

## 4. Summary:

The transmission of pain signalling involves the cytoskeleton, but mechanistically this is poorly understood. The vanilloid receptor TRPV1 plays a well-established functional role in the detection of a wide range of chemical and thermal noxious stimuli, such as those associated with tissue inflammation. TRPV1 activation results in membrane depolarization, but also triggers intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -signalling events. In a proteomic screen for proteins associated with the C-terminal sequence of TRPV1, tubulin was identified as a specific TRPV1-interacting protein. Subsequently it has been shown that the C-terminus of TRPV1 is capable to bind tubulin dimers and polymerized microtubules. The interaction is  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive, and affects microtubule properties, such as microtubule sensitivity towards low temperatures and nocodazole. These results thus provide compelling evidence for the interaction of TRPV1 with the microtubule cytoskeleton. Further results point to the presence of a short - basic stretch of amino acids located within the C-terminus of few other TRPV members, which also reveal tubulin interaction. Therefore, these data indicate that this short sequence might represent a novel tubulin-binding motif.

The  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitivity of the tubulin-TRPV1-Ct interaction suggested that the microtubule cytoskeleton might be the downstream effector of TRPV1 activation. Additional results proved that activation of TRPV1 results in the rapid disassembly of microtubules, but not of the actin or neurofilament cytoskeletons. TRPV1 activation mainly affects the dynamic microtubules that contain tyrosinated tubulins, whereas stable microtubules apparently are unaffected. The C-terminal fragment of TRPV1 – when over-expressed in F11 cells - exerts a stabilizing effect on microtubules. These findings suggested that TRPV1 activation might contribute to cytoskeleton remodelling and thus influence nociception.

Finally the ability of TRPV1 to regulate microtubule cytoskeleton was functionally analyzed in terms of growth cone movement and morphology. The results show that TRPV1 is physically and functionally present at dynamic neuronal extensions, including synaptic structures and growth cones. Within the growth cones, in the resting state, TRPV1-enriched patches seem to provide stability to dynamic microtubules. Upon activation of TRPV1, microtubules disassemble causing rapid retraction and finally collapse of the growth cones and formation of varicosities along the neurites. These results not only indicate the underlying mechanisms by which  $\text{Ca}^{2+}$  channel activity determine axonal path finding process, but also suggest that TRPV1 may play a role in axonal guidance of DRG neurons and may be important for activity dependent plasticity of sensory pathways including chronification of pain.

## Zusammenfassung:

Das Cytoskelett ist an der Weiterleitung von Schmerzsignalen beteiligt, aber die zugrundeliegenden Mechanismen sind noch wenig verstanden. Der Vanilloid-Rezeptor TRPV1 spielt bei der Detektion einer Vielzahl chemischer und thermischer noxischer Stimuli, wie sie bei Gewebeentzündungen auftreten, eine anerkannte Rolle. Die Aktivierung von TRPV1 bewirkt Membrandepolarisation, löst aber auch intrazelluläre Calcium-Signale aus. Bei einem Proteom-Ansatz zur Bestimmung von Proteinen, die mit dem C-terminalen Bereich von TRPV1 assoziiert sind, wurde Tubulin als ein spezifischer TRPV1-Interaktionspartner identifiziert. Im Folgenden wurde gezeigt, dass der C-Terminus von TRPV1 in der Lage ist, Tubulin-Dimere und polymerisierte Mikrotubuli zu binden. Die Interaktion ist  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiv und beeinflusst die Eigenschaften von Mikrotubuli, z.B. ihre Empfindlichkeit gegenüber niedrigen Temperaturen und Nocodazol. Diese Ergebnisse belegen zweifelsfrei die Interaktion von TRPV1 mit dem mikrotubulären Cytoskelett. Im C-terminalen Bereich einiger weiterer TRPV-Rezeptoren, die ebenfalls mit Tubulin interagieren, kommt ein kurzer basischer Abschnitt von Aminosäuren vor, welcher demnach ein neuartiges Tubulin-Bindungsmotiv darstellen könnte.

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Interaktion zwischen Tubulin und TRPV1-Ct ließ vermuten, dass das mikrotubuläre Cytoskelett ein Downstream-Effektor der TRPV1-Aktivierung ist. Zusätzliche Ergebnisse zeigten, dass die Aktivierung von TRPV1 zu einer schnellen Disassemblierung der Mikrotubuli, nicht jedoch des Actin- oder neurofilamentären Cytoskeletts führt. Die Aktivierung von TRPV1 wirkt überwiegend auf dynamische Mikrotubuli, die tyrosinierte Tubuline enthalten, während stabile Mikrotubuli offenbar nicht betroffen sind. Das C-terminale Fragment von TRPV1 übt, wenn es in F11-Zellen überexprimiert wird, einen stabilisierenden Effekt auf Mikrotubuli aus. Diesen Befunden nach könnte die Aktivierung von TRPV1 zum Umbau des Cytoskeletts beitragen und so die Schmerzempfindung beeinflussen.

Schließlich wurde die Fähigkeit von TRPV1, das mikrotubuläre Cytoskelett zu regulieren, anhand der Bewegung und Morphologie von Wachstumskegeln analysiert. Es zeigte sich, dass TRPV1 an dynamischen neuronalen Ausstülpungen, darunter synaptischen Strukturen und Wachstumskegeln, vorhanden und funktionell aktiv ist. In Wachstumskegeln scheint der inaktive TRPV1-Rezeptor in TRPV1-angereicherten Regionen dynamischen Mikrotubuli Stabilität zu verleihen. Nach Aktivierung von TRPV1 disassemblieren die Mikrotubuli, was zu einem schnellen Zurückziehen und schließlich zum Kollaps der Wachstumskegel und zur Bildung von Varikositäten entlang der Neuriten führt. Diese

Ergebnisse zeigen nicht nur die Mechanismen, durch welche die Aktivität von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen den Prozess der axonalen Wegfindung bestimmt, sondern legen nahe, dass TRPV1 eine Rolle bei der Lenkung der Axone von DRG-Neuronen spielt und für die Aktivitäts-abhängige Plastizität sensorischer Leitungswege, darunter der Chronifizierung von Schmerz, bedeutsam ist.