

Aus der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin am Campus
Benjamin Franklin der Medizinischen Fakultät Charité –
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Modulation des TRPV1 Kanals durch das Adapterprotein
ARMS

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christian Kasper
aus Wolfen

Datum der Promotion: 16.06.2018

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	4
Zusammenfassung	6
Abstract	7
1. Einleitung.....	8
1.1. Schmerz	8
1.2. TRP-Familie und TRPV1	8
1.2.1. Modulation und Interaktion von TRPV1	10
1.2.2. Die Rolle von TRPV1 im Entzündungsgeschehen	11
1.2.3. TRPV1 als pharmakologisches Target.....	12
1.3. TRPA1 als weiterer Vertreter der Thermo-TRPs	13
1.4. KIDINS220/ARMS	14
1.4.1. ARMS in der neuronalen und kardiovaskulären Entwicklung	15
1.4.2. ARMS in der Rolle des Adapterproteins.....	15
1.5. Ziel der Dissertation	17
2. Material und Methoden	18
2.1.1. Chemikalien	18
2.1.2. Medien und Pufferlösungen	19
2.1.3. Primär- und Sekundärantikörper	19
2.1.4. Geräte	20
2.1.5. Software	20
2.2. Zellkultur.....	20
2.3. Transfektion.....	21
2.4. Immunzytochemie	22
2.5. Kalzium-Imaging.....	23
2.6. Cellomics Arrayscan.....	24
2.7. Patch-Clamp.....	26

2.8. Statistik.....	27
3. Ergebnisse.....	28
3.1. Koexpressionsrate von TRPV1 und ARMS in transfizierten HEK293 Zellen.....	28
3.2. Erhöhte TRPV1 Aktivität in Anwesenheit von ARMS bei niedrigen Capsaicinkonzentrationen.....	29
3.3. Einfluss von Proteinkinasen auf die Aktivität von TRPV1 in Anwesenheit von ARMS.....	31
3.4. Elektrophysiologie.....	33
3.5. Kombination von Immunzytochemie und Kalzium-Imaging.....	34
3.5.1. Population von schwach TRPV1-exprimierenden Zellen.....	35
3.5.2. Einfluss der PKA auf TRPV1 in Anwesenheit von ARMS.....	36
3.6. Senföl-induzierte TRPA1 Aktivität in Anwesenheit von ARMS.....	38
4. Diskussion.....	39
4.1. TRPV1 wird durch die Koexpression von ARMS moduliert.....	39
4.1.1. Koexpression von TRPV1 und ARMS in einem heterologen System.....	39
4.1.2. Die Anwesenheit von ARMS sensitiviert TRPV1.....	40
4.1.3. Kein Unterschied in der Capsaicin-induzierten Tachyphylaxie.....	42
4.1.4. Ursache der ARMS vermittelten Sensitivierung von TRPV1.....	43
4.2. TRPV1 Funktionalität verbunden mit der Proteinexpression der Zelle.....	44
4.2.1. Funktionelle Unterschiede abhängig von der TRPV1 Expression.....	44
4.2.2. Stimulierung der PKA.....	46
4.3. Die Interaktion mit ARMS ist nicht TRP-spezifisch.....	47
4.4. Klinische Relevanz und Ausblick auf zukünftige Forschung.....	48
5. Literaturverzeichnis.....	50
Eidesstattliche Versicherung.....	59
Lebenslauf.....	61
Publikationsliste.....	62
Danksagung.....	63

Abkürzungen

AKAP150	A Kinase Anchoring Protein 150
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionic Acid
ARMS	Ankyrin-repeat rich Membrane spanning Protein
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin abhängige Kinase II
CHO	Chinese Hamster Ovary
CRK	Chicken Tumor Virus Number 10 Regulator of Kinase
CrkL	CRK-like Protein
DRG	Dorsal Root Ganglion
GABA	Gamma-Aminobutyric Acid
GABARAP	GABA-A Rezeptor assoziiertes Protein
GnTI	N-Acetylglucosaminyltransferase I
HEK	Human embryonic Kidney
Kidins220	Kinase D-interacting Substrate of 220 kDa
Kv β 2	Untereinheit Beta2 des spannungsabhängigen K ⁺ -Kanals
MAP	Mitogen-activated Protein
NGF	Nerve Growth Factor
PGE ₂	Prostaglandin E2
PI3	Phosphoinositid-3
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
Pirt	Phosphoinositid interagierender Regulator von TRP
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKD	Proteinkinase D
PKI	Protein Kinase Inhibitor Peptid
PP2B	Calcineurin/Protein Phosphatase 2B

Trk	Tropomyosin Receptor Kinase
TRP	Transient Receptor Potential
TRPA	TRP ankyrin
TRPC	TRP canonical
TRPM	TRP melastin
TRPML	TRP mucolipin
TRPN	TRP no mechanoreceptor potential C
TRPP	TRP polycystin
TRPV	TRP vanilloid
TZR	T-Zell-Rezeptor

Zusammenfassung

Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) ist ein nichtselektiver Kationenkanal aus der Familie der „transient receptor potential (TRP)“ Kanäle, der durch den scharfen Inhaltsstoff der Chilischote, Capsaicin, aktiviert wird. Die Modulation des TRPV1 erfolgt durch verschiedene Mechanismen und Interaktionsproteine. Die Sensitivierung wird durch die Bildung von Signalkomplexen mit Hilfe von Adapterproteinen unterstützt, die die Effektor- und Zielmoleküle in eine enge räumliche Nähe bringen. Dies ermöglicht eine schnelle und akkurate Signaltransmission. Das *Ankyrin-repeat rich membrane spanning protein* (ARMS) bietet vielfältige Protein-Protein-Interaktionsmotive und konnte bereits in verschiedenen Signalwegen als ein Adapterprotein ausgemacht werden. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob ARMS mit TRPV1 funktionell interagiert und dessen Funktion moduliert. Ebenso wurde untersucht, ob die Ergebnisse auf einen weiteren Vertreter der TRP Familie, den *transient receptor potential ankyrin 1* (TRPA1) übertragbar sind.

Um die Fragestellungen zu bearbeiten, wurden humane embryonale Nierenzellen (HEK293-Zellen) transient mit TRPV1 oder TRPV1/ARMS transfiziert und die Capsaicin-induzierte TRPV1-Aktivität mittels „Kalzium-Imaging“ und „Patch-Clamp“ Experimenten, sowie einer Kombination aus Kalzium-Imaging mit anschließender Immunzytochemie untersucht. Analog wurden HEK293-Zellen mit TRPA1 oder TRPA1/ARMS transfiziert und die Senföl-induzierte TRPA1-Aktivität mittels Kalzium-Imaging untersucht.

Die Ko-Expression von ARMS und TRPV1 in HEK293 Zellen führte zu einer Proteinkinase A-abhängigen Sensitivierung des TRPV1 Kanals gegenüber Capsaicin. Die Inhibierung der Proteinkinase C resultierte in einer ARMS-unabhängigen Desensitivierung des TRPV1. Im Gegensatz dazu führte eine Ko-Expression von ARMS und TRPA1 zu keiner Sensitivierung des TRPA1 Kanals gegenüber Senföl.

In dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass ARMS als ein weiteres Adapterprotein Proteinkinase A-abhängig mit TRPV1 funktionell interagiert.

Abstract

Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) is a nonselective cation channel of the TRP channel family and is highly sensitive to capsaicin, the pungent ingredient of chili peppers. The activity of TRPV1 can be modulated by numerous signaling pathways and proteins. The sensitization of TRPV1 is promoted by the composition of signaling complexes, which involves the presence of adaptor proteins. Adaptor proteins recruit effector and target molecules into a close spatial proximity to insure a fast and accurate signal transmission. The ankyrin-repeat rich membrane spanning protein (ARMS) provides manifold protein-protein interaction motifs and it was detected in different signaling pathways as an adaptor protein. In this study I examined whether ARMS is part of the TRPV1 signaling complex, interacts with TRPV1 and modulates its function. Similarly, I examined whether the results could be transferred to another member of the TRP family, namely transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1).

To address this question I measured the capsaicin-induced cell response in TRPV1- and TRPV1/ARMS-transfected human embryonic kidney (HEK)-293 cells using calcium imaging, patch clamp experiments and a combined calcium imaging/immunocytochemistry approach. Analogously, I measured the mustard oil-induced cell response in TRPA1- and TRPA1/ARMS-transfected HEK-293 cells using calcium imaging experiments.

Results showed that co-transfection of ARMS and TRPV1 induced TRPV1 channel sensitization in a protein kinase A dependent manner. The inhibition of protein kinase C resulted in an ARMS-independent desensitization of TRPV1. In contrast, the co-transfection of ARMS and TRPA1 did not lead to a sensitization of the TRPA1 channel towards mustard oil.

Therefore, ARMS could function as an adaptor protein modulating TRPV1 activity, partly mediated via protein kinase A.

1. Einleitung

1.1. Schmerz

„Ein unangenehmes Sinnes- oder Gefühlserlebnis, das mit tatsächlicher oder potenzieller Gewebeschädigung einhergeht oder mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird“, lautet die aktuell gültige Definition von Schmerz der *International Association for the Study of Pain* [1]. Unter physiologischen Umständen soll Schmerz schützend sein und eine weitere Gewebeschädigung verhindern. Der neuronale Prozess der Kodierung schädlicher Reize wird als Nozizeption bezeichnet [1]. Die eingehenden Signale werden über periphere Neuronen in das zentrale Nervensystem weitergeleitet und im Gehirn verarbeitet. Damit es jedoch zur Erkennung von potenziell gewebeschädigenden Reizen kommen kann, bedarf es spezieller Rezeptoren. Einige Vertreter der *transient receptor potential* (TRP)-Familie sind in der Lage solche Reize zu detektieren. In meiner Arbeit gehe ich auf zwei Rezeptoren dieser Familie ein und untersuche deren Funktion im Zusammenspiel mit dem Adaptorprotein *Ankyrin-repeat rich membrane spanning protein* (ARMS).

1.2. TRP-Familie und TRPV1

Die TRP-Familie ist eine heterogene Gruppe von Membranproteinen, die aus 28 bisher bekannten Kationenkanälen mit verschiedenen physiologischen Funktionen besteht [2]. Der Name stammt von Sequenzähnlichkeiten zum ursprünglichen *trp*-Gen der *Drosophila melanogaster* Fliege.

Die TRP Familie lässt sich anhand bestimmter Strukturmerkmale in 7 Untergruppen einteilen: TRPC ("Canonical"), TRPM ("Melastatin"), TRPV ("Vanilloid"), TRPA ("Ankyrin"), TRPML ("Mucolipin"), TRPP ("Polycystin") und TRPN ("No Mechanoreceptor Potential C") [3], [4].

Eine weitere Einteilung ist auch anhand der Fähigkeit, Temperaturen zu detektieren möglich. So sind von den insgesamt 28 TRP-Kanälen 10 Kanäle thermosensitiv. Sieben von diesen Kanälen (TRPV1-4, TRPM8, TRPA1, TRPC5) werden *in vivo* im sensorischen System beziehungsweise in der Haut exprimiert und fungieren als Thermosensoren. Aus diesem Grund werden diese auch als "Thermo-TRPs" bezeichnet [3], [4].

