

## 5. Diskussion

Die TRPV-Kanäle sind integrale Komponenten der Wärme- und Schmerz Wahrnehmung und werden durch verschiedene chemische und physikalische Reize aktiviert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden TRPV1 auf eine mögliche Protonenleitfähigkeit und die TRPV-Kanäle auf ihre Fähigkeit zur Heteromultimerisierung untersucht.

### 5.1. TRPV1-vermittelte intrazelluläre Ansäuerung

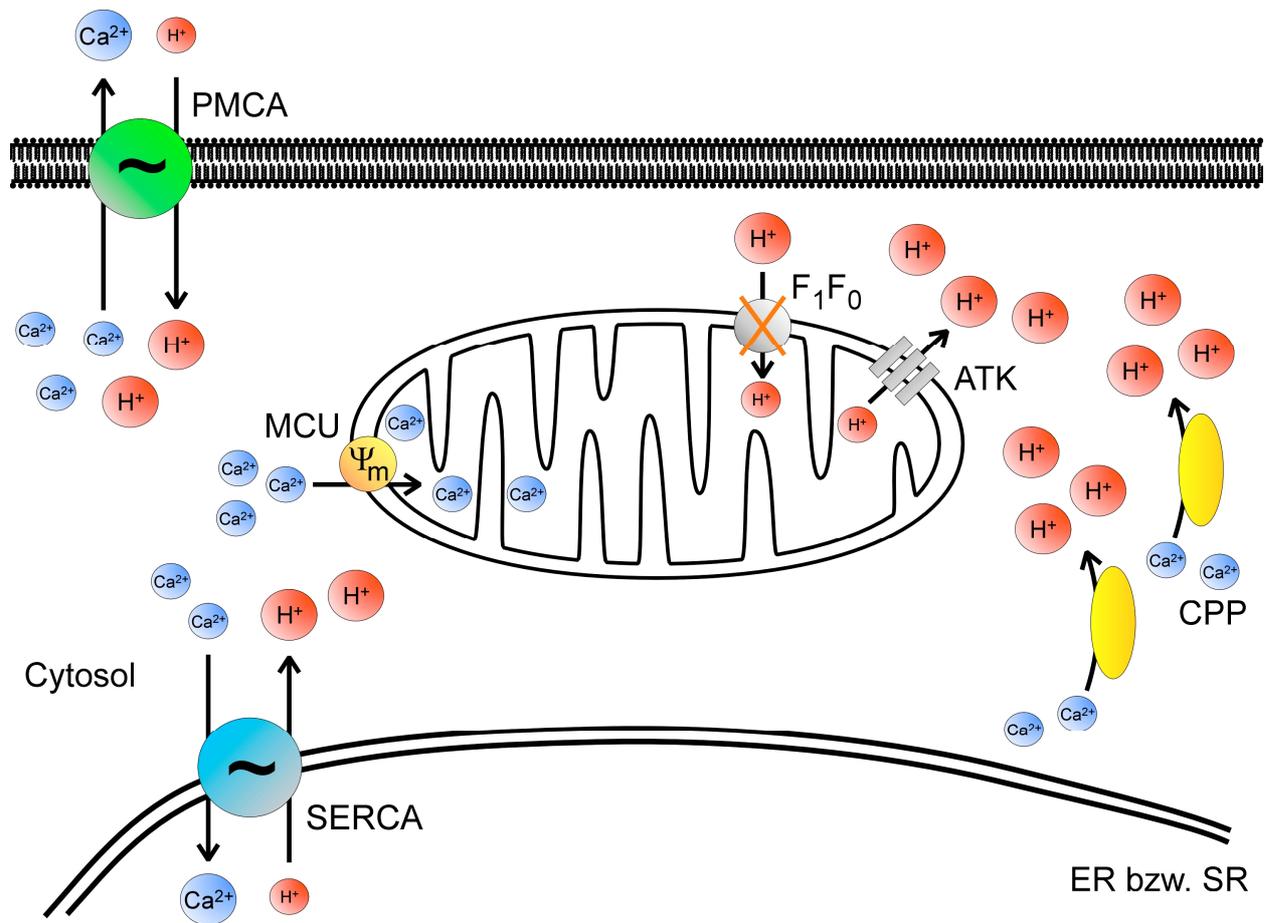
Der Einfluß extrazellulärer Protonen auf die durch Hitze oder Capsaicin vermittelte Aktivierung von TRPV1 ist bereits weitgehend untersucht und molekular aufgeklärt worden (Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998; Jordt et al., 2000). Protonen modulieren die TRPV1-Aktivität durch Interaktion mit zwei Aminosäureresten auf der extrazellulären Fläche des Kanalproteins (Jordt et al., 2000). Eine molekulare Determinante für die Sensitivierung von TRPV1 gegenüber Hitze oder Capsaicin ist das Glu-600 kurz hinter dem 5. Transmembransegment. Die direkte Aktivierung von TRPV1 durch Protonen konnte durch Mutation des Glu-648 innerhalb der Porenregion aufgehoben werden. Mikromolare extrazelluläre Konzentrationen der Lanthanide  $\text{La}^{3+}$  und  $\text{Gd}^{3+}$  führen zu einer Potenzierung TRPC4- und TRPC5-vermittelter Ströme (Schaefer et al., 2000). Für diesen Effekt scheinen wie bei TRPV1 Aminosäurereste in der Nähe der Porenregion verantwortlich zu sein. Die Neutralisation der Aminosäurereste Glu-543, Glu-595 und Glu-598 kurz hinter dem 5. bzw. kurz vor dem 6. Transmembransegment von TRPC5 führten zu der Aufhebung der  $\text{La}^{3+}$ -induzierten Potenzierung der Einwärtsströme (Jung et al., 2003)

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TRPV1 nicht nur durch extrazelluläre Protonen moduliert wird, sondern sowohl im heterologen Expressionssystem als auch in seinem nativen Kontext in sensorischen Neuronen eine intrazelluläre Ansäuerung vermittelt. Hierbei kann zwischen zwei Mechanismen unterschieden werden. In neutralem Extrazellulärmedium findet die intrazelluläre Ansäuerung nur in Abhängigkeit des durch TRPV1 vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx statt, während in azidem Extrazellulärmedium ein direkter Einstrom von Protonen bzw. Hydroniumionen durch die TRPV1-Pore erfolgt. Weiterhin beeinflusst die intrazelluläre Ansäuerung auch direkt die Aktivität von TRPV1.

### ***5.1.1. Mechanismus bei neutralem extrazellulärem pH***

Bei neutralem  $\text{pH}_{\text{ext}}$  war die Capsaicin-induzierte intrazelluläre Ansäuerung in TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen und DRG-Neuronen fest an den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom gekoppelt. Ähnliche  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Ansäuerungsreaktionen konnten in Neuronen und neuroendokrinen Zellen nach Aktivierung Spannungs- oder Liganden-gesteuerter Ionenkanäle bereits beobachtet werden (Törnquist und Tashjian, 1992; Irwin et al., 1994; Wu et al., 1999; Paalasmaa und Kaila, 1996; Meyer et al., 2000). Durch den Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  nach Aktivierung des NMDA-Rezeptors in Neuronen des Hippocampus (Irwin et al., 1994) und in Körnerzellen des Kleinhirns (Wu et al., 1999) kommt es zu einer Absenkung des intrazellulären pH mit einem maximalen  $\text{pH}_i$ -Abfall um 0,53 bzw. 0,36 Einheiten. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx nach Aktivierung von spannungsgesteuerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen in neuroendokrinen Zellen (Törnquist und Tashjian, 1992) und in Interneuronen des Thalamus (Meyer et al., 2000) führte ebenso zu einer Ansäuerung des Cytosols um maximal 0,3 pH-Einheiten. Im Vergleich zu den  $\text{pH}_i$ -Signalen nach Aktivierung des NMDG-Rezeptors oder spannungsgesteuerter  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle war die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige, intrazelluläre Ansäuerung nach Aktivierung von TRPV1 in HEK293-Zellen und in DRG-Neuronen noch ausgeprägter. So konnte in TRPV1-exprimierenden DRG-Neuronen und HEK293 Zellen ein Absinken des  $\text{pH}_i$  um 0,71 bzw. 0,62 pH-Einheiten beobachtet werden. Diese stärkere intrazelluläre Ansäuerung nach TRPV1-Aktivierung könnte durch die signifikante und lang anhaltende  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeabilität zusammen mit der hohen Expression von endogenem TRPV1 in DRG-Neuronen bzw. des heterolog exprimierten TRPV1 in HEK293-Zellen begründet sein. Die pH-Messungen an nativen DRG-Neuronen erfolgte einen Tag nach Präparation, da nach längerer Kultivierung die Capsaicin-induzierten Signale bereits abnahmen. Zu dieser Zeit hatten die Neurone noch keine Fortsätze ausgebildet, und der  $\text{pH}_i$  wurde über dem Zellkörper gemessen. Im nativen Gewebe befindet sich TRPV1 an den freien Nervenendigungen, die im Vergleich zum Zellkörper der Neurone durch ein größeres Verhältnis zwischen Membranoberfläche und Volumen gekennzeichnet sind. Demzufolge könnte die Ansäuerung in den nozizeptiven Nervenendigungen unter Berücksichtigung der subzellulären Umgebung sogar noch stärker ausfallen als sie im Soma von TRPV1-exprimierenden DRG-Neuronen beobachtet werden konnte. Welche Bedeutung die TRPV1-vermittelte intrazelluläre Ansäuerung in den freien Nervenendigungen hat, muss noch untersucht werden.

