

## 6. Zusammenfassung

### *TRPV1-induzierte intrazelluläre Ansäuerung*

Die Vanilloidrezeptor-verwandten „transient receptor potential“ (TRPV)-Kanäle gehören zu der Superfamilie der hexahelikalen Kationenkanäle und sind integrale Komponenten der Wärme- und Schmerz Wahrnehmung sowie der renalen und intestinalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Resorption. Der Vanilloid-Rezeptor TRPV1, ein in sensorischen Neuronen exprimierter, nicht-selektiver Kationenkanal, wird sowohl durch chemische als auch durch physikalische Reize aktiviert. Hierzu gehören Vanilloide wie z.B. Capsaicin und körpereigene vanilloidähnliche Stoffe sowie Hitze. Weiterhin verschiebt sich durch Bindung extrazellulärer Protonen die TRPV1-Aktivierung hin zu niedrigeren Temperaturen und Capsaicin-Konzentrationen. Eine Beteiligung von TRPV1 an der Regulation des intrazellulären pH war bislang noch nicht bekannt und wurde als ein Teilthema in der vorliegenden Arbeit untersucht.

1. Zur Identifikation TRPV1-transfizierter Zellen und gleichzeitigen Bestimmung des  $\text{pH}_i$  im heterologen Expressionssystem wurden fluoreszierende pH-Sensoren generiert, die aus intramolekular gekoppelten, differentiell pH-sensitiven GFP-Varianten CFP und YFP oder Citrine bestehen. Die CFP-YFP- und CFP-Citrine-Tandemproteine zeigten pH-abhängige Veränderungen ihrer Fluoreszenzintensitäten, die eine FRET-gestützte Kalibration der intrazellulären pH-Messungen erlauben. Das CFP-Citrine weist im Vergleich zum CFP-YFP Tandemprotein eine vernachlässigbare  $\text{Cl}^-$ -Sensitivität auf.
2. Bei neutralem  $\text{pH}_{\text{ext}}$ , konnte eine Capsaicin-vermittelte Ansäuerung als Folge eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms beobachtet werden. Mögliche  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Ansäuerungsmechanismen sind das direkte Verdrängen von Protonen aus  $\text{Ca}^{2+}$ -puffernden Proteinen, der  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Antiport über membranäre  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen und die Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  in Mitochondrien.
3. In azidem Extrazellulärmedium konnte eine direkte Permeation von Protonen durch die TRPV1-Pore nachgewiesen werden, was einen neuen Mechanismus darstellt. Bei fluometrischen pH-Messungen konnte in azider isotoner KCl-Lösung (ohne  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$ ) eine 30-fache Erhöhung der intrazellulären Protonenkonzentration nach TRPV1-Aktivierung beobachtet werden. Unter den gewählten extrazellulären Bedingungen lag nur für Protonen ein nach innen gerichteter elektrochemischer Gradient vor. Die in elektrophysiologischen Untersuchungen gezeigte Verschiebung des Umkehrpotentials bei Veränderung des  $\text{pH}_{\text{ext}}$

beweist einen durch Protonen getragenen Strom. Für TRPV1 konnten bei  $\text{pH}_{\text{ext}} 3,5-7,4$  sehr hohe relative Protonen-Permeabilitäten ( $P_{\text{H}^+} : P_{\text{Cs}^+} \sim 1000$ ) ermittelt werden, was darauf hinweist, dass Protonen wahrscheinlich über einen von Metallkationen abweichenden Permeationsmechanismus durch die TRPV1-Pore gelangen.

4. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die TRPV1-Pore permeabel für große organische Kationen ist. In elektrophysiologischen Messungen konnten NMDG<sup>+</sup>-, TEA<sup>+</sup>-, Histidin-, Bis-Tris- oder Bis-Tris-Propan-getragene Einwärtsströme beobachtet werden. Fluorometrische Experimente zeigten, dass große Kationen wie die fluoreszierenden Cl<sup>-</sup>-Indikatoren MEQ<sup>+</sup> und MQAE<sup>+</sup> (ca. 6-7 Å Moleküldurchmesser) auch in Anwesenheit extrazellulärer Metallkationen durch die TRPV1-Pore permeieren. Somit könnte die TRPV1-Pore groß genug sein, um eine Kette aus freien Wassermolekülen aufzubauen, die den extrazellulären und intrazellulären Raum verbinden. Ein möglicher Permeationsmechanismus könnte daher die Weitergabe der Protonen entlang der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Wassermolekülen innerhalb der TRPV1-Pore sein (Grotthuss-Mechanismus).
5. Sowohl die Ca<sup>2+</sup>-abhängige als auch die Ca<sup>2+</sup>-unabhängige intrazelluläre Azidifizierung konnte in frisch isolierten Neuronen aus Hinterwurzelganglien der Ratte nachgewiesen werden. Diese Daten weisen darauf hin, dass beide Mechanismen auch im nativen Zellsystem existieren. Weiterhin konnte in elektrophysiologischen Messungen an „cell-attached“-Membranflecken TRPV1-exprimierender HEK293-Zellen eine spannungsabhängige Blockierung von TRPV1 durch Erhöhung der intrazellulären Protonenkonzentration gezeigt werden.