TRPV1 war der erste TRP-Kanal, der als ein solcher Thermosensor identifiziert wurde [5]. TRPV1 ist im peripheren Nervensystem in Neuronen exprimiert, deren Zellkörper sich in den Spinalganglien befinden und die überwiegend einen kleinen bis mittleren Durchmesser aufweisen [5]. Diese Neurone werden zu den C- und A δ -Fasern gezählt [6]. Des Weiteren wurden TRPV1 Kanäle im Zentralnervensystem (unter anderem im *Tractus solitarius*, der *Area postrema* und dem *Ganglion nodosum* [6]) und in einigen nicht neuronalen Geweben (z.B. in Keratinozyten der menschlichen Haut [7], Magenepithelzellen [8], pankreatischen Inselzellen [9] und Urothelzellen der Blase [10]) nachgewiesen.

Bei TRPV1 handelt es sich um einen nichtselektiven Kationenkanal, der bevorzugt für divalente Kationen durchlässig ist ($\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Na}^+ = \text{K}^+ = \text{Cs}^+$) [5]. Der Ionenkanal wird durch verschiedene Stimuli aktiviert. Darunter zählen Temperaturen über 42 °C, Capsaicin und Protonen [5], [6]. Protonen aktivieren den TRPV1 nicht nur, sondern sensitivieren ihn auch gegenüber anderen Liganden [5], [6], [11]. In einem TRPV1 Knock-out Maus Modell von Caterina und Kollegen konnte nachgewiesen werden, dass es zu einer deutlichen Einschränkung in der durch Hitze, Protonen und Capsaicin ausgelösten Schmerzempfindung kommt [12], [13]. Neben diesen klassischen Aktivatoren gibt es noch weitere Substanzen wie z.B. Ethanol [14], Quallen- [15] und Spinnengift [16] sowie verschiedene endogene Moleküle wie Anandamide [17] und Lipoxigenase Produkte [18], die zur Aktivierung des TRPV1 führen.

Bisher konnte von TRPV1 Kanälen noch keine Kristallstrukturanalyse durchgeführt werden, jedoch ist es Liao und Kollegen gelungen, mittels Elektronen-Kryo-Mikroskopie die Struktur von TRPV1 mit einer Auflösung von 3,4 Ångström zu analysieren. Dazu erfolgte die Untersuchung von exprimierten TRPV1 in einer stabilen HEK293 (GnTI) Zelllinie [19].

TRPV1 weist in Analogie zu anderen TRP Kanälen sechs Transmembran Segmente (S1-S6) sowie einen intrazellulären N- und C-Terminus auf. Der N-Terminus enthält eine Prolin-reiche Region sowie eine *Ankyrin Repeat* Domäne (ARD). Der C-Terminus weist ebenfalls mehrere Domänen zur Interaktion mit modulatorischen Faktoren auf [5], [20]–[22].

Der TRPV1 Kanal funktioniert als Tetramer aus vier homologen TRPV1 Monomeren. Die Transmembran Segmente 5 und 6 (S5-S6) bilden eine Pore, durch die die Ionen

nach Aktivierung des Kanals in die Zelle gelangen [23], [24]. Während der Applikation eines Agonisten kommt es im Verlauf zur Abschwächung der Reizantwort, was als Desensitivierung beschrieben wird. Wiederholt man die Applikation des gleichen Agonisten, fallen die folgenden Reizantworten jeweils schwächer als die vorhergehenden aus (Tachyphylaxie). Das wurde sowohl in transfizierten CHO ("Chinese Hamster Ovary") Zellen als auch in Neuronen der Spinalganglien (DRG-Zellen) nachgewiesen [25], [26]. Erstmals wurde in TRPV1 transfizierten HEK293 Zellen bzw. Oozyten von *Xenopus laevis* nachgewiesen, dass die Capsaicin- und Protonen-induzierte Desensitivierung Kalzium-abhängig sind, während die Hitze-induzierte Desensitivierung unabhängig von extrazellulärem Kalzium auftritt [6].

1.2.1. Modulation und Interaktion von TRPV1

Verschiedene Mechanismen modulieren die Aktivität des TRPV1 Kanals. Dazu zählt unter anderem die Phosphorylierung des TRPV1 durch Kinasen wie Proteinkinase A (PKA) [26], Proteinkinase C (PKC) [27], Tyrosinkinase Src [28] und Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII) [29]. Aber auch Phospholipide wie Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) [30], [31] und Phosphatasen wie Calcineurin/Protein Phosphatase 2B (PP2B) [32] modulieren den TRPV1 Kanal.

Wird TRPV1 aktiviert, führt das zu einem Kalziumeinstrom in die Zelle. Dadurch wird PP2B aktiviert und dephosphoryliert als Folge verschiedene Residuen von TRPV1. Es kommt zur Desensitivierung des TRPV1 Kanals, was in transfizierten sowie DRG Zellen nachgewiesen werden konnte [29], [32], [33].

Die Aktivierung der PKA verursacht eine direkte Phosphorylierung von TRPV1, was zur Reduzierung der Desensitivierung (d.h. zu einer Sensitivierung) in TRPV1 transfizierten HEK293 Zellen führt [26]. Die PKC sensitiviert TRPV1 ebenfalls durch Phosphorylierung, wodurch es zu einer Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals in DRG Zellen kommt [34]. Die PKA- sowie PKC-vermittelte Phosphorylierung von TRPV1 wird in DRG Zellen durch das Protein *A Kinase Anchoring Protein 150* (AKAP150) funktional reguliert [35]–[37].

Die CaMKII führt in DRG Zellen durch eine Phosphorylierung des TRPV1 ebenfalls zu einer Erholung der Desensitivierung (d.h. Sensitivierung) des Kanals [29]. Ebenso

wurde in DRG Zellen erhoben, dass die Tyrosinkinase Src TRPV1 phosphoryliert, wodurch es zu einem exozytotisch regulierten Einbau von TRPV1 Monomeren in die Zellmembran kommt. Die Monomere bilden dann als Tetramere funktionsfähige TRPV1 Kanäle [28], [38], [39].

PIP₂ spielt ebenfalls in der Modulation von TRPV1 eine Rolle. Ob PIP₂ inhibierend, sensitivierend oder abhängig von weiteren Faktoren sowohl inhibierend als auch sensitivierend ist, wird kontrovers diskutiert. Der Wirkmechanismus ist Gegenstand aktueller Forschung und soll hier nur kurz skizziert werden. Einige Studien haben in transfizierten HEK293 sowie nativen DRG Zellen gezeigt, dass PIP₂ die Erholung von der Desensitivierung der TRPV1 Kanäle fördert [40], [41] und die Capsaicin-vermittelte TRPV1 Aktivität potenziert [31], [42]. Eine Studie an TRPV1 transfizierten HEK293 Zellen von Senning und Kollegen hingegen zeigte, dass der Effekt von PIP₂ von der Lage in der Zellmembran abhängig ist. PIP₂ führt in der intrazellulären Schicht der Zellmembran zur Potenzierung der TRPV1 Aktivität, wohingegen es in der extrazellulären Schicht zu einer Inhibierung führt [43]. Der inhibierende Effekt von PIP₂ auf TRPV1 wurde erstmals von Chuang und Kollegen in TRPV1 transfizierten HEK293 Zellen bzw. Oozyten von *Xenopus laevis* beschrieben [30].

TRPV1 interagiert auch direkt mit Proteinen. Darunter zählen unter anderem Vesikelproteine (Snapin und Synaptotagmin IX), Zytoskelettproteine (Tubulin), Mediatorproteine zwischen Zytoskelett und Neurotransmittern (GABA-A Rezeptor assoziiertes Protein), Membranproteine (*Phosphoinositid interagierender Regulator von TRP* (Pirt)) sowie Bestandteile von Ionenkanälen (Kvβ2) [44]–[48].

1.2.2. Die Rolle von TRPV1 im Entzündungsgeschehen

Während einer Gewebeerletzung, metabolischem Stress oder einer Entzündung sind Nozizeptoren durch eine Art "Inflammatorische Suppe" aus verschiedenen Entzündungsstoffen umgeben. Entzündungsstoffe wie Bradykinin, Prostaglandin E2 (PGE2) und der Nervenwachstumsfaktor (NGF) werden während eines solchen Prozesses freigesetzt. Diese Stoffe verstärken die Antwort von Nozizeptoren auf Stimuli und erhöhen dadurch gleichzeitig die Schmerzintensität. Dieses Phänomen wird Hyperalgesie genannt.

Wie wirken jedoch die einzelnen Entzündungsstoffe auf den TRPV1 Kanal? Bradykinin bindet an die Gq-gekoppelten Bradykinin-1 und -2 Rezeptoren und aktiviert dadurch die PKC ϵ , die TRPV1 phosphoryliert und sensitiviert [30], [49]–[52]. PGE2 aktiviert den Gs-gekoppelten Prostaglandin E Rezeptor 4, der die PKA vermittelte Phosphorylierung von TRPV1 einleitet [26], [53]. NGF bindet am *tropomyosin receptor kinase A* (TrkA) Rezeptor, wodurch die Kinasen Phosphoinositid-3 (PI3) und Src aktiviert werden. Dies führt nicht nur zu einem Vesikeltransport von TRPV1 Monomeren zur Zellmembran, sondern auch zu einer gesteigerten Proteinbiosynthese von TRPV1. Ebenfalls wird ein kleiner Teil der NGF vermittelten TRPV1 Sensitivierung über die Aktivierung der PKC ϵ beschrieben [30], [31], [38], [44], [54]–[56].

1.2.3. TRPV1 als pharmakologisches Target

Die meisten der derzeitig verfügbaren starken Analgetika (Opiate) zielen darauf ab, die Nozizeption im Zentralnervensystem zu beeinflussen. Der TRPV1 Kanal könnte ein Ziel darstellen, durch dessen Inhibierung die Schmerzentstehung direkt am Ort einer peripheren Gewebeerletzung unterbunden wird.

Bisherige Befunde weisen darauf hin, dass auch Opiate und Cannabinoide auf die Schmerzentstehung durch indirekte Modulation des TRPV1 Kanals wirken können. Opiate wirken über die Modulation der PKA auf TRPV1, indem die Phosphorylierung durch die PKA und somit die Sensitivierung von TRPV1 unterbunden wird [57], [58]. Synthetische Cannabinoide wirken nicht nur über die Modulation der PKA und PKC, sondern auch durch die Aktivierung von Calcineurin inhibierend auf TRPV1 [59], [60].

Aktuell gibt es noch keinen in der Humanmedizin zugelassenen, direkt auf den TRPV1 Kanal gerichteten Antagonisten. Der Einsatz des Agonisten Capsaicin (als Salbe) hat bereits für einige Indikationen Einzug in die Medizin gefunden. Dazu zählen zum Beispiel die Anwendung im Rahmen neuropathischer Schmerzsyndrome wie der postherpetischen Neuralgie oder der HIV- Neuropathie [61]. Die Entwicklung von systemischen TRPV1 Modulatoren ist Gegenstand aktueller Forschung [62].

1.3. TRPA1 als weiterer Vertreter der Thermo-TRPs

Ein weiterer Vertreter der Thermo-TRP Kanäle ist der *transient receptor potential ankyrin 1* (TRPA1), der ebenfalls in meiner Arbeit untersucht wird. Der Kanal wurde 1999 in Fibroblasten isoliert und besitzt wie andere TRP Kanäle sechs Transmembrandomänen [63]. Erst später wurde TRPA1 als ein neuartiger Thermo-TRP Kanal identifiziert [64]. Er ist der einzige Vertreter aus der Familie der *transient receptor potential ankyrin* und ist wie TRPV1 ein nicht selektiver Kationenkanal, der durch verschiedene Stimuli wie Temperatur (15-17°C) [64], Kalziumionen [65], [66], Cannabinoide und Senföl [67] aktiviert wird. Ebenfalls aktivieren Industrie- und Umweltchemikalien [68]–[70] sowie Isocyanate und Bestandteile von Tränengas den TRPA1 [71].