Eine intrazelluläre Ansäuerung durch erhöhte  $[Ca^{2+}]_i$  kann durch mehrere Mechanismen vermittelt werden (Abb. D1). Zum einen kann es bei einer Aufnahme von  $Ca^{2+}$  in die Mitochondrien zu einem Zusammenbrechen des negativen Membranpotentials entlang der inneren Mitochondrienmembran kommen. Dies hätte zur Folge, dass keine Protonen mehr aus dem Cytosol über die ATP-Synthase in die Mitochondrien transportiert werden bzw. sogar ein Ausstrom von Protonen zu beobachten ist (Wang et al., 1994). Weiterhin kann auch die Verdrängung von Protonen aus  $Ca^{2+}$ -puffernden Proteinen (Vaughan-Jones et al., 1983; Batlle et al., 1993) oder der  $Ca^{2+}/H^+$ -Antiport durch die plasmamembranäre und sarkoplasmatische  $Ca^{2+}$ -ATPase (Paalasmaa und Kaila, 1996; Trapp et al., 1996; Barth et al., 1997; Meyer et al., 2000; Olesen et al., 2004) zu einem Anstieg der intrazellulären Protonenkonzentration führen. Eine Akkumulation von  $Ca^{2+}$  in Mitochondrien sowie ein Zusammenbrechen des negativen mitochondrialen Membranpotentials nach Capsaicin-vermittelter Aktivierung von TRPV1 in DRG-Neuronen ist bereits beschrieben worden (Dedov und Roufogalis 2000; Dedov et al., 2001). Weiterhin wurde gezeigt, dass es in DRG-Neuronen nach Membrandepolarisation und  $Ca^{2+}$ -Einstrom durch spannungsgesteuerte  $Ca^{2+}$ -Kanäle zu einer  $Ca^{2+}$ -Aufnahme in die Mitochondrien, gefolgt von einer intrazellulären Ansäuerung kommt (Werth und Thayer, 1994). Somit wäre es möglich, dass aufgrund des beobachteten starken  $Ca^{2+}$ -Einstroms nach TRPV1-Stimulation in HEK293-Zellen und in nativen DRG-Neuronen Protonen aus den Mitochondrien freigesetzt werden und/oder der blockierte Protonentransfer in die Mitochondrien für die  $Ca^{2+}$ -abhängige Komponente der TRPV1-vermittelten Ansäuerung verantwortlich ist. Experimente an TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen, bei denen der mitochondriale  $Ca^{2+}$ -Uniporter (MCU) mit dem Rutheniumrot-Derivat Ru360 blockiert wurde, ergaben jedoch keinen Aufschluss über eine Beteiligung der Mitochondrien bei der TRPV1-vermittelten  $Ca^{2+}$ -abhängigen intrazellulären Ansäuerung, da Ru360 die TRPV1-Aktivität hemmte. Weitere Möglichkeiten, dies zu untersuchen wäre der Abbau des Membranpotentials durch Entkoppler wie Carbonylcyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP), die Hemmung des Elektronentransports durch Antimycin A1 und die Blockierung der ATP-Synthase durch Oligomycin (Werth und Thayer, 1994; Wang et al., 1994; Wu et al., 1999). Durch Abbau des mitochondrialen Protonengradienten wird dem MCU die treibende Kraft für die mitochondriale  $Ca^{2+}$ -Aufnahme genommen. Die intrazelluläre Protonenkonzentration wird zwar nach Applikation der Reagenzien leicht ansteigen, da die Zelle



**Abbildung D1: Mechanismen der Ca<sup>2+</sup>-abhängigen intrazellulären Ansäuerung bei neutralem Extrazellulärmedium**

Nach einem Ca<sup>2+</sup>-Signal können Protonen bei der Extrusion bzw. Sequestrierung über den Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiport durch die plasmamembranäre und sarkoplasmatische Ca<sup>2+</sup>-ATPase (PMCA, SERCA) in das Cytosol transportiert werden. Durch die Aufnahme von Ca<sup>2+</sup> in die Mitochondrien über den mitochondrialen Ca<sup>2+</sup>-Uniporter (MCU) kann es zum Zusammenbrechen des negativen mitochondrialen Membranpotentials ( $\Psi_m$ ) kommen, wodurch der Transport von Protonen aus dem Cytosol über die Ca<sup>2+</sup>-ATPase (F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>) in die Mitochondrien inhibiert wird. Weiterhin wird der Elektronentransport entlang der inneren Mitochondrienmembran (Atmungskette, ATK) erhöht, um den mitochondrialen Protonengradienten wieder herzustellen. Dabei werden zusätzlich Protonen aus den Mitochondrien in das Cytosol transportiert. Die Verdrängung von Protonen aus Ca<sup>2+</sup>-puffernden Proteinen (CPP) ist ein weiterer Mechanismus, der zu einem Anstieg der intrazellulären Protonenkonzentration führen kann.

den Elektronentransport entlang der inneren Mitochondrienmembran erhöht, um den mitochondrialen Protonengradienten aufrecht zu erhalten und die Glycolyse für den Erhalt des ATP-Niveaus zu erhöhen (Bashan et al., 1993; Wang et al., 1994), die Ca<sup>2+</sup>-vermittelte Ansäuerung nach TRPV1-Aktivierung müsste jedoch ausbleiben. Ob nur ein Mechanismus zur TRPV1-vermittelten Erhöhung der intrazellulären Protonenkonzentration führt oder vielleicht mehrere Komponenten beteiligt sind, wäre in weiteren Versuchen zu klären.

