\delta-1$  des spannungsgesteuerten Calciumkanals. Die  $\alpha_2\delta$ -Proteine ( $\alpha_2\delta-1-4$ ) fungieren als Hilfsuntereinheiten der spannungsgesteuerten Calciumkanäle Cav1 und Cav2. Durch Bindung an die porenbildenden Untereinheiten der Calciumkanäle modulieren die  $\alpha_2\delta$ -Proteine deren Migration, Expression in der Plasmamembran, und biophysikalischen Eigenschaften. Die Untereinheiten  $\alpha_2\delta-1$  und  $\alpha_2\delta-2$  wurden zudem als Bindungsstellen für gabapentinoide Arzneistoffe identifiziert, wobei nur  $\alpha_2\delta-1$  in der Lage ist die analgetische Wirkung dieser Arzneistoffe bei neuropathischen Schmerzen zu vermitteln. Mehrere Studien in Tiermodellen des neuropathischen Schmerzes zeigen eine Beteiligung von  $\alpha_2\delta-1$  bei der neuropathischen Schmerzentwicklung. Dabei führen Nervenverletzungen zu einer Hochregulierung von  $\alpha_2\delta-1$  – sowohl in Spinalganglien als auch in Rückenmarks-Neuronen –, die mit einem überempfindlichen Verhalten, einer anormalen Synaptogenese sowie einer erhöhten exzitatorischen synaptischen Transmission korreliert.

Durch Verletzungen induziertes TSP-4 ist ebenfalls in der Lage zentrale Sensibilisierungs- und neuropathische Schmerzzustände zu vermitteln. Dieser Effekt wird durch Aktivierung eines TSP-4/ $\alpha_2\delta-1$ -abhängigen Signalweges induziert, welcher auf einer direkten molekularen Interaktion der beiden Proteine beruht.

Insgesamt könnte die TSP(-4)/ $\alpha_2\delta-1$ -Wechselwirkung als neuartige Zielstruktur für die Entwicklung einer neuen Klasse von Analgetika gegen neuropathische Schmerzen etabliert werden. Daher konzentriert sich die vorliegende Arbeit auf die Untersuchung der direkten molekularen Wechselwirkung zwischen verschiedenen Vertretern der TSP-Familie und  $\alpha_2\delta-1$ -Varianten.

Drei rekombinant hergestellte Vollängen-TSPs, das trimere TSP-2, das pentamere TSP-4 und das dazu strukturell verwandte COMP, wurden auf ihre direkte Bindung mit einer löslichen  $\alpha_2\delta-1$ -Form ( $\alpha_2\delta-1_s$ ) in einem ELISA-artigen Bindungsassay untersucht. Nur TSP-4 war in der Lage an  $\alpha_2\delta-1_s$  zu binden, was auf die hohe Spezifität dieser Interaktion hinweist, die keine Redundanz

innerhalb der TSP-Familie aufweist. Die TSP-4/ $\alpha_2\delta$ -1<sub>S</sub>-Interaktion erwies sich als Calcium-unabhängig und erfolgte mit einer apparenten Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) von 150-200 nM. Unter Verwendung eines schrittweisen Proteinfragmentierungsansatzes wurde gezeigt, dass die TSP-4/ $\alpha_2\delta$ -1-Wechselwirkung über die Avidität des pentameren TSP-4 an die  $\alpha_2$ -Region von  $\alpha_2\delta$ -1 vermittelt wird, wobei die EGF-ähnlichen Domänen von TSP-4 wahrscheinlich an dieser Interaktion beteiligt sind.

Da Gabapentin (GBP) die TSP/ $\alpha_2\delta$ -1-Interaktion in biochemischen und funktionellen Assays hemmt (wobei der Beweis für eine Hemmung auf molekularer Ebene noch aussteht), wurde der Effekt von GBP auf die direkte TSP-4/ $\alpha_2\delta$ -1<sub>S</sub>-Wechselwirkung in dieser Arbeit untersucht. Die Ergebnisse des ELISA-ähnlichen Assays deuten darauf hin, dass GBP die Protein/Protein-Interaktion nicht direkt inhibiert, was auf eine mögliche Beteiligung anderer, bisher unbekannter Faktoren, bei der GBP-vermittelten Hemmung des TSP-4/ $\alpha_2\delta$ -1-Signalwegs schließen lässt.

Um die TSP-4/ $\alpha_2\delta$ -1-Wechselwirkung in einer Umgebung, die jener nativer Zellen stärker ähnelt, zu untersuchen, wurden Versuche mit fluoreszenzmarkiertem Vollängen-TSP-4 und membranlokalisiertem  $\alpha_2\delta$ -1 in einem zellbasierten System (HEK293-EBNA) durchgeführt. Dabei wurde keine Wechselwirkung der beiden Proteine auf der Oberfläche der HEK293-EBNA-Zellen nachgewiesen, was zum Einen auf eine geringe Bindungsaffinität unter den Bedingungen des zellbasierten Assays oder andererseits auf eine intrazelluläre Protein/Protein-Wechselwirkung hindeuten könnte.

Zusammenfassend liefert die vorliegende Arbeit einen substantiellen biochemischen Beweis für eine direkte, spezifische und GBP-insensitive Wechselwirkung zwischen TSP-4 und  $\alpha_2\delta$ -1, die eine vergleichsweise geringe Affinität aufweist. Die Lokalisierung der TSP-4/ $\alpha_2\delta$ -1-Interaktion in neuronalen Zellen und die Entschlüsselung des genauen Mechanismus, durch den GBP diese Wechselwirkung inhibiert, werden für die Entwicklung zielgerichteter Analgetika gegen neuropathischen Schmerz von erheblicher Bedeutung sein.