TRPA1 wird wie TRPV1 in kleinen bis mittleren Neuronen der Spinalganglien exprimiert, wobei es in TRPA1-positiven Neuronen zu einer starken Koexpression (97%) mit TRPV1 kommt [64], [72]. In sensorischen Neuronen der Luftwege wirkt TRPA1 als einer der Hauptsensoren für chemische Reizmittel [73], [74]. TRPA1 wird ebenso wie TRPV1 auch in nicht neuronalem Gewebe exprimiert (z.B. Keratinozyten der Haut) [75]. TRPA1 verfügt über eine tetramere Anordnung mit einer dichten Transmembranregion. Im Unterschied zur Struktur anderer TRP Kanäle besitzt TRPA1 einen langen N-Terminus mit vielen Ankyrin-Repeats [64], [76]. Neben TRPV1 können auch andere Proteine mit TRPA1 interagieren. Dazu zählt zum Beispiel das Adapterprotein AKAP150 [77]. Des Weiteren ist ein Teil der TRPA1 Kanäle in Neuronen mit TrkA kolokalisiert [72].

1.4. KIDINS220/ARMS

Das Protein wurde ursprünglich von zwei Arbeitsgruppen parallel entdeckt. Iglesias und Kollegen identifizierten es als das erste physiologische Substrat der Proteinkinase D (PKD) mit einem Molekulargewicht von 220 kDa, weshalb sie es *kinase D-interacting substrate of 220 kDa* (Kidins220) nannten [78]. Kurz darauf und unabhängig davon berichteten Kong und Kollegen von einem Protein, welches ein nachgeschaltetes Ziel der Neurotrophin- und Ephrin-vermittelten Signalwege darstellt [79]. Wegen des charakteristischen Strukturmerkmals der multiplen Ankyrin-Repeats nannten sie es *Ankyrin-repeat rich membrane spanning protein* (ARMS). Im weiteren Verlauf der Arbeit wird für das Protein die Bezeichnung ARMS verwendet.

Beide Arbeitsgruppen erkannten in der Sequenzanalyse die vielfältigen Protein-Protein-Interaktionsmotive. Dazu zählen neben den namensgebenden, elf Ankyrin-Repeats des N-Terminus, die vier zentral im Molekül gelegenen Transmembran-Domänen. Am C-Terminus befinden sich eine "sterile alpha Motiv" (SAM)-Domäne, eine Prolin-reiche Region, ein Kinesin-Leichtketten interagierendes Motiv (KIM) und ein PSD95/SAP90, DLG und ZO1 (PDZ) -bindendes Motiv. Der C- und N-Terminus sind intrazellulär gelegen [78]–[80]. Bei der Untersuchung von Gen-Datenbanken zeigte sich, dass die ARMS Sequenz von Nematoden bis zum Menschen präsent und konserviert ist, was auf eine evolutionär erhaltene Funktion schließen lässt. Dabei ist der N-Terminus des Proteins artenübergreifend am stärksten konserviert [78], [79].

Initial wurde ARMS in neuronalem Gewebe nachgewiesen. Es wird in den Neuronen der Spinalganglien exprimiert, wobei ARMS eine geringere Expression in Neuronen mit einem großen Durchmesser zeigt [79]. Neben dem peripheren Nervensystem wird es auch in den Neuronen des Zentralnervensystems exprimiert, hier vor allem im Bulbus olfactorius, allen Regionen des Hippocampus, in Purkinjenzellen des Kleinhirns und der grauen Substanz des Rückenmarks [78], [79]. Es wurde davon ausgegangen, dass ARMS hauptsächlich in neuronalem Gewebe exprimiert wird. Erst später gab es Beweise dafür, dass ARMS auch in nicht neuronalem Gewebe wie im Herzen [81], [82] oder in T-Zellen [83] exprimiert wird. Innerhalb der Zelle ist ARMS zum Großteil in der Plasmamembran und perinukleär lokalisiert [78].

1.4.1. ARMS in der neuronalen und kardiovaskulären Entwicklung

Die ersten Versuche eine homologe ARMS Knock-out Maus zu generieren scheiterten, weil diese bereits *in utero* starben [84]. Das daraus entstandene heterologe ARMS+/- Mausmodell zeigte bei normaler Gehirnmorphologie eine 30-40 %ige Abnahme des ARMS Proteinlevels und brachte lebendige und fruchtbare Mäuse hervor [84]. Eine weitere Arbeitsgruppe schaffte es später jedoch ein homologes Knock-out Mausmodell zu generieren, wobei die Mäuse hier im perinatalen Zeitraum starben [81], [82].

Die Untersuchungen der ARMS Knock-out Mäuse zeigten eine verstärkte neuronale Apoptose im Gehirn und in den Spinalganglien, sowie eine vermehrte Fehlbildung des Herzens [81], [82], [84], wonach ARMS eine entscheidende Rolle in der Entwicklung des zentralen und peripheren Nervensystems sowie des kardiovaskulären Systems zugesprochen wurde. In den Neuronen ist ARMS wichtig für die Entwicklung und die Ausbildung der Polarität [85]. In der embryonalen Entwicklung ist der Grad der Expression von ARMS entscheidend. In der frühen Phase führt eine Überexpression von ARMS zu einer Behinderung der Entwicklung von hippocampalen Neuronen. In späteren Stadien kommt es zu keiner Beeinflussung der Entwicklung [85]. Bei einem Knockdown von ARMS kommt es zu einer Einschränkung in der Entwicklung der Neurite. Hier bilden sich multiple Axon-ähnliche Fortsätze aus [85]. Ebenfalls reguliert ARMS die Verzweigung der Dendriten [84]. ARMS kann mit Mikrotubuli-regulierenden Molekülen, die aktiv die neuronale Morphogenese regulieren, interagieren und diese modulieren [85].

1.4.2. ARMS in der Rolle des Adapterproteins

Adapterproteine können durch die Interaktion mit verschiedenen Proteinen bestimmte Signalwege anstoßen. Mit seinen vielzähligen Protein-Protein-Interaktionsmotiven bietet ARMS vielfältige Möglichkeiten, um mit verschiedensten Proteinen zu interagieren.

ARMS interagiert mit der Proteinkinase D (PKD) und wird auch von dieser direkt phosphoryliert [78]. Der Transport von ARMS in die Plasmamembran wird ebenfalls durch die PKD (-1 und -2) kontrolliert [86]. ARMS stellt des Weiteren ein wichtiges Verbindungsglied zwischen Zelloberflächenrezeptoren und intrazellulären Signalwegen dar. Wenn der Nervenwachstumsfaktor (NGF) an *tropomyosin receptor kinase A* (TrkA) bindet, kommt es durch Tyrosinkinase zur Phosphorylierung von ARMS [79]. TrkB ist

ebenfalls in der Lage nach Aktivierung durch *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), ARMS zu phosphorylieren [79]. Alle drei Rezeptoren der Trk Familie (TrkA, -B, -C) können ARMS an dessen Transmembrandomäne binden [87]. Neurotrophine sind in der Lage über Trk zu einer lang anhaltenden Aktivierung der *Mitogen-activated Protein* (MAP) Kinase zu führen. Dieser Prozess wird über die Interaktion von ARMS mit Trk vermittelt [87]. Wegen der Beteiligung in solchen Signalwegen, die für das Überleben der Zelle wichtig sind, wird ARMS als ein potentielles Onkogen betrachtet. In Melanomzellen konnte bereits gezeigt werden, dass ARMS die stressinduzierte Apoptose verhindert und zur Tumorprogression beiträgt [88], [89].

Ein weiteres Beispiel für ARMS als ein Adapterprotein ist die Interaktion mit der Untereinheit GluA1 des *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid* (AMPA) Rezeptors, wodurch die Aktivität von Neuronen moduliert werden kann [90]. ARMS ist ebenfalls in der Lage mit anderen Adapterproteinen wie mit dem *CRK-like Protein* (CrkL) zu interagieren. CrkL bindet dabei an die Prolin-reiche Region von ARMS [91]. ARMS vermittelt auch Proteininteraktionen im Immunsystem. Innerhalb der Plasmamembran bindet ARMS den T-Zell-Rezeptor (TZR) der ruhenden T-Zelle. Nach der Stimulation des TZR kommt es zu einer Trennung der TZR-ARMS Verbindung, die durch die Tyrosin Phosphorylierung von ARMS verursacht wird [87], [92].

1.5. Ziel der Dissertation

Initial gab es von Kong und Kollegen die Vermutung, dass ARMS als ein Ionenkanal beziehungsweise als dessen Untereinheit fungieren könnte, da die vier Transmembran-Domänen und die gesamte Struktur die Forscher stark an den TRPV1 Kanal erinnerten [79]. In der Folge zeigte sich ARMS jedoch als ein Adapterprotein, das mit verschiedenen anderen Proteinen wie zum Beispiel TrkA interagiert [79]. Für TRPV1 wurde bereits gezeigt, dass es mit Adapterproteinen interagiert und dass diese Interaktion Einfluss auf verschiedene Signalkaskaden im Rahmen der Aktivierung des TRPV1 Kanals hat.

Aufgrund dieser Hinweise untersuchte ich in dieser Arbeit, ob TRPV1 ebenfalls eine Interaktion mit einem weiteren Adapterprotein zeigt. Als möglicher Kandidat wurde das Adapterprotein ARMS gewählt. ARMS sowie TRPV1 werden beide überwiegend in neuronalem Gewebe, im speziellen in Neuronen mit mittleren bis kleinen Durchmesser, exprimiert [5], [79]. ARMS bietet viele Protein-Protein-Interaktionsmotive, so dass eine Interaktion zwischen beiden Proteinen möglich sein könnte.

In dieser Arbeit sollte dafür in einer transient transfizierten HEK Zelllinie die Capsaicin induzierte TRPV1 Aktivität in An- sowie Abwesenheit von ARMS mittels Patch Clamp Technik, Kalzium-Imaging sowie einer innovativen Kombination aus Kalzium-Imaging und anschließender Immunzytochemie gemessen werden.

Es wurde folgende Hypothese formuliert:

Die Koexpression von ARMS führt in der transfizierten Zelllinie zu einer Modulation der Capsaicin induzierten Aktivität des TRPV1 Kanals.