### ***5.1.2. Direkter Protoneneinstrom durch die TRPV1-Pore in azidem Medium***

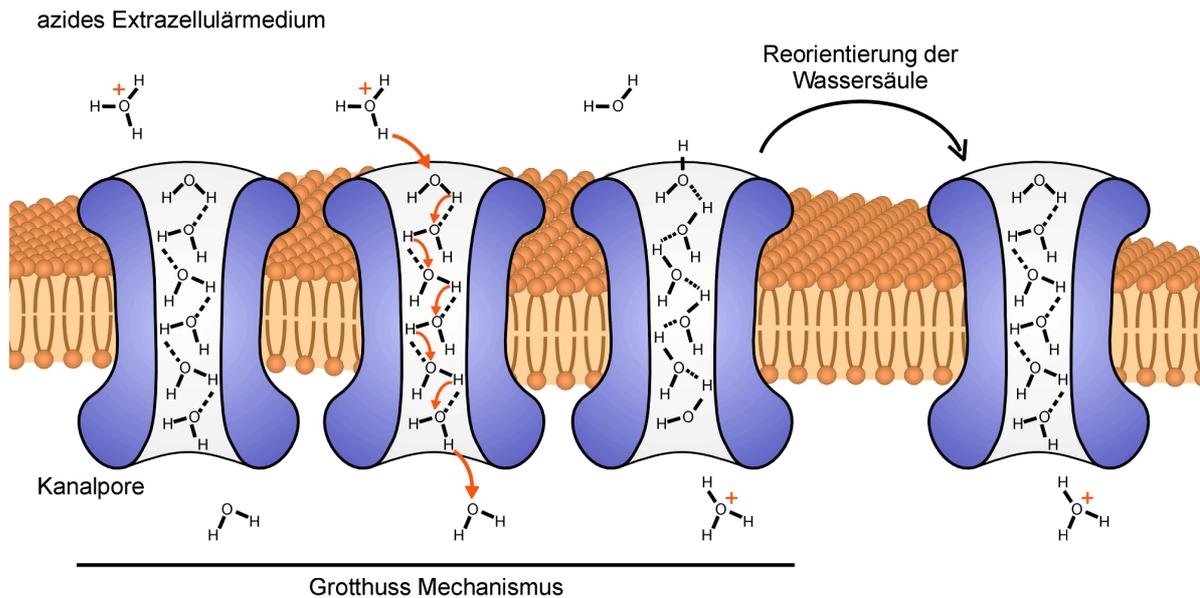
Vergleicht man die Leitfähigkeiten von TRPV1 nur in Bezug auf monovalente Kationen, so scheint TRPV1 ein nahezu komplett unselektiver Kationenkanal zu sein ( $P_K/P_{Na} = 0,94$ ; Caterina et al., 1997;  $P_{Na}/P_K = 1,1$ ; Welch et al., 2000). Diese Eigenschaft führte zu der Frage, ob die TRPV1-vermittelte intrazelluläre Ansäuerung durch eine direkte Protonen- oder Hydroniumleitfähigkeit von TRPV1 hervorgerufen wird. In einer aziden KCl-Lösung (140 mM KCl, 10 mM MES, 2 mM BAPTA, pH 5,5) sind Protonen die einzigen positiven Ladungsträger, die eine in die Zelle gerichtete Antriebskraft erfahren. Unter diesen extrazellulären Bedingungen war nach TRPV1-Stimulation durch Capsaicin eine starke und lang anhaltende Ansäuerung zu beobachten, die durch Zugabe des Porenblockers Rutheniumrot unterbrochen werden konnte. Eine zusätzliche Zugabe von extrazellulärem  $Ca^{2+}$  hatte keinen Einfluß auf die TRPV1-vermittelte Ansäuerung. Ein fast vollständiges Äquilibrium der extrazellulären und intrazellulären Protonenkonzentration konnte innerhalb von 4 min in den meisten TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen erreicht werden. Ein direkter Einstrom von Protonen bzw. Hydroniumionen durch die schwach selektive TRPV1-Pore ist die wahrscheinlichste Erklärung für diesen Effekt. Ein direkter Beweis für die Protonenpermeation durch einen Ionenkanal ist der Nachweis Protonen-getragener Ströme. Spannungsgesteuerte Protonen-selektive Ströme sind bereits in Neuronen von Schnecken (Thomas und Meech, 1982) beschrieben worden. Ähnliche Protonenleitfähigkeiten konnten auch in unterschiedlichen nicht-erregbaren Säugetierzelllinien nachgewiesen werden (DeCoursey et al., 2003), wo sie zur Aufrechterhaltung der NADPH-Oxidasefunktion beitragen. Diese Ströme scheinen von spannungsgesteuerten Protonenkanälen hervorgerufen zu werden, die durch extrazelluläres  $Zn^{2+}$  und  $Cd^{2+}$  blockiert werden. Obwohl diese Ströme klassische Spannungs-, Zeit- und pH-abhängige Öffnungs- und Schließ-Eigenschaften („gating“) aufweisen, deuten indirekte Beweise darauf hin, dass ein anderer Permeationsmechanismus vorliegt als der durch eine klassische Wasser-gefüllte Pore (DeCoursey und Cherny, 1997). Die Messung von Protonenströmen durch einen klassischen Ionenkanal wird durch die sub-mikromolare Verfügbarkeit der freien Ladungsträger erschwert. Darüber hinaus besitzt TRPV1 eine Permeabilität für große Kationen wie  $NMDG^+$  oder  $TEA^+$ , welche üblicherweise in Experimenten als Ersatz für permeierende kleine Kationen eingesetzt werden. Somit wurden in neutraler  $NMDG^+$ -Badlösung bei einem Pipettenpotential von -100 mV

bereits Capsaicin-induzierte Einwärtsströme von mehreren hundert pA gemessen. Eine zusätzliche Protonenstromkomponente sollte jedoch das hierbei gemessene Umkehrpotential  $pH_{\text{ext}}$ -abhängig verschieben. Das Umkehrpotential wurde tatsächlich bei einem Wechsel des extrazellulären Mediums von  $pH_{\text{ext}}$  7,4 auf  $pH_{\text{ext}}$  5,5 zu positiveren Potentialen hin verschoben, und dieser Effekt war reversibel. Da dabei die Konzentration aller anderen Kationen in Bad- und Pipettenlösung konstant gehalten wurde, muss die Rechtsverschiebung des Umkehrpotentials den zusätzlichen Einstrom von Protonen- und/oder Hydroniumionen darstellen. Bei Verwendung von Pipetten- und Badlösungen mit symmetrischen  $NMDG^+$ -Konzentrationen konnten ähnliche  $pH$ -abhängige Verschiebungen des Umkehrpotentials beobachtet werden. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass extrazelluläre Protonen das Umkehrpotential durch Verminderung der fraktionellen  $NMDG^+$ -Permeabilität ( $P_{NMDG^+} : P_{Cs^+}$ ) verschieben. Weiterhin lag bei einem Wechsel des  $pH_{\text{ext}}$  von 7,4 nach 5,5 das Verhältnis der Permeabilitäten  $P_{H^+} : P_{Cs^+}$  bei 1127. Diese hohe relative Protonenpermeabilität ist vermutlich die Grundlage für die Protonenleitfähigkeit von TRPV1 trotz der geringen Verfügbarkeit der Ladungsträger. Die Protonenleitfähigkeit von TRPV1 könnte auch durch eine Veränderung seiner Ionenleitfähigkeit infolge der Abwesenheit von mono- und divalenten Metallkationen hervorgerufen werden, wie dies vor kurzem für  $Na^+$ -Kanäle beschrieben wurde (Ismailov et al., 1997). Unsere Daten zeigten jedoch, dass auch in Gegenwart physiologischer Konzentrationen extrazellulären  $Na^+$  und  $Mg^{2+}$  vergleichbare TRPV1-vermittelte Ansäuerungen beobachtet werden konnten, solange ein Protonengradient über die Plasmamembran angelegt wurde. Wir konnten damit zeigen, dass TRPV1 unabhängig von der Ionenzusammensetzung des extrazellulären Puffers eine direkte Protonenleitfähigkeit besitzt.