#### *Selektivität und Promiskuität der TRPV-Multimerisierung*

In Analogie zu CNG- und spannungsabhängigen Kalium-Kanälen werden funktionelle TRPV-Kanalkomplexe durch eine Quartärstruktur aus vier Kanaluntereinheiten aufgebaut. Dies konnte bereits für TRPV1, TRPV5 und TRPV6 gezeigt werden. Da bislang keine systematischen Untersuchungen zur Ausbildung von TRPV-Homo- und Heteromultimeren vorlagen, sollte dies im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Folgende Befunde wurden erhoben:

1. Bei der Analyse der Assemblierung von unterschiedlichen TRPV-Untereinheiten zeigte sich, dass trotz phylogenetisch enger Verwandtschaft innerhalb der TRPV-Familie vorwiegend

Homomultimere ausgebildet werden. Heteromultimere konnten nur für TRPV5 und TRPV6, sowie zwischen TRPV1 und TRPV2 nachgewiesen werden. Kolokalisations-experimente mit CFP- bzw. YFP-markierten TRPV-Kanaluntereinheiten zeigten ein übereinstimmendes Verteilungsmuster der betreffenden Proteine. Eine direkte Interaktion der Kanaluntereinheiten konnte mittels FRET- und Koimmunpräzipitations-Experimenten nachgewiesen werden.

2. Um zu klären, welche Proteindomänen an der spezifischen Interaktion zwischen TRPV-Untereinheiten beteiligt sind, wurden FRET-Experimente und  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen mit N- bzw. C-terminal trunziertem TRPV1, den cytosolischen Termini von TRPV1 und TRPV4 als auch mit chimären TRPV1/TRPV4-Kanaluntereinheiten durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass die cytosolischen Termini als auch die Transmembransegmente synergistisch zu der Gesamtaffinität zwischen TRPV-Kanaluntereinheiten beitragen und die Selektivität der Homo- und Heteromultimerisierung von TRPV-Untereinheiten kontrollieren. Der Beitrag der cytoplasmatischen und intramembranären Interaktionsdomänen zu der Assemblierung scheint je nach TRPV-Isoform zu variieren. So wird die Interaktion der TRPV4-Kanaluntereinheiten insbesondere durch deren N-Terminus stabilisiert, während die TRPV1-Assemblierung vorwiegend über Determinanten in den Transmembransegmenten vermittelt wird.

## ***Summary***

### *TRPV1-induced intracellular acidification*

The vanilloid receptor-related transient receptor potential channels (TRPV) belong to the superfamily of hexahelical cation channels and are integral components of thermosensation, pain perception and  $\text{Ca}^{2+}$ -reabsorption in kidney and intestine. The vanilloid receptor (TRPV1), a poorly selective cation channel, is expressed in dorsal root ganglion (DRG) neurons and is regulated by diverse stimuli including capsaicin, endovanilloids and heat. Furthermore, extracellular acidification shifts the activation of TRPV1 towards lower temperatures or ligand thresholds by protonation of an amino acid located in the vicinity of the pore loop. Since a possible impact of TRPV1 activation on the intracellular pH was not known, this was investigated in this part of the study.