2. Material und Methoden

2.1.1. Chemikalien

Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DEU
Capsaicin	Sigma-Aldrich, Steinheim, DEU
Forskolin	Sigma-Aldrich, Steinheim, DEU
FuGene HD	Roche, Mannheim, DEU
Fura-2/AM	Invitrogen, Eugene, USA
GF109203X	Sigma-Aldrich, Steinheim, DEU
Glucose	Sigma-Aldrich, Steinheim, DEU
H-89	Sigma-Aldrich, Steinheim, DEU
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim, DEU
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DEU
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DEU
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DEU
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DEU
Mowiol 4-88	Calbiochem, Darmstadt, DEU
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, DEU
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DEU
Pluronic F-127	Invitrogen, Eugene, USA
Poly-L-Lysin	Sigma Aldrich, Steinheim, DEU

2.1.2. Medien und Pufferlösungen

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt, DEU
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DEU
Fetales Kälberserum (FBS)	Biochrom, Berlin, DEU
Penicillin(10000 U)/ Streptomycin (10000 µg/ml)	Biochrom, Berlin, DEU
Phosphate buffered saline (PBS); 0,1 M	Biochrom, Berlin, DEU
Blockpuffer:	2 % Esel- oder Ziegenserum, 1 % BSA, 0,1 % Triton X 100 in PBS
Kalzium-Imaging Puffer (CIB)	140 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM CaCl ₂ , 1 mM MgCl ₂ , 4,55 mM NaOH, 5 mM Glucose und 10 mM Hepes, pH 7,4
Extrazellulärlösung (ECS)	2 mM CaCl ₂ ; 10 mM Glucose; 10 Mm HEPES; 5 mM KCl; 2 mM MgCl ₂ ; 140 mM NaCl; eingestellt auf pH 7,4 mit NaOH
Fixierungslösung	4 % PFA in 0,1 M PB, pH 7,4
Fura-2/AM Lösung	50 µg Fura-2/AM gelöst in 10 µl Pluronic- Lösung und 50 µl DMSO
Intrazellulärlösung (ICS)	5 mM EGTA; 10 mM HEPES; 140 mM KCl; 2 mM MgCl ₂ ; eingestellt auf pH 7,4 mit KOH

2.1.3. Primär- und Sekundärantikörper

Anti-TRPV1 (Kaninchen) 1:1000	Alomone labs, Jerusalem, ISR
Anti-ARMS (Maus) 1:1000	GenWay Biotech, San Diego, USA
Alexa 488 anti-Kaninchen aus Esel 1:1000	Invitrogen, Eugene, USA
Alexa 555 anti-Maus aus Esel 1:1000	Invitrogen, Eugene, USA

2.1.4. Geräte

Axioskop2	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DEU
Cellomics Arrayscan VTI	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA
Eclipse TE 2000-S	Nikon Corporation; Tokyo, JPN
EPC-10, Seriennummer 520136-E	HEKA, Lambrecht, DEU
Micromanipulator 5171	Eppendorf, Hamburg, DEU
Micropipette Puller Model P-97	Sutter Instrument Co., Novato, USA
Till Imago CCD Kamera	TILL Photonics, Eugene, USA
Till Polychrome V	TILL Photonics, München, DEU
SF-77B Perfusion Fast-Step	Warner Instrument LLC, Hamden, USA

2.1.5. Software

AxioVision	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DEU
Graphpad Prism 5	Graphpad Software, San Diego, USA
ImageJ	National Institutes of Health, Bethesda, USA
Microsoft Excel 2007	Microsoft Corporation; Redmond, USA
Live Acquisition Software	TILL Photonics, Eugene, USA
Pulse-Software	HEKA, Lambrecht, DEU

2.2. Zellkultur

Für alle Experimente wurden humane embryonale Nierenzellen "Human Embryonic Kidney" (HEK) 293 Zellen verwendet. HEK 293 Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit DMEM in 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin in einem Inkubator bei 37 °C mit 5 % CO₂ Anteil kultiviert. Jeden zweiten bis dritten Tag erfolgte, abhängig von der Konfluenz der Zellen, die Teilung der Kultur 1:2 bis 1:5. Dabei wurden die Zellen durch

schnelles Pipettieren des Mediums von der Wand der Zellkulturflasche in DMEM abgelöst. 10 ml der Suspension wurden in ein 50 ml Zellkulturgefäß überführt und für 10 Minuten bei 400 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in frischem DMEM resuspendiert. Danach wurden die HEK293 Zellen in eine neue Zellkulturflasche überführt.

2.3. Transfektion

Durch eine Transfektion ist es möglich Fremd-DNA bzw. -RNA in eukaryotische Zellen einzubringen. Mittels Viren (biologisch), Mikroinjektion (physikalisch) oder Calciumphosphat (chemisch) gelangt die DNA in die Zelle. Allen Verfahren gemein ist, dass die Zellmembran durchdrungen werden muss. Man unterscheidet zwischen transienter (vorübergehender) oder stabiler (langfristiger) Transfektion. In meiner Arbeit wird die transiente Transfektion mittels des chemischen, nicht-liposomalen Agens FuGene HD (Roche) durchgeführt.

HEK293 Zellen wurden für die Patch Clamp Experimente auf Poly-D-Lysin-beschichtete Platten (Ø 34 mm) aufgetragen. Für die immunzytochemischen und Kalzium-Imaging Experimente wurden zusätzlich in den Platten enthaltene Glasplättchen (Ø 24 mm) verwendet, die auf einen Objektträger beziehungsweise in die Untersuchungskammer überführt werden konnten. Für die Kombination aus Kalzium-Imaging und Immunzytochemie wurden 384-well Platten verwendet. Die Zelldichte sollte bei den Experimenten circa $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ μ l betragen.

	1.	2.	3.	4.
TRPV1 (0,5 μ g)	X	X		
TRPA1 (0,5 μ g)			X	X
ARMS (0,5 μ g)		X		X

Tabelle 1: Schema der Transfektionskombinationen in HEK293 Zellen mit Plasmid-Mengenangabe in μ g.

Nach 24 Stunden wurden die Zellen nach dem in Tabelle 1 aufgezeigten Schema in vier Kombinationen transient transfiziert. FuGene HD wurde in einem Verhältnis von 1 μ g Plasmid-DNA zu 2 μ l FuGene HD verwendet. Als Plasmid Vektor wurde pcDNA 3.1 (Invitrogen) mit TRPV1-, TRPA1- und ARMS-DNA (jeweils aus Ratte) verwendet (freundlicherweise von Dr. Marian Brackmann, Charité Berlin zur Verfügung gestellt).

2.4. Immunzytochemie

Um den Erfolg der Transfektion sowie die Co-Expressionsrate in dem heterologen Zellsystem zu untersuchen, wurden immunzytochemische Färbungen durchgeführt. Dabei wurden die entsprechenden Proteine mittels spezifischer Primärantikörper detektiert. Diese wurden von Sekundärantikörpern, welche mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt waren, gebunden. Durch Anregen mit Licht der entsprechenden Wellenlänge konnten diese sichtbar gemacht werden. Um die Gesamtzellzahl zu ermitteln, wurden im Durchlichtmikroskop alle Zellen in einem bestimmten Gesichtsfeld gezählt. Danach wurde mittels entsprechender Filter die jeweilige Fluoreszenz der an den Primärantikörper gebundenen Sekundärantikörper gemessen.

HEK293 Zellen wurden wie in 2.3. beschrieben auf Glasplättchen (\varnothing 34 mm) aufgetragen und mit TRPV1/ARMS transfiziert, beziehungsweise als Kontrolle für die Spezifität der Primärantikörper untransfiziert belassen. 24 Stunden danach wurden die Zellen einmal mit *Phosphate buffered saline* (PBS) gewaschen und für 10 Minuten mit Formaldehyd (4 % PFA) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde für 30 Minuten Blockpuffer zu den Zellen gegeben. Anschließend wurden die Primärantikörper (Anti-ARMS p220 mouse 1:1000, Anti-TRPV1 poly V1 rabbit 1:1000) (gelöst in Blockpuffer) für 1 Stunde bei Raumtemperatur aufgetragen, dann 3 Mal alle 5 min in PBS gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit den Sekundärantikörpern (Anti-mouse 555 1:1000, Anti-rabbit 488 1:1000) in Blockpuffer inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS (3 Mal alle 5 min) wurden die Glasplättchen mit Mowiol versiegelt.

Die gefärbten HEK293 Zellen wurden mit dem Fluoreszenz Mikroskop Axioskop2 (Carl Zeiss AG) ausgewertet und die Bilder mithilfe der Software AxioVision (Carl Zeiss AG) aufgenommen. Jedes Bild enthielt zwei Kanäle für die Fluoreszenzfärbung, sowie einen Durchlicht- ("Bright-field") Kanal für die Zählung der Gesamtzellzahl.

In den untransfizierten HEK293 Zellen ergab sich auf die Inkubation mit Anti-ARMS und Anti-TRPV1 kein Fluoreszenzsignal. Ebenso ergab sich in ARMS- und TRPV1-transfizierten HEK293 Zellen, die nur mittels den Sekundärantikörpern Anti-mouse 555 und Anti-rabbit 488 inkubiert wurden, kein Fluoreszenzsignal, was für die Spezifität der eingesetzten Antikörper spricht.

Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der Software ImageJ (National Institutes of Health), wodurch die Pixelintensität der Fluoreszenzsignale gemessen werden konnte. Anhand des Durchlicht-Kanals wurde manuell eine Maske generiert, indem jede einzelne Zelle als "Region of Interest" markiert wurde. Die Maske enthielt somit alle Zellen und konnte auf die Farb-Kanäle übertragen werden. Dadurch war es möglich, Zellanzahl und Pixelintensität der einzelnen Kanäle zu bestimmen.

Für die Auswertung der Immunzytochemie wurde eine durch Brandao und Kollegen bereits etablierte Methode verwendet [93]. Es wurde für jede Färbung und jeden Primärantikörper 15 "Regions of interest" ausgewählt, die optisch kein positives Fluoreszenzsignal für das zu färbende Protein zeigten. Der Mittelwert aus deren Pixelintensität plus die 3-fache Standardabweichung lieferte den Grenzwert, ab dem eine Zelle als positiv für die entsprechende Färbung definiert wurde [94]. Durch die Wahl der 3-fachen Standardabweichung wurden 99,7 % aller Werte erfasst, wodurch weniger falsch positive Signale detektiert werden konnten. Die weitere Datenanalyse wurde mit Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation) und Graphpad Prism 5 (Graphpad Software) durchgeführt.

2.5. Kalzium-Imaging

Das Kalzium-Imaging ermöglicht es, die Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration einer Zelle darzustellen. Dazu bedarf es eines Indikators, welcher die Fähigkeit hat, an Kalziumionen zu binden und durch diese Bindung seine Fluoreszenzeigenschaften zu ändern. Ein etablierter Indikator ist Fura-2 Acetoxymethylester (Fura-2/AM; Invitrogen), welcher mit einer Wellenlänge von 340 nm und 380 nm angeregt werden kann und dessen Emission bei 510 nm gemessen wird. Die Experimente wurden mit HEK293 Zellen 18 bis 24 Stunden nach der Transfektion durchgeführt. Die Zellen wurden für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 2 μ M Fura-2/AM gelöst in Kalzium-Imaging Puffer (CIB, siehe 2.1.2) inkubiert. Die beladenen Zellen wurden nach zwei Waschschritten mit CIB in die Untersuchungskammer überführt und mit CIB umspült. Eine Messung dauerte 120 Sekunden. Die ersten 20 Sekunden stellten die Baseline dar. Nachdem die Baseline aufgenommen wurde, erfolgte je nach Transfektionschema die Applikation von verschiedenen

Konzentrationen von Capsaicin (1 pM, 100 pM, 500 pM, 1 nM, 20 nM, 100 nM, 200 nM, 1 µM, 3 µM) beziehungsweise Senföl (0,1 µM, 1 µM, 2,5 µM, 5 µM, 10 µM, 30 µM).

Als Positivkontrolle für vitale und TRPV1-, beziehungsweise TRPA1-exprimierende Zellen wurde ein Stimulus mit einer hohen Konzentration von Capsaicin (3 µM) beziehungsweise Senföl (30 µM) für 20 Sekunden vor dem Ende der Messung gesetzt. Zur Inhibierung der PKA wurden die Zellen vor dem Experiment mit H-89 (10 µM) für 20 Minuten behandelt. Analog wurden die Zellen zur Inhibierung der PKC mit GF109203X (1 µM) für 20 Minuten behandelt.

Es wurde ein Inversionsmikroskop (Eclipse TE 2000-S, Nikon Corporation) mit einem 20-fach Objektiv verwendet. Die Fluoreszenz der Zellen wurde mit einer Till Imago CCD Kamera (TILL Photonics) abwechselnd bei einer Exstinktion von 340 nm und 380 nm (Monochromator, Till Polychrome V, TILL Photonics) erfasst. Bilder wurden jede Sekunde aufgenommen und mit 12 bits digitalisiert. Die Analyse der aufgenommenen Bilder wurde an einem Computer mit der Live Acquisition Software (TILL Photonics) durchgeführt, welche aus den hintergrundbereinigten 340 nm und 380 nm Bildern ein Verhältnis berechnete. Die Resultate wurden exportiert und mit Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation) analysiert.