### ***5.1.3. Modell der Protonenmigration durch die TRPV1-Pore***

Die Permeation großer heterozyklischer Kationen in Anwesenheit physiologischer  $Na^+$ -,  $K^+$ - und  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen zeigte, dass der Porendurchmesser von TRPV1 groß genug sein könnte, um eine zusammenhängende Reihe von freien Wassermolekülen auszubilden. Somit könnte die Permeation der Protonen entlang dieser Wassersäule innerhalb der TRPV1-Pore erfolgen. Der Hauptunterschied zwischen Protonen und monovalenten Metallkationen in Wasser ist die höhere laterale Beweglichkeit, die durch die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Molekülen

zustande kommt. Der grundlegende Mechanismus der schnellen Mobilität von Protonen entlang einer Wassersäule innerhalb der Pore ist somit das Weiterspringen von Protonen („proton hopping“) von einem Wassermolekül zum nächsten entlang der ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen (Grotthuss-Mechanismus; Abb. D2). Durch den Transfer eines Protons würde die Orientierung der Wassermoleküle innerhalb der Wassersäule verändert, so dass zunächst kein weiteres Proton in der Lage ist, in die Pore einzudringen. Der darauffolgende Prozess der Umorientierung der in der Pore befindlichen Wassermoleküle für den Transfer eines weiteren Protons wäre dabei der zeitlimitierende Schritt. In diesem Moment findet entweder eine Reorientierung der Wasserstoffbrückenbindungen oder die Diffusion der Wassermoleküle zurück in die Ausgangsposition statt (DeCoursey, 2003). Obwohl dieser Mechanismus der Protonenmigration entlang einer wassergefüllten Pore bereits für künstliche Gramacidin-Kanäle nachgewiesen werden konnte (Myers und Haydon, 1972; Levitt et al., 1978; Akeson und Deamer, 1991), sind bislang noch keine strukturellen oder funktionellen Hinweise für die Existenz einer fortlaufenden Kette von freien Wassermolekülen innerhalb einer klassischen Kanalpore gefunden worden. Für die schwach selektiven P2X-Kationenkanäle konnte eine Expansion der Kanalpore durch längere Stimulation (10-60 s) mit ATP beobachtet werden, so dass die Kanäle eine Permeabilität für große Kationen wie NMDG<sup>+</sup> und dem Propidium-Analogon YO-PRO-1 aufwiesen (Khakh et al., 1999; Virginio et al., 1999). Im Rahmen unserer Arbeit konnten Beweise für einen ähnlich großen Porendurchmesser von aktiviertem TRPV1 gezeigt werden. An TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen konnten nach Capsaicin-Zugabe Einwärtsströme der großen Kationen NMDG<sup>+</sup> und TEA<sup>+</sup> gemessen werden. Zusätzlich zu den elektrophysiologischen Beweisen weist auch der TRPV1-vermittelte Einstrom der heterozyklischen und positiv geladenen Farbstoffe MEQ<sup>+</sup> und MQAE<sup>+</sup> auf einen großen Porendurchmesser. Aufgrund der bidirektionalen und Rutheniumrot-sensitiven Permeation der Farbstoffe kann eine Endocytose ausgeschlossen werden. Diese Daten stimmen mit parallel erhobenen Berichten über die direkte Permeation des kationischen Farbstoffes FM1-43 durch nativen und heterolog exprimierten TRPV1 überein (Meyers et al., 2003). Für Gramacidin A wurde durch Festkörper-NMR ein Porendurchmesser von ca. 4 Å berechnet (Kovacs et al., 1999), was bei einem relativen Wassermoleküldurchmesser von 2,8 Å nur den Einbau einer einzelnen einfachen Kette von Wassermolekülen erlaubt. MEQ<sup>+</sup> und MQAE<sup>+</sup> besitzen bei



**Abbildung D2: Schematische Darstellung des Protonentransfers entlang einer Wassersäule innerhalb der Kanalpore**

Die Kanalpore ist mit einer Säule aus freien Wassermolekülen gefüllt, zwischen denen sich Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet haben. Ein Hydroniumion aus dem aziden Extrazellulärmedium gelangt an die Wassersäule und wird innerhalb der Kanalpore über die bestehenden Wasserstoffbrückenbindung durch Protonierungs-/Deprotonierungsreaktionen von einem Wassermolekül zum nächsten bis hin zum cytosolischen Kanalausgang geleitet („proton hopping“; Grotthuss-Mechanismus). Nach der Weiterleitung des Protons in das Cytosol hat sich die Orientierung der Wassermoleküle innerhalb der Kanalpore verändert, so dass kein weiteres Proton vom Extrazellulärmedium aus von der Wassersäule aufgenommen werden kann. Die Wassermoleküle innerhalb der Kanalpore müssen wieder in die Ausgangsposition versetzt werden. Dies kann durch Reorientierung der Wasserstoffbrückenbindungen geschehen. Weiterhin wäre auch eine einfache Rotation oder Diffusion der Wassermoleküle möglich.

optimaler Ausrichtung einen Ionendurchmesser von  $5,9 \text{ \AA}$  bzw.  $7,2 \text{ \AA}$  (siehe Abb. 15), so dass innerhalb der TRPV1-Pore Raum für mindestens zwei nebeneinander liegende Wassermoleküle wäre. Somit unterstützen unsere Daten das Modell, dass die TRPV1-Pore groß genug ist, eine Säule aus freien Wassermolekülen zu fassen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass ein Teil der Wassermoleküle innerhalb der Pore auch mit Aminosäureseitenketten des Kanalproteins interagieren. Weiterhin besteht auch die Möglichkeit, dass Aminosäureseitenketten innerhalb der Pore eine Wasserstoffbrücken-Kette („hydrogen bonded chain“) bilden, die entweder direkt bei der Permeation der Protonen oder bei der Reorientierung

der Wasserstoffbrückenbindungen der Wassersäule beteiligt sein könnte. Bei einer Diffusion von Protonen durch die Pore oder einer Interaktion mit Aminosäureseitenketten innerhalb der Pore wäre die Mobilität der Protonen im Vergleich zu einem Protonentransfer über den Grotthuss-Mechanismus jedoch stark reduziert. Weiteren Aufschluß über den Protonenmigrationsmechanismus durch die TRPV1-Pore könnte die Untersuchung von TRPV1 auf eine mögliche Deuterium ( $D^+$ )-Leitfähigkeit ergeben. Leitet TRPV1  $D^+$  und fällt der Isotopeneffekt bezüglich der Leitfähigkeit vergleichbar mit dem in Wasser aus, so würde dies für eine freie Wassersäule innerhalb der TRPV1-Pore und den Transport von Protonen über einen Grotthuss Mechanismus sprechen.

#### ***5.1.4. Mögliche physiologische Konsequenzen der intrazellulären Ansäuerung***

Die Erhöhung der intrazellulären Protonenkonzentration kann eine Vielzahl von zellulären Effekten auslösen. Außer den in allen Zellen ausgelösten Effekten wie die Einleitung des Zelltodes durch Freisetzung von Cytochrom *c* (Matsuyama et al., 2000) oder die Modulation fast aller enzymatischer Aktivitäten, werden in den TRPV1-exprimierenden freien Nervenendigungen gezieltere Effekte ausgeübt wie z.B. eine Modulation der Umwandlung von Generatorpotentialen zu Aktionspotentialen oder ihre Weiterleitung entlang des Axons. In Übereinstimmung mit dieser Annahme konnte gezeigt werden, dass die Erniedrigung des  $pH_i$  die Aktivität von spannungsgesteuerten  $Ca^{2+}$ -Kanälen in sensorischen Neuronen (Mironov und Lux, 1991; Kiss und Korn, 1999) als auch anderen neuronalen Systemen (Dixon et al., 1993; Takahashi und Copenhagen, 1996) unterdrückt. Weiterhin war zu beobachten, dass die intrazelluläre Ansäuerung zu einer spannungsabhängigen Blockierung der TRPV1-Aktivität führte, die vor allem bei Potentialen größer als -30 mV zum Tragen kam.

TRPV1-exprimierende nozizeptive Neurone werden häufig bei Entzündungsprozessen oder Ischämie aktiviert. Hierbei kann der extrazelluläre pH auf Werte zwischen pH 5,4 - 6,5 fallen (Jacobus et al., 1977; Steen et al., 1995), bei denen im Rahmen dieser Arbeit ein Protoneneinstrom durch TRPV1 gezeigt werden konnte. Da TRPV1 über eine hohe Protonenpermeabilität verfügt, wäre es somit vorstellbar, dass in solchen Situationen TRPV1 zur Vermittlung einer intrazellulären Azidose beitragen könnte, die unter langanhaltenden Bedingungen bis zum Zelltod führen könnte. Weiterführende Arbeiten sollen die spezifischen

nachgeschalteten Effekte der TRPV1-vermittelten Ansäuerung in nozizeptiven Neuronen untersuchen.