1. To combine the transfection marker and the pH-sensing system, we took advantage of the pH-sensitivity of yellow fluorescent protein and constructed expression plasmids encoding intramolecularly linked CFP-YFP or CFP-Citrine tandem proteins. The tandem proteins exhibited pH-dependent fluorescence intensities allowing FRET-based calibration of the intracellular pH in the range of pH 5.5-8.0. The CFP-Citrine tandem protein showed a negligible halide-sensitivity compared to the CFP-YFP tandem.
2. At neutral  $\text{pH}_{\text{ext}}$ , the capsaicin-induced intracellular acidification was strictly coupled to the  $\text{Ca}^{2+}$  influx component. Proposed  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent mechanisms leading to intracellular acidification include a displacement of protons from  $\text{Ca}^{2+}$ -buffering proteins, a  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{H}^+$  antiport by plasmalemmal  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases and  $\text{Ca}^{2+}$  uptake into mitochondria.
3. In acidic extracellular media, an as yet unrecognized direct proton permeation through the nonselective TRPV1-pore could be demonstrated. In TRPV1-expressing HEK293 cells kept in  $\text{Ca}^{2+}$ - and  $\text{Na}^+$ -free acidic KCl solutions, the addition of capsaicin or endovanilloids evoked a 30-fold increase in the intracellular proton concentration. Under these conditions, protons are the only charge carriers that experience a driving force to enter the cell upon TRPV1 stimulation. In electrophysiological recordings, a rightward-shift of the reversal potentials during stepwise reduction of the  $\text{pH}_{\text{ext}}$  reflects a current component that is carried by protons and/or hydrogenium ions. The high proton permeability determined for TRPV1 at  $\text{pH}_{\text{ext}}$  5.5-7.4 ( $P_{\text{H}^+} : P_{\text{Cs}^+} \sim 1000$ ) points to a proton entry mechanism through the TRPV1-

pore which is distinct from the permeation of metal ions.

4. Furthermore, permeation of large organic cations through the TRPV1-pore could be demonstrated. The electrophysiological data revealed that TRPV1-mediated cation currents can be carried by large organic cations such as NMDG<sup>+</sup>, TEA<sup>+</sup>, Bis-Tris or Bis-Tris-Propan in the absence of extracellular mono- or divalent metal ions. Taking advantage of the fluorescent cell-impermeant Cl<sup>-</sup> indicators MEQ<sup>+</sup> and MQAE<sup>+</sup>, a capsaicin-induced permeation of these large heterocyclic cationic dyes (~6-7 Å molecule diameter) into TRPV1-expressing HEK293 cells could be demonstrated. This permeation remained in the presence of physiological concentrations of Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>. Thus, these data support the model of an open TRPV1 pore that can hold enough free water molecules to form a continuous water wire connecting the extracellular space with the cytosol. The wide pore and the high proton permeability of TRPV1 point to a proton hopping permeation mechanism along adjacent water molecules of the water-filled channel pore (Grothuss mechanism).
5. Activation of TRPV1 both in the presence of extracellular Ca<sup>2+</sup> and in acidic Ca<sup>2+</sup>- and Na<sup>+</sup>-free acidic KCl solutions resulted in a marked intracellular acidification in freshly isolated nociceptive dorsal root ganglion (DRG) neurons. These data indicate that both acidification mechanisms also exist in the native cellular context of nociceptive neurons. Furthermore, the intracellular acidification caused a voltage-dependent block of TRPV1 in cell-attached patches.

#### *Selectivity and promiscuity of homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits*

Like voltage-gated K<sup>+</sup> channels and cyclic nucleotide-gated channels, functional channel complexes are believed to be composed of tetrameric TRPV proteins as recently shown for TRPV1, TRPV5 and TRPV6. A systematic and combinatorial analysis of TRPV homo- and heterooligomerization was lacking so far. Therefore, the aim of this part of the study was to evaluate the selectivity and promiscuity of homo- and heteromultimerization between TRPV channel subunits in living cells.

1. To analyze the assembly of TRPV subunits in living cells, fluorescent fusion proteins or FLAG-tagged TRPV channel subunits were generated. The interaction between TRPV subunits was assessed by analysis of the subcellular colocalization, fluorescence resonance

energy transfer and coimmunoprecipitation. The results point to a restricted promiscuity of heteromeric TRPV channel assembly. Besides heteromers between TRPV5 and TRPV6 or between TRPV1 and TRPV2, TRPV channel subunits preferentially assemble into homomeric complexes.

2. To explore which protein domains contribute to the specific interaction between TRPV channel subunits, quantitative FRET analyses and  $\text{Ca}^{2+}$  imaging experiments with truncated TRPV1 subunits, cytosolic termini of TRPV1 or TRPV4 and chimeric TRPV channel subunits were performed. The data revealed that the specificity and the affinity of the subunit interaction may be synergistically provided by interaction modules located in the cytosolic termini and in the transmembrane domains. The relative contribution of the interaction modules to the overall affinity and the specificity of TRPV channel assembly seems to vary for each TRPV isoform. The interaction between TRPV4 channel subunits is mainly stabilized by interaction determinants located in the cytosolic N terminus, whereas the TRPV1 assembly is predominantly conferred by determinants located within the transmembrane domain.