Als Responder wurden Zellen definiert, deren Baseline-Verhältnis nicht über beziehungsweise unter 10 % des Baseline-Durchschnitts schwankte. Ein weiteres Kriterium war, dass die Zellen auf die Positivkontrolle ab Zeitpunkt 80 einen 100 % Anstieg zum Baseline-Durchschnitt, sowie ein F340/F380 Verhältnis von mindestens 1,0 zeigten [94].

2.6. Cellomics Arrayscan

Der Cellomics Arrayscan VTI (Thermo Fisher Scientific Inc) ermöglicht eine Kombination aus Kalzium-Imaging und anschließender Immunzytochemie, um gleichzeitig die Proteinexpression zu bestimmen.

Hierfür wurden 384-well Platten verwendet, in denen 24 Stunden vor dem Experiment TRPV1/ARMS transfizierte HEK293 Zellen aufgetragen wurden. Zum Laden der Zellen wurde Fura-2/AM (0,25 µg) zu einem 80 µl CIB beinhaltenden well gegeben und bei 37 °C für 20 Minuten inkubiert. Nach zwei Waschschrinen mit CIB erfolgte die Messung

bei Raumtemperatur im Cellomics Arrayscan VTI. Eine Messung dauerte 140 Sekunden. Die ersten 20 Sekunden stellten die Baseline dar. Zum Ausschluss einer Reaktion allein auf den Pipettier-Stimulus erfolgte danach die Applikation des Lösungsmediums CIB. Capsaicin in einer Dosis von 10 nM beziehungsweise 50 nM wurde ab Zeitpunkt 70 Sekunden zu den Zellen gegeben. 20 Sekunden vor dem Ende der Messung wurde ein Stimulus mit 3 μ M Capsaicin gesetzt, der als Positivkontrolle für intakte und TRPV1-exprimierende Zellen diente. Die Substanzen wurden durch den in der Maschine integrierten Pipettierroboter, verabreicht [94]. Bei den Experimenten zur Stimulierung der PKA wurden die Zellen vor der Messung mit 1 μ M Forskolin und 10 mM IBMX für 20 min inkubiert.

In vorbereitenden Experimenten mit dem Cellomics Arrayscan VTI ergaben sich auf die Positivkontrolle im Vergleich zum Versuchsaufbau des klassischen Kalzium-Imagings niedrigere Fura Verhältnisse. Es erfolgte für die weitere Auswertung eine Anpassung der Kriterien. Auf die Positivkontrolle musste ein 50 % Anstieg verglichen zum Baseline-Durchschnitt nachgewiesen werden, damit die Zelle als intakt und TRPV1-exprimierend gewertet wurde. Das Kriterium der Baseline-Schwankung wurde unverändert übernommen.

Nach dem Kalzium-Imaging Experiment wurden die Zellen in Formaldehyd (2 % PFA, 20 min) fixiert. Nach drei Waschschritten mit CIB wurden die Zellen mit dem Primärantikörper (Anti-ARMS p220 mouse 1:1000, Anti-TRPV1 poly V1 rabbit 1:1000) in Blockpuffer über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Sekundärantikörper (gelöst in Blockpuffer) (Anti-mouse 555 1:1000, Anti-rabbit 488 1:1000) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS (3 Mal alle 5 min) wurden die wells mit Mowiol versiegelt. Anschließend erfolgte die Messung der Fluoreszenzsignale mit dem Cellomics Arrayscan VTI. Aufgrund der Verwendung von Imaging Platten und einer festen Halterung in der Apparatur, war es möglich, die beim Kalzium-Imaging aufgenommenen Sichtfelder mit einer Präzision von 0 bis 7,2 μ m in vertikaler und horizontaler Position wiederzufinden und mit den Bildinformationen aus der Immunzytochemie zu verbinden. Die aufgenommenen Bildreihen wurden mit ImageJ (National Institutes of Health) analysiert. Anhand der 3 μ M Capsaicin Stimulation am Ende eines jeweiligen Kalzium-Imaging Experimentes wurden manuell Masken generiert, wobei die auf 3 μ M reagierenden Zellen als "Regions of interest" markiert wurden. Dadurch konnte das

Kalzium-Imaging Signal einer bestimmten Zelle mit dem entsprechenden Fluoreszenzsignal aus der Immunzytochemie der gleichen Zelle in Verbindung gebracht werden. "Regions of interest", die keine korrespondierenden Zellen im Fluoreszenzbild aufwiesen, wurden ausgeschlossen [94]. Analog wie in 2.4. beschrieben erfolgte die Auswertung der Färbungen. Die weitere Datenanalyse wurde mit Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation) und Graphpad Prism 5 (Graphpad Software) durchgeführt.

2.7. Patch-Clamp

Mittels der Patch-Clamp Technik ist es unter anderem möglich, Stromstärken einzelner Ionenkanäle der Zellmembran einer Zelle zu messen. Es gibt verschiedene Konfigurationen, die sich in dem zu messendem Bereich unterscheiden. In dieser Arbeit verwendete ich die *whole cell* Konfiguration, bei der in die Zellmembran mittels Patch-Elektrode eingebrochen und der gesamte Strom der Zelle gemessen wird.

Die Patch-Clamp Experimente wurden unter elektrischer Isolation in einem Faraday'schen Käfig durchgeführt. Verwendet wurden dazu ein Vorverstärker, Elektrodenhalter, Micromanipulator 5171 (Eppendorf), Inversionsmikroskop (Zeiss) und ein schwerkraftabhängiges Multikanal-Perfusionssystem (SF-77B Perfusion Fast-Step, Warner Instrument LLC). Diese wurden zusammen auf einem schwingungsgedämpften Metalltisch platziert.

Die aufgenommenen Signale wurden zusätzlich zu dem Vorverstärker durch den Hauptverstärker (EPC-10, Seriennummer 520136-E, HEKA) erhöht und mit einem analog/digital Umwandler (AD/DA-Converter) digitalisiert. Die eingehenden Signale wurden durch die Pulse-Software von HEKA aufgenommen und analysiert. Die Software ermöglichte es, ebenfalls ausgehende Spannungseinstellungen an den Hauptverstärker zu übermitteln. Elektroden aus Silberdraht (Ag^+/AgCl) wurden als Mess- und Referenzelektroden benutzt. Um Unterdruck an der Pipettenspitze während des Experiments zu erzeugen, wurde mittels eines flexiblen Plastikschlauchs, der an dem Elektrodenhalter fixiert war, gesaugt. Der Micromanipulator ermöglichte es, die Pipettenspitze nah an der Zelle zu platzieren. Zur Herstellung der Pipetten wurde ein Flaming/Brown Micropipette Puller Model P-97 (Sutter Instrument Co., USA) verwendet. Die benutzten Pipetten bestanden aus Borosilikatglas-Kapillaren mit Filament

(Nr. 1103240, Ø außen: 1,5 mm, Ø innen: 0,87 mm, Hilgenberg, Malsfeld). Der Pipettenwiderstand betrug zwischen 3 und 6 MΩ.

TRPV1-spezifische Ströme wurden mittels *whole cell* Patch-Clamp Technik in mit TRPV1 beziehungsweise TRPV1/ARMS transfizierten HEK293 Zellen gemessen. Die Experimente wurden 12 bis 24 Stunden nach der transienten Transfektion der HEK293 Zellen durchgeführt. Nachdem sich eine feste Verbindung zwischen Pipette und Zellmembran ausgebildet hatte (Gigaseal), konnte man mittels Unterdruck die Zellmembran perforieren. Damit wurde die *whole cell* Konfiguration erreicht und es war möglich, Capsaicin-induzierte Ionenströme zu messen. Das Haltepotential wurde auf -60 mV gesetzt und die Zellen mit 50 nM Capsaicin stimuliert. Um die Tachyphylaxie zu untersuchen, wurde repetitiv Capsaicin zu den Zeitpunkten 0, 60, 120 und 300 Sekunden für je 10 Sekunden appliziert. In der Zwischenzeit erfolgte das Auswaschen der Substanz mittels Extrazellulärlösung (ECS, siehe 2.1.2.). Die aufgenommenen Ströme wurden im Verhältnis zur ersten Capsaicin Antwort normalisiert. Während des gesamten Experiments wurde die Zelle mit ECS umspült. Die Pipette wurde mit Intrazellulärlösung (ICS, siehe 2.1.2.) gefüllt. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt [94].

2.8. Statistik

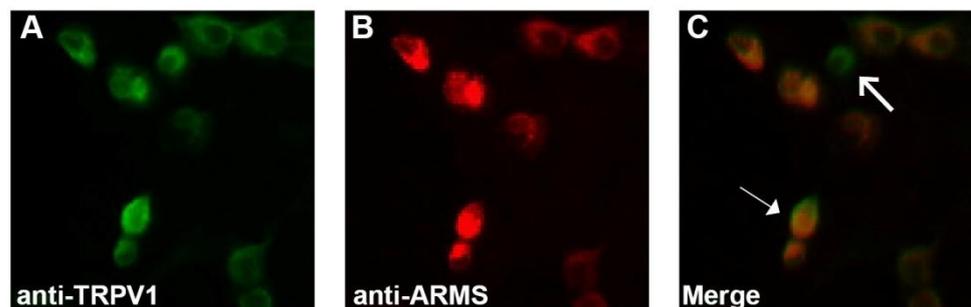
Die Daten werden als Mittelwert ± Standardfehler (SEM) präsentiert. Das statistische Signifikanzniveau wurde festgelegt als $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) und $p < 0,0001$ (****). Die Statistik wurde mit Hilfe der Software Graphpad Prism 5 (Graphpad Software) durchgeführt. Zur Erstellung der EC50-Kurven wurde die Hill Gleichung verwendet und für deren Analyse ein parametrischer t-Test beziehungsweise eine zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni's Post Test verwendet. Die Tachyphylaxie Experimente wurden mittels einer zweifaktoriellen ANOVA mit Bonferroni's Post Test ausgewertet. Bei den kombinierten Daten aus Kalzium- Imaging und Immunzytochemie kam der parametrische t-Test und eine zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni's Post Test zum Einsatz [94].

3. Ergebnisse

3.1. Koexpressionsrate von TRPV1 und ARMS in transfizierten HEK293 Zellen

Es wurde eine immunzytochemische Untersuchung mit TRPV1 und ARMS kotransfizierten HEK293 Zellen durchgeführt, um festzustellen, ob beide Proteine in denselben Zellen exprimiert werden. Bei den insgesamt 17.248 untersuchten HEK293 Zellen ergab sich eine Transfektionsrate von 64,92 % ($\pm 1,79$ %) für TRPV1 und von 42,03% ($\pm 1,72$ %) für ARMS. Die Koexpressionsrate von beiden Proteinen lag bei 40,99 % ($\pm 1,63$ %). Von den TRPV1-positiven Zellen waren 62,9 % ($\pm 1,28$ %) ebenfalls ARMS-positiv. Von den ARMS-positiven Zellen exprimierten 97,63 % ($\pm 0,47$ %) auch TRPV1. Abbildung 1 A-C stellt exemplarisch die Färbung für TRPV1 (grün), ARMS (rot) und beide Proteine (orange) dar. In untransfizierten HEK293 Zellen wurden mit den verwendeten Primärantikörpern (Anti-TRPV1 poly V, Anti-ARMS p220) unter gleicher Belichtungsdauer (Anti-TRPV1 30 ms, Anti-ARMS 60 ms) keine Signale für ARMS oder TRPV1 detektiert (Abb. 1. D-F). Demnach wurden ARMS und TRPV1 in circa 41 % der Zellen gemeinsam exprimiert.