## **5.2. Assemblierung von TRPV-Kanaluntereinheiten zu Kanalkomplexen**

Aufgrund ihrer strukturellen Homologie gehören die TRPV-Kanäle zur Superfamilie der hexahelikalen Kationenkanäle. In Analogie zu spannungsgesteuerten Kaliumkanälen und CNG-Kanälen werden funktionelle Kanalkomplexe durch eine Quartärstruktur aus vier TRPV-Untereinheiten aufgebaut, was bereits für TRPV1, TRPV5 und TRPV6 gezeigt werden konnte (Kedei et al., 2001; Hoenderop et al., 2003). Die meisten Arbeiten beschreiben die regulatorischen und biophysikalischen Eigenschaften sowie die Assemblierung einzelner Vertreter der TRPV-Familie. Da durch Multimerisierung von unterschiedlichen TRPV-Kanaluntereinheiten die funktionellen Eigenschaften des resultierenden heteromeren Kanalkomplexes verändert werden könnten, untersuchten wir die mögliche Ausbildung von Homo- und Heteromultimeren. Mit Hilfe biochemischer und biophysikalischer Methoden konnte gezeigt werden, dass innerhalb der TRPV-Familie vorwiegend die Ausbildung von Homomultimeren bevorzugt wird und trotz phylogenetisch relativ enger Verwandtschaft eine erstaunlich eingeschränkte Fähigkeit zur Heteromultimerisierung vorliegt.

### ***5.2.1. Subzelluläre Lokalisation fluoreszierender TRPV-Kanaluntereinheiten***

Zur Untersuchung der Homo- und Heteromultimerisierung innerhalb der TRPV-Familie wurden die Kanaluntereinheiten TRPV1 bis TRPV4 C-terminal mit CFP bzw. YFP fusioniert. Mit Ausnahme von TRPV2-YFP und TRPV3-YFP lagen die heterolog exprimierten TRPV-Kanäle hauptsächlich in intrazellulären Kompartimenten vor. Hierbei stellt sich die Frage, ob sich die Fusionsproteine noch wie die wildtypischen TRPV-Kanaluntereinheiten verhalten. Nach Expression von TRPV1-YFP in HEK293-Zellen konnte eine deutliche Markierung des endoplasmatischen Retikulums und zu einem geringen Teil auch der Plasmamembran beobachtet werden (siehe Abb. 18). Eine vergleichbare Proteinverteilung ist zuvor auch für GFP-markierten TRPV1 in COS7-Zellen (Olah et al., 2001b) und für nativen TRPV1 in Nozizeptoren der Hinterwurzelganglien (Liu et al., 2003) beschrieben worden. In Übereinstimmung mit diesem Befund konnte gezeigt werden, dass in heterolog TRPV1-exprimierenden Zellen und in DRG-Neuronen nach Zugabe von Resiniferatoxin oder Capsaicin  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern

freigesetzt wird (Olah et al., 2001b; Eun et al., 2001; Marshall et al., 2003). Sowohl TRPV2-YFP als auch TRPV3-YFP waren stark in der Plasmamembran angereichert. Eine bevorzugte Lokalisation von endogenem oder FLAG-markiertem TRPV2 in Endomembranen (Kanzaki et al., 1999) oder im Nukleus einer Neuroblastoma-Zelllinie (Boels et al., 2001) war in HEK293-Zellen nicht zu beobachten. Da endogen und heterolog exprimierter TRPV2 sowohl in F-11-Zellen (Hybridoma Zelllinie aus DRG-Neuronen der Ratte und Neuroblastomazellen der Maus; Janel et al., 2003; Bender et al., 2005) als auch TRPV2-YFP in ruhenden HEK293-Zellen bereits in der Plasmamembran vorlag, scheint der als „secretion-coupling model“ bezeichnete und durch Wachstumsfaktoren induzierte Einbau von TRPV2 in die Plasmamembran nicht in allen Zellmodellen vorzuliegen. Vielleicht sind hierfür noch Interaktionen mit anderen regulatorischen Proteinen wie z.B. mit dem Rekombinase-Genaktivator-Protein („recombinase gene activator protein“, RGA; Barnhill et al., 2004; Stokes et al., 2005) notwendig, die nicht in allen Zelltypen exprimiert werden. Für TRPV4-YFP konnte eine Cluster-artige Anordnung in Endomembranen und bei stärkerer Belichtung auch in der Plasmamembran beobachtet werden. Eine hauptsächlich intrazelluläre Lokalisation von TRPV4 ist sowohl in Keratinocyten für nativen TRPV4 (Chung et al., 2003) als auch in HEK293-Zellen für Epitop-markierten TRPV4 (Xu et al., 2003) gezeigt worden. TRPV5-YFP und TRPV6-YFP lagen hauptsächlich in intrazellulären vesikulären Strukturen vor, was dem Proteinlokalisationsmuster entspricht, das für myc-markierten TRPV6 aufgezeigt wurde (Cui et al., 2002). Native TRPV5- und TRPV6-Kanäle befinden sich jedoch in der apikalen Membran renaler oder intestinaler Epithelzellen (den Decker et al., 2003). Dabei könnten zusätzliche, nur in polarisierten Epithelzellen vorliegende Proteine die plasmamembräre Zielsteuerung der TRPV-Kanäle vermitteln. So konnte u.a. eine Interaktion von TRPV5 und TRPV6 mit S100A10, einem Protein aus der Familie der S100-Proteine, nachgewiesen werden (van de Graaf et al., 2003). Die Aufhebung dieser Protein-Protein-Interaktion durch Mutation der S100A10-Bindungsdomäne in TRPV5 bzw. TRPV6 führte zu einer defekten Plasmamembransteuerung der TRPV-Kanäle. Weiterhin könnte ein schneller retrograder Transport zu einer hauptsächlich intrazellulären Lokalisation von TRPV5 und TRPV6 führen. Bei Polycystin-2, einem Mitglied der TRPP-Subfamilie, wird die subzelluläre und plasmembranäre Lokalisation durch Phosphorylierung und Assoziation mit zwei Adapterproteinen, PACS-1 und PACS-2 („phosphofurin acidic cluster sorting protein“),

gesteuert (Köttgen et al., 2005). Ähnliche Mechanismen könnten auch die Zielsteuerung von TRPV5 und TRPV6 betreffen. Trotz einer fast ausschließlich intrazellulären Lokalisation zeigten die YFP-markierten TRPV5- und TRPV6-Kanäle bei Expression in HEK293-Zellen deutliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Einströme mit regulatorischen und biophysikalischen Eigenschaften, die denen der wildtypischen Kanäle entsprachen.

Für TRPC-Kanäle konnte in einer früheren Arbeit bereits gezeigt werden, dass eine C-terminale Fusion von TRP-Kanaluntereinheiten mit Varianten des GFP sowohl die funktionellen Eigenschaften der Kanalkomplexe als auch die Bindung von interagierenden Domänen nicht beeinflussen (Hofmann et al., 2002). Da auch alle fluoreszierenden TRPV-Kanäle sich in fluometrischen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Bestimmungen,  $\text{Mn}^{2+}$ -Quench-Experimenten und elektrophysiologischen Messungen bezüglich ihrer regulatorischen und funktionellen Eigenschaften nicht von den entsprechenden Wildtyp-Kanälen unterscheiden (siehe 4.3.), scheint auch hier die C-terminale Markierung die strukturelle und biophysikalische Integrität der TRPV-Kanäle nicht schwerwiegend zu stören.

### ***5.2.2. Heteromere Interaktion innerhalb der TRPV-Familie***

Die verschiedenen TRPV-Kanaluntereinheiten wiesen nach C-terminaler Fusion mit YFP und heterologer Expression in HEK293-Zellen eine überwiegend stark voneinander abweichende intrazelluläre Lokalisierung auf, was für Rekrutierungsexperimente genutzt wurde. In einer früheren Arbeit der Arbeitsgruppe Gudermann (Hofmann et al., 2002) über TRPC-Kanäle wurde gezeigt, dass die intrazellulär retinierte TRPC1-Kanaluntereinheit durch Koexpression mit TRPC4 und Bildung von TRPC1/TRPC4-Heteromultimeren an die Membran gesteuert werden kann. Nach Koexpression von CFP- und YFP-markierten TRPV-Kanaluntereinheiten in HEK293-Zellen konnte jedoch keine veränderte subzelluläre Zielsteuerung der unterschiedlich lokalisierten TRPV-Kanäle beobachtet werden. Dies läßt auf eine äußerst begrenzte Interaktionsfähigkeit zwischen unterschiedlichen Kanaluntereinheiten innerhalb der TRPV-Familie schließen. Überzeugende Kolokalisationen mit Korrelationskoeffizienten  $r^2$  von 0,3 und größer waren nur bei der Koexpression von TRPV1-YFP und TRPV2-CFP, TRPV2-YFP und TRPV3-CFP oder TRPV5-YFP und TRPV6-CFP zu erkennen. Da eine Kolokalisation nicht beweisend für die Existenz heteromultimerer TRPV-Kanalkomplexe ist, wurden Fluoreszenz-

Resonanz-Energietransfer (FRET)-Experimente zwischen CFP- bzw. YFP-markierten TRPV-Kanaluntereinheiten durchgeführt. Die FRET-Technik ermöglicht es, die direkte räumliche Nachbarschaft von Proteinen in lebenden Zellen zu untersuchen. Mit Hilfe von FRET-Experimenten wurde bereits gezeigt, dass epitheliale Natrium-Kanäle (ENaC) aus mehreren unterschiedlichen Kanaluntereinheiten aufgebaut sind (Staruschenko et al., 2004). Weiterhin konnte durch FRET-Messungen nachgewiesen werden, dass die CNG-Kanäle im Auge als auch die olfaktorischen CNG-Kanäle aus drei A-Kanaluntereinheiten und einer B-Kanaluntereinheit bestehen (Zheng et al., 2002; Zheng und Zagotta, 2004). Hohe FRET-Effizienzen konnten, wie erwartet, für alle homomultimeren Kombinationen von TRPV-Kanaluntereinheiten gemessen werden. Bei der Expression unterschiedlicher TRPV-Kanaluntereinheiten ergaben jedoch nur die heteromultimeren Kombinationen TRPV1 und TRPV2 sowie TRPV5 und TRPV6 FRET-Effizienzen, die mit den Signalen der entsprechenden homomultimeren Kanalkomplexe vergleichbar waren. Die Interaktion zwischen TRPV1 und TRPV2 konnte durch Immunpräzipitationsexperimente bestätigt werden. Die Westernblot-Analyse zeigte jedoch, dass mit TRPV2-FLAG deutlich mehr fluoreszierende TRPV2- als TRPV1-Untereinheiten immunpräzipitiert wurden, wenn beide fluoreszierenden Kanaluntereinheiten zu gleichen Teilen angeboten wurden. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Interaktion zwischen TRPV1 und TRPV2 gegenüber der Assemblierung zwischen den homomultimeren TRPV-Kanaluntereinheiten mit einer deutlich geringeren Effizienz geschieht. Weiterhin wäre es möglich, dass die heteromeren Kanalkomplexe aus drei TRPV2 und einer TRPV1-Untereinheit zusammengesetzt werden. Dies könnte durch ein Immunpräzipitationsexperiment mit TRPV2-Flag und einem Überangebot von TRPV1-YFP gegenüber TRPV2-YFP oder einem reziproken Immunpräzipitationsansatz mit TRPV1-FLAG und YFP-markierten TRPV1- und TRPV2-Untereinheiten näher untersucht werden. Da jedoch eine Expression von TRPV1 und TRPV2 in unterschiedlichen Geweben oder Zelltypen angegeben wird (Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998; Caterina et al., 1999; Birder et al., 2002), mag die schwache Interaktion zwischen TRPV1 und TRPV2 bzw. die Ausbildung von TRPV1/TRPV2-Kanalkomplexen ohne physiologische Relevanz sein. Die Kollokalisations- und FRET-Daten zu koexprimierten TRPV5- und TRPV6-Untereinheiten bestätigten klar deren Heteromultimerisierung, die bereits zuvor in Koimmunpräzipitationsuntersuchungen gezeigt werden konnte (Hoenderop et al., 2003).

Weiterhin wurde in einer anderen Arbeit eine Assemblierung von humanem TRPV1 und TRPV3 durch Koimmunpräzipitationsexperimente und funktionelle Untersuchungen gezeigt (Smith et al., 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wiesen jedoch weder die Kollokalisationsuntersuchungen, noch die FRET- und Koimmunpräzipitationsexperimente auf eine signifikante Interaktion zwischen TRPV1 und TRPV3 hin. Da bei beiden Arbeiten HEK293-Zellen als Expressionssystem verwendet wurden, müsste untersucht werden, ob beispielsweise Speziesunterschiede der verwendeten TRPV-Kanalotypen für diese widersprüchlichen Ergebnisse verantwortlich sein könnten. Weiterhin gilt es zu klären, ob zusätzliche Proteine zur Bildung von TRPV-Signalkomplexen und zur Interaktion unterschiedlicher TRPV-Kanaluntereinheiten notwendig sein könnten, die in heterologen Expressionssystemen nicht exprimiert werden. Die hier vorliegenden Untersuchungen zeigen in systematischer Weise, welche der TRPV-Kanaluntereinheiten durch intrinsische Proteineigenschaften zur Ausbildung homo- oder heterooligomerer Kanalkomplexe befähigt sind.

### ***5.2.3. Determinanten der Interaktion zwischen TRPV-Kanaluntereinheiten***

Die für die Assemblierung zugrunde liegenden Regeln und insbesondere die Proteindomänen, die eine spezifische Interaktion zwischen TRPV-Kanaluntereinheiten vermitteln, sind bislang noch nicht geklärt und werden zur Zeit von mehreren Arbeitsgruppen untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein signifikanter Beitrag des N-Terminus für die Assemblierung von TRPV4-Kanaluntereinheiten gezeigt werden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Daten, die eine spezifische Interaktion zwischen Ankyrin-homologen Domänen im N-Terminus von TRPV6 beschreiben (Erlor et al., 2004). Im Gegensatz zu TRPV4 vermittelt der N-Terminus von TRPV1 weder eine starke homophile Interaktion noch assoziiert er nachweisbar mit Wildtyp-TRPV1. Obwohl durch die hier vorgestellten Befunde die zuvor von García-Sanz et al. (2004) beschriebene homophile Interaktion zwischen den C-Termini von TRPV1-Kanaluntereinheiten bestätigt werden konnte, scheint deren Beitrag zur gesamten TRPV1-Kanalassemblierung nicht ausschlaggebend zu sein. Chimäre Kanalkonstrukte aus TRPV1 und TRPV4 wiesen eine Interaktion untereinander auf, auch wenn sie unterschiedliche N-Termini besaßen. So konnten beispielsweise bei Koexpression der Chimäre TRPV<sub>1.1.4</sub>-YFP mit den Kanalkonstrukten TRPV<sub>4.1.1</sub>-CFP oder TRPV<sub>4.1.4</sub>-CFP FRET-Effizienzen um 15 % beobachtet werden (siehe