TRPV1/ARMS transfizierte HEK293 Zellen



untransfizierte HEK293 Zellen

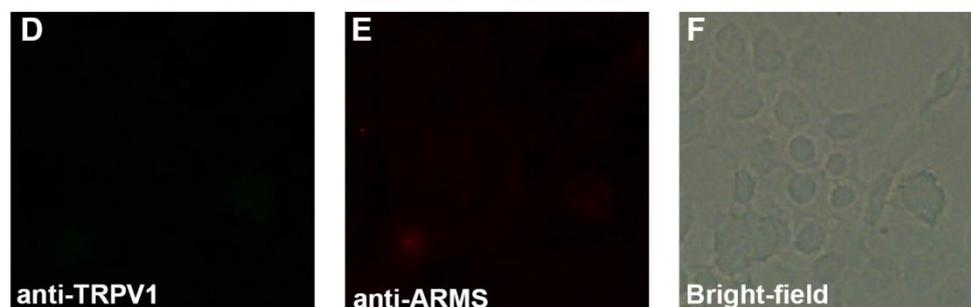
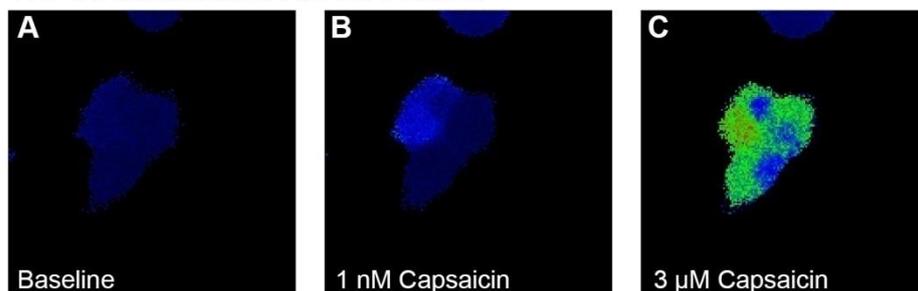


Abbildung 1: Immunzytochemische Darstellung von TRPV1/ARMS-transfizierten (A-C) und -untransfizierten (D-F) HEK293 Zellen, mit gleicher Belichtungszeit je Antikörper (A,D 30 ms; B,E, 60 ms). Grün (A) entspricht der TRPV1 Färbung, rot (B) der ARMS Färbung, orange (C) beiden Färbungen übereinander gelagert. Der Pfeil mit der ausgefüllten Spitze markiert eine TRPV1/ARMS positive Zelle. Der offene Pfeil markiert eine TRPV1 positive und ARMS negative Zelle.

3.2. Erhöhte TRPV1 Aktivität in Anwesenheit von ARMS bei niedrigen Capsaicinkonzentrationen

Nachdem festgestellt wurde, dass ARMS und TRPV1 in transfizierten HEK293 Zellen koexprimiert werden, wurde der Einfluss von ARMS auf die Funktion des TRPV1 Kanals untersucht. Dafür wurden in Kalzium-Imaging Experimenten TRPV1- und TRPV1/ARMS-transfizierte Zellen mit 1 nM und 3 μ M Capsaicin stimuliert. Abbildung 2 zeigt exemplarisch TRPV1- und TRPV1/ARMS-transfizierte HEK293 Zellen vor und nach der Capsaicingabe. Die Capsaicin-induzierte Änderung der Fura-Ratio über die Zeit ist in Abbildung 3 zu sehen. Die daraus ermittelte maximale Änderung der Fura-Ratio nach 1 nM Capsaicin wird in Abbildung 5 dargestellt. Zellen, die mit TRPV1/ARMS transfiziert wurden, zeigten auf 1 nM Capsaicin eine stärkere Änderung der Fura-Ratio als Zellen, die nur mit TRPV1 transfiziert wurden (Abb. 5, unbehandelt, zweifaktorielle ANOVA, $**p < 0,01$). Am Ende jeder Messung wurden die Zellen als Positivkontrolle mit 3 μ M Capsaicin stimuliert. Hier gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (parametrischer t-Test, ns, $p > 0,05$).

TRPV1 transfizierte HEK293 Zellen



TRPV1/ARMS transfizierte HEK293 Zellen

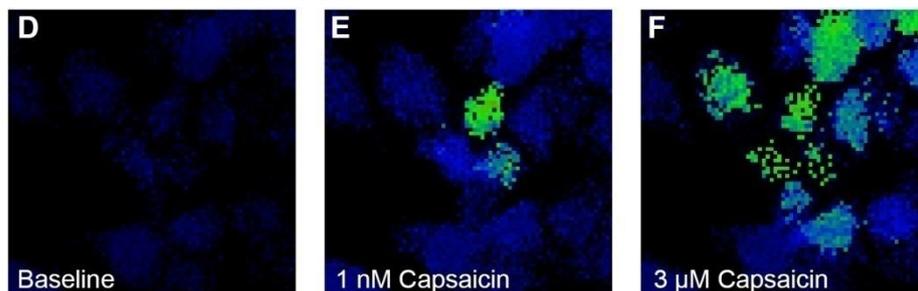


Abbildung 2: Beispieldarstellung der Änderung der Fluoreszenzintensität von TRPV1- (A,B,C) und TRPV1/ARMS- (D,E,F) transfizierten HEK293 Zellen vor (A,D) und nach Zugabe von 1 nM Capsaicin (B,E) und 3 μ M Capsaicin (C,F).

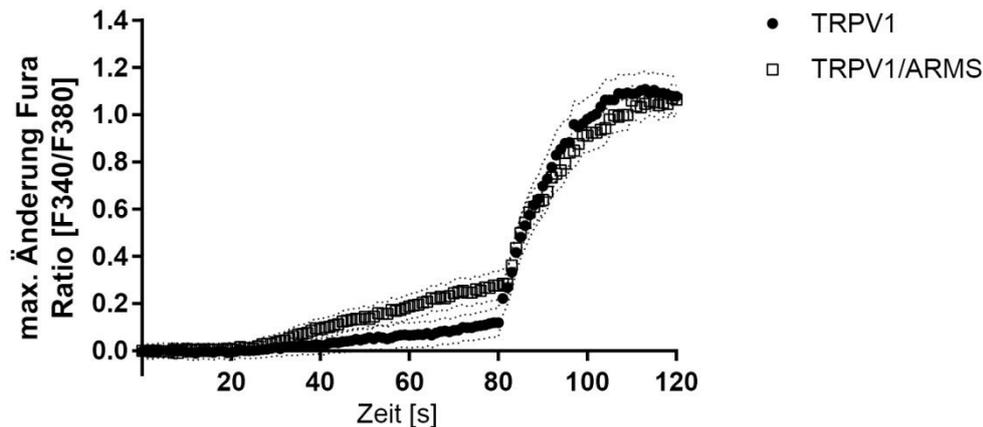


Abbildung 3: Änderung von F340/F380 (Hintergrund-bereinigt) nach 1 nM Capsaicin zum Zeitpunkt 20 s und 3 μ M Capsaicin zum Zeitpunkt 80 s in TRPV1- (offene Quadrate) und TRPV1/ARMS- (gefüllte Kreise) transfizierten HEK293 Zellen. Mittelwerte \pm SEM (TRPV1 n = 39; TRPV1/ARMS n = 56).

Anschließend wurden Dosis-Antwort-Kurven für Capsaicin von TRPV1 und TRPV1/ARMS transfizierten Zellen erstellt. Dabei wurden die entsprechend transfizierten HEK293 Zellen mit verschiedenen Capsaicinkonzentrationen (1 pM, 100 pM, 500 pM, 1 nM, 20 nM, 100 nM, 200 nM, 1 μ M, 3 μ M) stimuliert und die maximale Änderung der Fura-Ratio für die jeweilige Capsaicinkonzentration bestimmt.

Ermittelt durch die nicht lineare Regressionsanalyse (Abb. 4) ergab sich ein EC50 Wert für Capsaicin von 41,3 nM (95 % KI 31,9 - 53,5 nM) bei TRPV1-transfizierten beziehungsweise von 20,6 nM (95 % KI 16,2 - 26,1 nM) bei TRPV1/ARMS-transfizierten Zellen. Die EC50 Werte unterschieden sich signifikant voneinander (parametrischer t-Test, ****, $p < 0,0001$).

Der niedrigere EC50 Wert für TRPV1/ARMS-transfizierte Zellen zeigt somit, dass die Anwesenheit von ARMS den TRPV1 Kanal hinsichtlich Capsaicin sensitiviert. Dies wird auch durch eine Linksverschiebung der Dosis-Antwort-Kurve für Capsaicin deutlich (Abb. 4).

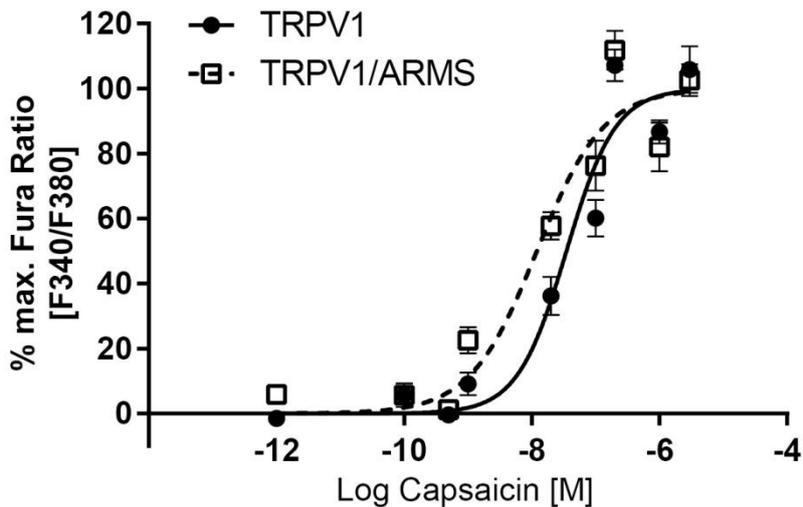


Abbildung 4: Dosis-Antwort-Kurve für Capsaicin von TRPV1- (Kreise) und TRPV1/ARMS- (Quadrate) transfizierten HEK293 Zellen. Die Werte sind im Verhältnis zur maximalen Änderung von F340/380 normalisiert. Mittelwerte \pm SEM. Nicht lineare Regression ermittelt durch Hill Gleichung (TRPV1 schwarze Kurve; n = 74 (1 pM), n = 34 (100 pM), n = 26 (500 pM), n = 41 (1 nM), n = 46 (20 nM), n = 45 (100 nM), n = 62 (200 nM), n = 85 (1 μ M), n = 44 (3 μ M); TRPV1/ARMS gestrichelte Kurve; n = 38 (1 pM), n = 59 (100 pM), n = 69 (500 pM), n = 57 (1 nM), n = 141 (20 nM), n = 64 (100 nM), n = 80 (200 nM), n = 46 (1 μ M), n = 54 (3 μ M)).

3.3. Einfluss von Proteinkinasen auf die Aktivität von TRPV1 in Anwesenheit von ARMS

Um zu prüfen, ob die TRPV1 Funktion in Anwesenheit von ARMS Kinase-abhängig ist, wurden PKA und PKC untersucht. Zur Inhibierung der PKA wurden alle Zellen vor dem Experiment mit 10 μ M H-89, und zur Inhibierung der PKC mit 1 μ M GF109203X für jeweils 20 Minuten behandelt. Es wurde, wie unter 3.3., der durch 1 nM Capsaicin-induzierte Kalziumeinstrom mittels Änderung der Fura-Ratio gemessen. Die H-89 Behandlung hatte bei nur mit TRPV1 transfizierten Zellen keinen Einfluss auf die maximale Änderung der Fura-Ratio (Abb. 5, unbehandelt vs. H-89 in TRPV1-transfizierten Zellen, zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni's Post Test, ns, $p > 0,05$). Dahingegen führte die H-89 Behandlung in TRPV1/ARMS-transfizierten HEK293 Zellen zu einer signifikanten Reduktion der maximalen Änderung der Fura-Ratio (Abb. 5, unbehandelt vs. H-89 in TRPV1/ARMS-transfizierten Zellen, zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni's Post Test, ****, $p < 0,0001$). Die maximale Änderung der Fura Ratio nach H-89 Behandlung war in TRPV1- und TRPV1/ARMS-transfizierten Zellen gleich (Abb. 5, H-89, zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni's Post Test, ns). Der sensitivierende Effekt von ARMS (bei 1 nM Capsaicin) wurde somit durch H89 aufgehoben.

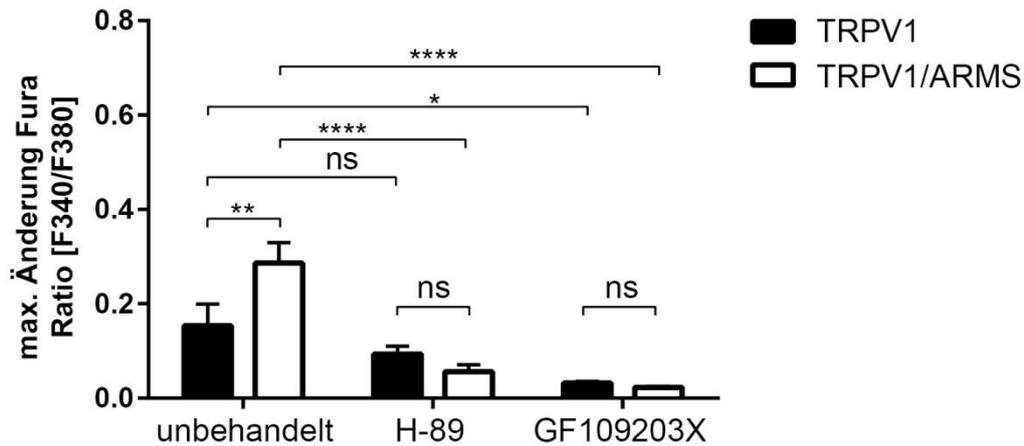


Abbildung 5: Maximale Änderung von F340/F380 (Hintergrund-bereinigt) nach 1 nM Capsaicin von TRPV1- (schwarz) und TRPV1/ARMS- (weiß) transfizierten HEK293 Zellen unbehandelt, nach 10 μ M H-89 und 1 μ M GF109203X Behandlung. Mittelwerte \pm SEM (zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni's Post Test, unbehandelt TRPV1 n = 39, TRPV1/ARMS n = 56; H-89 TRPV1 n = 127, TRPV1/ARMS n = 42; GF109203X TRPV1 n = 58, TRPV1/ARMS n = 114).

GF109203X führte bei TRPV1- und TRPV1/ARMS-transfizierten Zellen jeweils zu einer signifikanten Reduktion der maximalen Änderung der Fura-Ratio im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abb. 5, unbehandelt vs. GF109203X von TRPV1 transfizierten Zellen, zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni's Post Test, *, $p < 0,05$; unbehandelt vs. GF109203X in TRPV1/ARMS-transfizierten Zellen, zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni's Post Test, **** $p < 0,0001$). Die maximale Änderung der Fura-Ratio (bei 1 nM Capsaicin) nach GF109203X Behandlung war zwischen nur TRPV1- und TRPV1/ARMS- transfizierten Zellen nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 5, GF109203X, zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni's Post Test, ns).

3.4. Elektrophysiologie

In der *whole cell* Konfiguration führten 50 nM Capsaicin zu einem signifikant stärkeren Einstrom in TRPV1/ARMS-transfizierten, im Vergleich zu Zellen, die nur mit TRPV1 transfiziert wurden (Abb. 6A, parametrischer t-Test, * $p < 0,05$). Die Stromdichte war in den beiden untersuchten Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 6B, parametrischer t-Test, ns, $p > 0,05$).

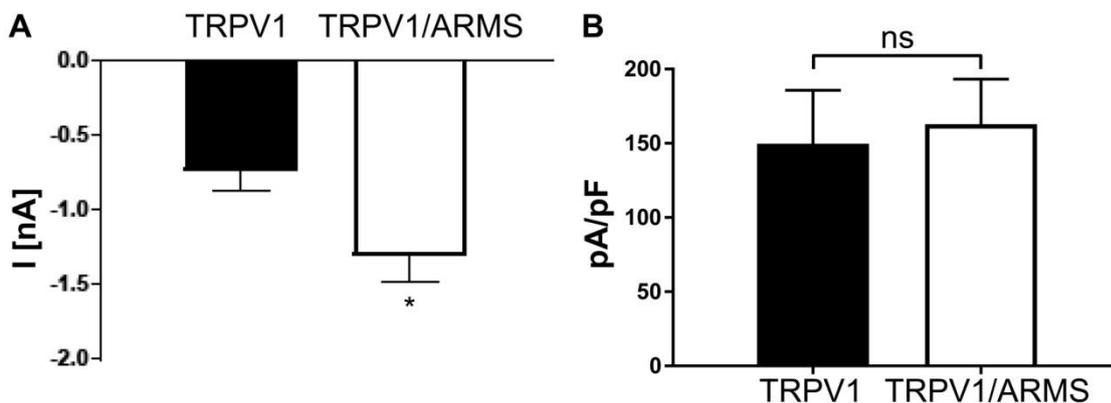


Abbildung 6: A) Einstrom in TRPV1- (schwarz) beziehungsweise TRPV1/ARMS- (weiß) transfizierten HEK293 Zellen nach einer Stimulation mit 50 nM Capsaicin. **B)** Stromdichte in TRPV1- (schwarz) beziehungsweise TRPV1/ARMS- (weiß) transfizierten HEK293 Zellen. Mittelwerte \pm SEM (Parametrischer t-Test, TRPV1 n = 23, TRPV1/ARMS n = 20).

Die wiederholte Gabe von Capsaicin zeigte in Zellen, die entweder TRPV1- oder TRPV1/ARMS-transfiziert waren, keinen Unterschied im Muster der Tachyphylaxie (Abb. 7A-C; zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni's Post Test, ns, $p > 0,05$).

Die elektrophysiologischen Ergebnisse bestätigten somit die im Kalzium-Imaging beobachteten Ergebnisse. Die Capsaicin-induzierte Tachyphylaxie des TRPV1 Kanals bleibt hingegen in beiden Gruppen unverändert.

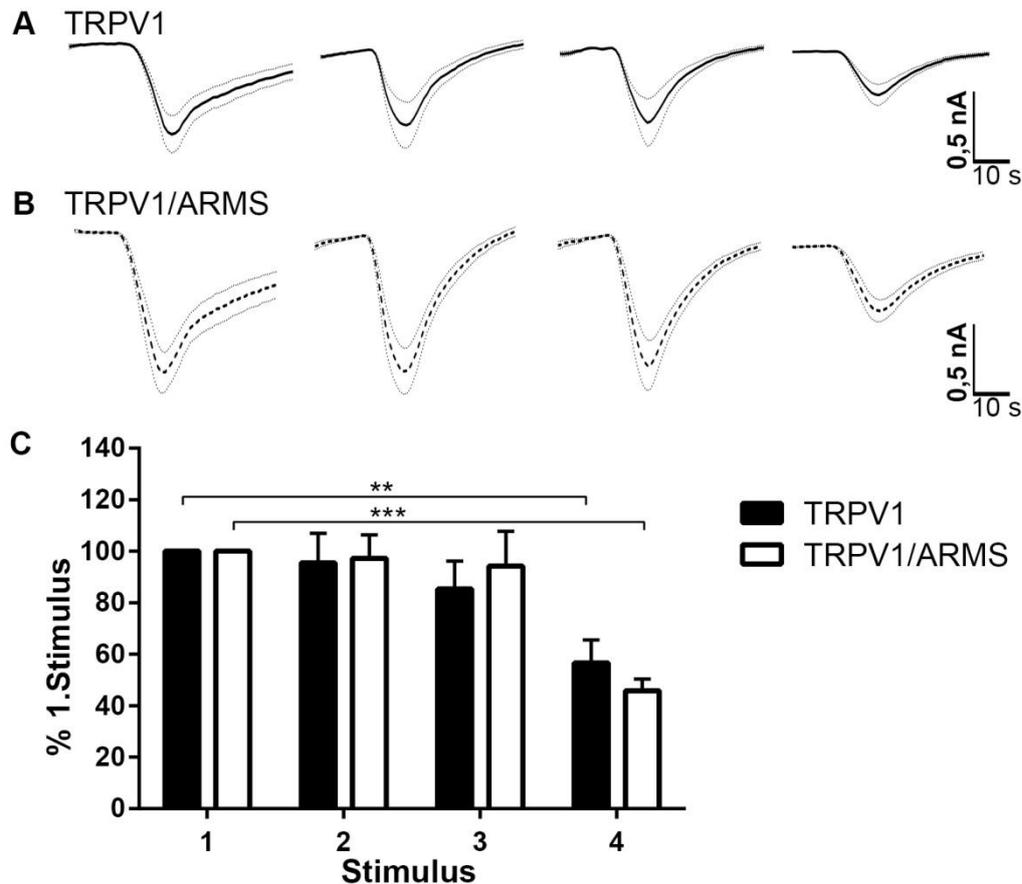


Abbildung 7: Capsaicin-induzierter (50 nM) Einstrom in TRPV1- (**A**; schwarze Linie) und TRPV1/ARMS- (**B**; gestrichelte Linie) transfizierten Zellen (60 s Pause zwischen 1. und 2., sowie 2. und 3. Stimulus; 180 s Pause zwischen 3. und 4. Stimulus). **C** Gegenüber dem 1. Stimulus normalisierte Daten aus A und B. Mittelwerte \pm SEM (zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni's Post Test, TRPV1 $n = 23$, TRPV1/ARMS $n = 20$)

3.5. Kombination von Immunzytochemie und Kalzium-Imaging

Um direkt die Funktionalität von Zellen zu untersuchen, die TRPV1 und ARMS koexprimieren, wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. T. Hucho vom Max-Plank-Institut für molekulare Genetik - Berlin ein innovatives Gerät verwendet, welches unmittelbar nach dem Kalzium-Imaging Experiment eine immunzytochemische Untersuchung der Zellen, die im Imaging gemessen wurden, ermöglichte. Dadurch konnten die Fluoreszenzsignale aus dem Kalzium-Imaging Experiment den jeweiligen Fluoreszenzsignalen der immunzytochemischen Färbung für die entsprechenden Proteine der einzelnen Zellen zugeordnet werden. Unabhängig von den durchgeführten Kalzium-Imaging Experimenten wurde die Koexpressionsrate der TRPV1/ARMS-transfizierten HEK293 Zellen auch mit dieser Methode untersucht. Bei den insgesamt 10.526 untersuchten Zellen ergab sich eine Koexpressionsrate von TRPV1 und ARMS von 35,33 % (\pm 4,52 %). Von den TRPV1-positiven Zellen waren 61,66 % (\pm 7,4 %)

ebenfalls ARMS-positiv und von den ARMS-positiven Zellen waren 83,86 % ($\pm 3,12$ %) TRPV1-positiv. Es wurden die gleichen Primärantikörper und Transfektionsreagenzien wie in den vorangegangenen immunzytochemischen Experimenten verwendet. Die hier gewonnenen Daten sind mit denen unter 3.1. vergleichbar.