Abb. 24). Weiterhin hatte der N-Terminus von TRPV1 keinen dominant-negativen Effekt auf die Funktion von Wildtyp-TRPV1. Im Gegenteil konnte durch die FRET-Daten mit den chimären TRPV-Kanalkonstrukten und den löslichen Termini von TRPV1 gezeigt werden, dass die TRPV1-Kanaluntereinheiten vorwiegend über Proteinanteile assemblieren, die sich im Bereich der Transmembransegmente 1-6 befinden. Ähnliche Ergebnisse wurden für den TRP-Kanal von *Drosophila melanogaster* veröffentlicht (Xu et al., 1997). Hier wurde eine Interaktion zwischen den Kanaluntereinheiten über deren Transmembransegmente und eine zusätzliche Stabilisierung über die N-Termini gezeigt. Zusammen mit den Daten von Chang et al. (2004), die eine Assemblierung von TRPV5 sowohl über dessen N- als auch C-Terminus darlegen, wird die Hypothese bestätigt, dass die TRPV-Kanalassemblierung über mehr als eine Interaktionsstelle erfolgt. Die cytosolischen Termini und die Transmembransegmente tragen anscheinend synergistisch zu der Gesamtaffinität zwischen den TRPV-Kanaluntereinheiten bei und kontrollieren die Selektivität der homo- und heteromeren Assemblierung zu funktionellen TRPV-Kanalkomplexen. Der relative Beitrag der cytosolischen und intermembranären Bindungsstellen zur Gesamtaffinität der Bindung zwischen den Untereinheiten weicht wahrscheinlich je nach TRPV-Kanalisoform voneinander ab. Dieser Befund scheint nicht unerwartet zu sein, denn es ist in Analogie zu P2X-Rezeptoren, epithelialen Na<sup>+</sup>-Kanälen und GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren (Torres et al., 1999; Bruns et al., 2003; Greenfield et al., 2002) wahrscheinlich, dass die Kanaluntereinheiten über die Poren-bildenden Bereiche wie die Transmembransegmente 5 und 6 sowie die Porenschleifen in nahen Kontakt kommen (Doyle et al., 1998; Roux und MacKinnon, 1999), um die geschlossene Porenkonformation des nativen Kanalkomplexes zu stabilisieren und im aktivierten Zustand die Integrität des Selektivitätsfilters zu gewährleisten. In bislang veröffentlichten Arbeiten über spannungsgesteuerte Kaliumkanäle, CNG- und HCN-Kanäle wurde die Assemblierung der Kanaluntereinheiten zu funktionellen Kanalkomplexen vorwiegend auf die Beteiligung der cytosolischen Proteindomänen hin untersucht (Li et al., 1994; Liu et al., 1996; Zhong et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass bei *Shaker*-Kaliumkanälen für die Bildung tetramerer Kanalkomplexe eine als T1-Domäne bezeichnete Region im hydrophilen N-Terminus benötigt wird (Li et al., 1992; Pfaffinger und DeRubeis, 1995; Kreusch et al., 1998). Für CNG- und HCN-Kanäle wurde eine Tetramerisierungsdomäne im cytosolischen C-Terminus lokalisiert (Zhong et al., 2002; Zagotta

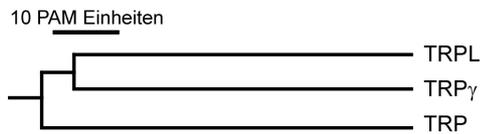
et al., 2003). Zusätzlich kann eine direkte Interaktion zwischen HCN1 und HCN2 auch über deren N-Termini vermittelt werden (Proenza et al., 2002). Hier scheint sich zu bestätigen, dass die Assemblierung von Kanaluntereinheiten hexahelikaler Kationenkanäle komplexer zu sein scheint. Weiterführende Arbeiten werden zeigen, welche Aminosäuremotive die Assemblierung von homomeren und heteromeren TRPV-Kanaluntereinheiten vermitteln und in welcher Wertigkeit sie bezüglich der spezifischen Interaktion zueinander stehen.

#### ***5.2.4. Phylogenetische Grundlagen der Heteromultimerisierung hexahelikaler Kationenkanäle***

Inwiefern kann zwischen einer zufälligen gegenüber einer evolutionär begünstigten oder notwendigen Aufrechterhaltung heteromerer Interaktionen zwischen Kanaluntereinheiten unterschieden werden? Während der Phylogenese stellt die Genduplikation einen Verzweigungspunkt dar, an dem zwei identische Proteine entstehen, die durch nachfolgende, individuell unterschiedliche Mutationen immer mehr voneinander abweichen. Bei einem bestimmten Abweichungsgrad geht entweder die Fähigkeit zur Heteromultimerisierung stochastisch verloren, oder die Interaktion zwischen den zwei unterschiedlichen Kanaluntereinheiten bleibt trotz fortgesetzter Aminosäureveränderungen durch Koevolution erhalten bzw. neue, aufeinander abgestimmte Bindungsstellen werden im Gegenzug geschaffen. Nur im letzteren Fall könnte eine erhaltene Fähigkeit zur Heteromer-Bildung trotz geringerer Aminosäureähnlichkeit erwartet werden. Obwohl theoretisch der Austausch von nur wenigen Aminosäuren ausreichen könnte, um die Interaktion zwischen Kanaluntereinheiten zu zerstören, erscheint vor dem Hintergrund des Konzeptes mehrerer kooperierender Assoziationsareale ein schrittweises Vorgehen bei der Schaffung von zwei voneinander unabhängig assemblierender Kationenkanalkomplexe wahrscheinlicher zu sein. Eine systematische Analyse der Homo- und Heteromultimerisierung wie sie im Rahmen dieser Arbeit für die Mitglieder der TRPV-Familie vorgenommen wurde, ist zuvor auch für die Familie der Säuger-TRPC-Kanäle durchgeführt worden (Hofmann et al., 2002). Weiterhin liegen für eine phylogenetische Betrachtung eine Vielzahl von Informationen über die homo- und heteromere Interaktionsfähigkeit von Kanaluntereinheiten weiterer hexahelikaler Kationenkanäle vor, wie z.B. über die im *Drosophila*-Auge exprimierten TRP-Kanäle und die CNG- und HCN-Kanäle.

Die TRPC-Familie kann in zwei Subgruppen unterteilt werden: TRPC1, TRPC4 und TRPC5 mit einer Aminosäure-Identität von 40-68 % und TRPC3, TRPC6 und TRPC7, die untereinander eine Aminosäure-Identität von 72-79 % aufweisen (Abb. D3B). Es konnte gezeigt werden, dass nur TRPC-Untereinheiten innerhalb einer Subfamilie zur Ausbildung von Heteromultimeren befähigt sind (Hofmann et al., 2002). Zwischen Untereinheiten verschiedener Subfamilien war keine signifikante Interaktion nachweisbar. Die Aminosäure-Identitäten zwischen Mitgliedern unterschiedlicher TRPC-Subfamilien liegen alle unter 32 %. In der Familie der TRPV-Kanäle konnten eine Heteromultimerisierung zwischen TRPV5 und TRPV6 mit einer Aminosäure-Identität von 73,9 % und eine Interaktion zwischen TRPV1 und TRPV2 mit einer Aminosäure-Identität von 42 % nachgewiesen werden (Abb. D3C). Innerhalb der TRPC- und TRPV-Familien von Säugetieren liegt die höchste Aminosäure-Identität zwischen nicht-interagierenden Kanaluntereinheiten bei 41,4 % für TRPV1 und TRPV4. Umgekehrt liegt die niedrigste Aminosäure-Identität von interagierenden Partnern bei 40,5 % für TRPC1 und TRPC4. Demnach könnte ein stochastischer Schwellenwert der phylogenetischen Divergenz, die zum Verlust einer Heteromultimerisierung zwischen TRPC- oder TRPV-Kanaluntereinheiten führt, eng definiert sein. Im Gegensatz zu den TRPV- und TRPC-Familien sind CNG-Kanalkomplexe aus A- und B-Kanaluntereinheiten aufgebaut (Weitz et al., 2002; Zheng et al., 2002). Da die Aminosäure-Identität zwischen interagierenden CNGA- und CNGB-Kanaluntereinheiten nur 22,3-25,6 % beträgt (Kaupp und Seifert, 2002), ist anzunehmen, dass hier eine Koevolution der Bindungsstellen stattgefunden hat (Abb. D4A). Auf der Grundlage heute zur Verfügung stehender Daten könnte innerhalb der TRP-Kanalfamilie für die Kanäle TRP, TRPL und TRPY von *Drosophila melanogaster* eine Koevolution stattgefunden haben, da diese bei einer Aminosäure-Identität von 37-38 % noch heteromere Kanalkomplexe bilden (Xu et al., 1997; Xu et al., 2000; Abb. D3A). Die *Drosophila* TRPs sind jedoch möglicherweise stärker als andere TRP-Kanäle über Scaffolding-Proteine wie das INAD („inactivation-no-afterpotential D“) in ihrer Assemblierungseigenschaften gesteuert (Huber et al., 1996; Shieh und Zhu, 1996; Xu et al., 1998; Goel et al., 2001). Die HCN-Kanalfamilie besteht aus vier unterschiedlichen Kanaluntereinheiten, HCN1-4, unter denen eine hohe Aminosäure-Identität von 57-64 % vorliegt (Abb. D4B). Interaktionen konnten zwischen fast allen HCN-Kanaluntereinheiten nachgewiesen werden (Much et al., 2003). Lediglich bei Koexpression von HCN2 und HCN3 konnte trotz

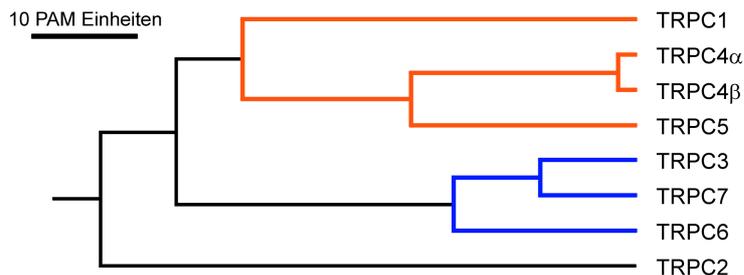
A



Aminosäure-Identität (%)

	TRPL	TRP $\gamma$
TRP	37,8	37,0
TRPL		37,9
TRP $\gamma$		

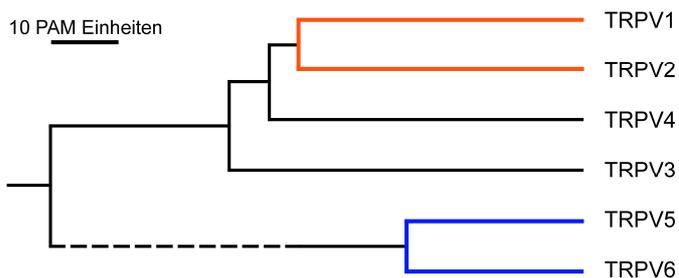
B



Aminosäure-Identität (%)

	TRPC2	TRPC3	TRPC4 $\alpha$	TRPC4 $\beta$	TRPC5	TRPC6	TRPC7
TRPC1	24,2	27,8	41,3	41,3	40,5	29,9	28,6
TRPC2		28,7	28,0	27,8	26,7	29,6	29,4
TRPC3			29,8	31,0	31,8	71,9	79,4
TRPC4 $\alpha$				99,7	64,0	29,0	31,8
TRPC4 $\beta$					68,3	30,8	31,7
TRPC5						27,0	31,2
TRPC6							73,3
TRPC7							

C

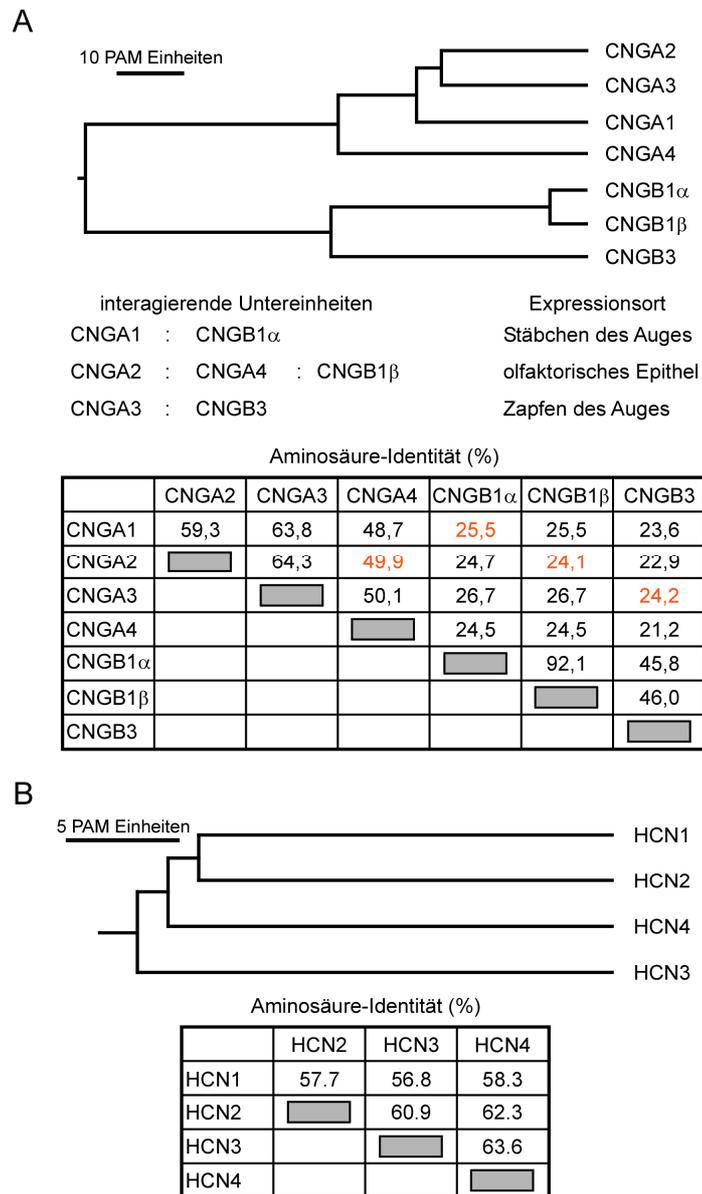


Aminosäure-Identität (%)

	TRPV2	TRPV3	TRPV4	TRPV5	TRPV6
TRPV1	42,0	36,3	41,4	22,5	23,0
TRPV2		32,1	39,0	18,7	20,8
TRPV3			36,2	20,0	20,8
TRPV4				23,9	23,4
TRPV5					73,9
TRPV6					

### Abbildung D3: Phylogenetische Stammbäume und Aminosäure-Identitäten der *Drosophila* TRP-, der TRPC- und der TRPV-Kanäle

Die Aminosäuresequenzen der *Drosophila* TRP-Kanäle (A), der einzelnen murinen Homologe der TRPC-Familie (B) sowie der TRPV-Kanäle aus der Ratte (C) wurden mit Hilfe des „Clustal“-Algorithmus verglichen und jeweils ein phylogenetischer Stammbaum erstellt sowie die Aminosäure-Identitäten zwischen den Vertretern der Kanalfamilie berechnet. Die horizontale Zweiglänge des Stammbaumes hat die Einheit „point accepted mutations“ (PAM) und kennzeichnet die durchschnittliche Anzahl von Punktmutationen pro 100 Aminosäureresten. Die Daten der untereinander interagierenden TRPC- und TRPV-Mitglieder sind farblich gekennzeichnet.



#### Abbildung D4: Phylogenetische Stammbäume und Aminosäure-Identitäten der CNG- und HCN-Kanäle

Der phylogenetische Stammbaum und die Aminosäure-Identitäten der CNG-Kanaluntereinheiten aus der Ratte bzw. bei CNGB3 aus der Maus (**A**) und der humanen HCN-Kanaluntereinheiten (**B**) wurden wie unter Abb. D3 beschrieben angefertigt. Weiterhin wurde aufgelistet welche Interaktionen zwischen unterschiedlichen CNG-Kanaluntereinheiten nachgewiesen werden konnten und in welchen Zellen bzw. Geweben diese Kanalkomplexe gefunden wurden. PAM: „point accepted mutation“, Prozentsatz der durchschnittlichen Punktmutationen.

hoher Aminosäure-Identität (61 %) keine heteromere Interaktion nachgewiesen werden. Da beide Kanäle sowohl Homomultimere als auch Heteromultimere mit anderen HCN-Kanaluntereinheiten bilden, könnte es hier zu zufälligen Mutationen gekommen sein, wobei kein Selektionsdruck vorherrschte.

Da die berechnete Aminosäure-Identität zwischen Kanaluntereinheiten bezogen auf die gesamte Aminosäuresequenz der Proteine noch längst nicht die lokale Ähnlichkeit und den Erhalt der einzelnen Bindungsflächen widerspiegelt, wird erst die genaue Eingrenzung der einzelnen für die Interaktion zwischen Kanaluntereinheiten verantwortlichen Bindungsdeterminanten und eine darauf aufbauende genauere Analyse zeigen können, inwiefern diese Hypothese der phylogenetisch zufälligen bzw. durch Koevolution gezielten Erhaltung der Heteromultimerisierung zutrifft.