3.5.1. Population von schwach TRPV1-exprimierenden Zellen

Wie in den Methoden beschrieben, wurden die Zellen als Positivkontrolle am Ende der Kalzium-Imaging Experimente mit 3 μ M Capsaicin stimuliert. Anhand der darauf reagierenden Zellen wurde eine Maske generiert, mithilfe derer die Fluoreszenzsignale der Zellen aus den immunzytochemischen Experimenten gemessen werden konnten. Unter den im Kalzium-Imaging auf 3 μ M Capsaicin reagierenden Zellen befand sich eine Gruppe von Zellen, die in der Immunzytochemie ein negatives TRPV1 Signal aufwies, was auf eine niedrige Sensitivität des Antikörperfluoreszenzsignals zurückzuführen ist (siehe 4.2.1.).

Die in der Immunzytochemie TRPV1-negativen Zellen zeigten eine signifikant geringere maximale Änderung des Fura Verhältnisses gegenüber den TRPV1-positiven Zellen auf die Stimulation mit 10 nM (Abb. 8A, parametrischert-Test, **** $p < 0,0001$) oder 50 nM Capsaicin (Abb. 8B, parametrischer t-Test, **** $p < 0,0001$).

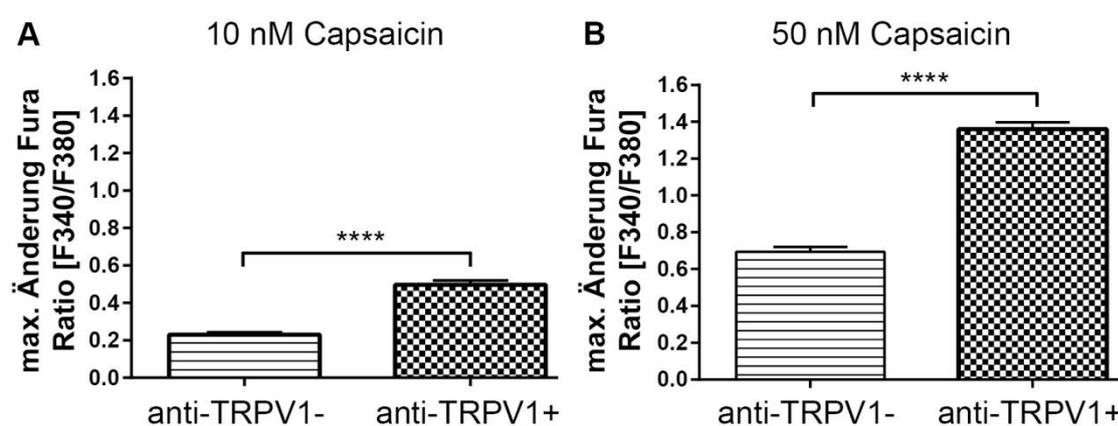


Abbildung 8: 10 nM (A) bzw. 50 nM (B) Capsaicin-induzierte maximale Änderung der Fura-Ratio (Hintergrund-bereinigt) von TRPV1/ARMS-transfizierten HEK293 Zellen, gruppiert in anti-TRPV1 negativ (-) und positiv (+) anhand des Fluoreszenzsignals der immunzytochemischen Experimente. Mittelwerte \pm SEM (parametrischer t-Test, A (-) $n = 747$, (+) $n = 663$; B (-) $n = 773$, (+) $n = 722$).

Somit ist die Gruppe der hier vermeintlich TRPV1-negativen Zellen als eine eigenständige Population zu betrachten, die den TRPV1 Kanal vermutlich schwach exprimiert.

Um den Effekt von ARMS auf TRPV1 zu untersuchen, konzentrierte ich mich im weiteren Verlauf der Arbeit auf den funktionellen TRPV1 Nachweis. Zur Stimulation von TRPV1 wählte ich mit 10 nM und 50 nM Capsaicin zwei Konzentrationen, die den unter 3.2. ermittelten EC₅₀ Werte ähnlich waren. HEK293 Zellen, die in der Immunzytochemie ARMS-positiv waren, zeigten eine signifikant höhere Capsaicin-induzierte maximale Änderung des Fura-Verhältnisses im Vergleich zu ARMS-negativen Zellen. Das war sowohl bei einer Stimulation mit 10 nM (Abb. 9, unbehandelt, zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni's Post Test, **** $p < 0,0001$) als auch mit 50 nM Capsaicin (Abb. 10, unbehandelt, zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni's Post Test, **** $p < 0,0001$) zu beobachten.

3.5.2. Einfluss der PKA auf TRPV1 in Anwesenheit von ARMS

Um eine mögliche PKA-Abhängigkeit weiter zu untersuchen, wurden weitere Experimente durchgeführt. Im Gegensatz zu 3.3. wurde die PKA nicht inhibiert sondern stimuliert. Dazu wurden die HEK293 Zellen vor dem Experiment für 20 Minuten mit Forskolin (FSK, 1 μ M) und IBMX (10 mM) behandelt.

Die Behandlung mit Forskolin und IBMX führte in ARMS-positiven Zellen zu einer signifikant stärkeren maximalen Änderung des Fura Verhältnisses nach Stimulation mit 10 nM Capsaicin im Vergleich zu unbehandelten ARMS-positiven Zellen (Abb. 9, unbehandelt vs. FSK/IBMX, zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni's Post Test, **** $p < 0,0001$). Dahingegen kam es nach einer Stimulation mit 50 nM Capsaicin nach Inkubation von Forskolin und IBMX unabhängig der ARMS Expression zu keiner zusätzlichen Steigerung der maximalen Änderung der Fura-Ratio (Abb. 10, unbehandelt vs. FSK/IBMX, zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni's Post Test, ns, $p > 0,05$). Nach der Forskolin und IBMX Behandlung blieb die signifikant stärkere maximale Änderung des Fura-Verhältnisses von ARMS-positiven Zellen erhalten. Dies war der Fall nach der Stimulation mit sowohl 10 nM (Abb. 9, FSK/IBMX, zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni's Post Test, ** $p < 0,01$) als auch mit 50 nM Capsaicin (Abb. 10, FSK/IBMX, zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni's Post Test, **** $p < 0,0001$).

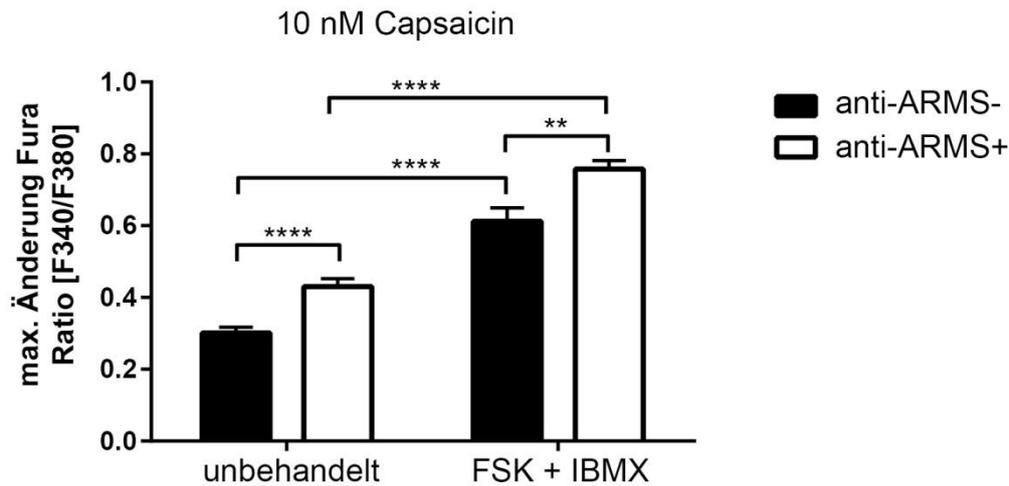


Abbildung 9: 10 nM Capsaicin-induzierte maximale Änderung der Fura-Ratio (Hintergrund-bereinigt) von TRPV1/ARMS-transfizierten HEK293 Zellen, unbehandelt und nach 20 minütiger Inkubation mit 1 μ M Forskolin und 10 mM IBMX, gruppiert in anti-ARMS negativ (-) und positiv (+) anhand des Fluoreszenzsignals der Immunzytochemie. Mittelwerte \pm SEM (zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni's Post Test unhandled A (-) n = 819, (+) n = 591; FSK + IBMX (-) n = 243, (+) n = 764).

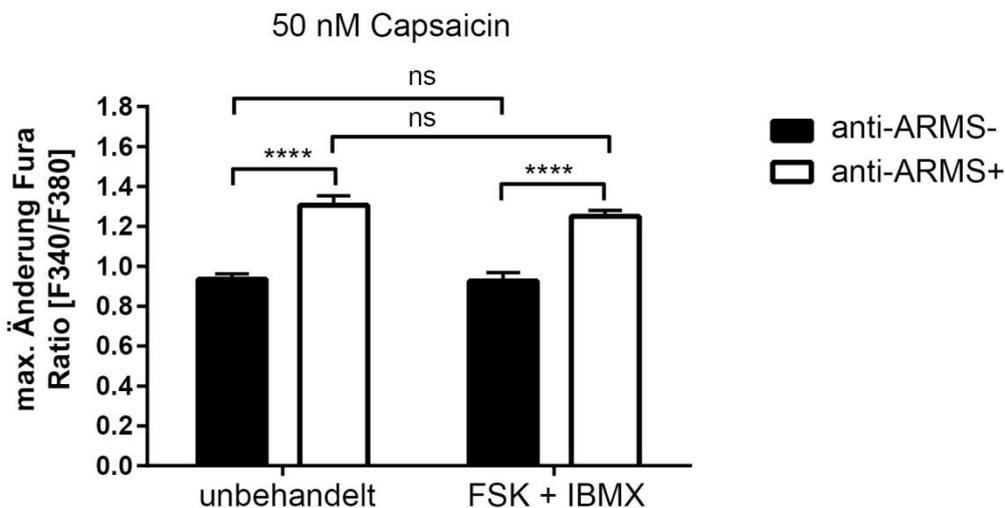


Abbildung 10: 50 nM Capsaicin-induzierte maximale Änderung der Fura Ratio (Hintergrund bereinigt) von TRPV1/ARMS-transfizierten HEK293 Zellen, unbehandelt und nach 20 minütiger Inkubation mit 1 μ M Forskolin und 10 mM IBMX, gruppiert in anti-ARMS negativ (-) und positiv (+) anhand des Fluoreszenzsignals der Immunzytochemie. Mittelwerte \pm SEM (zweifaktorielle ANOVA mit Bonferroni's Post Test, unhandled (-) n = 1170, (+) n = 325; FSK + IBMX (-) n = 805, (+) n = 1131).

3.6. Senföl-induzierte TRPA1 Aktivität in Anwesenheit von ARMS

In den Kalzium-Imaging Experimenten wurden die transfizierten HEK293 Zellen mit verschiedenen Senfölkonzentrationen (0,1 μM , 1 μM , 2,5 μM , 5 μM , 10 μM , 30 μM) stimuliert. Die Ergebnisse zeigten (abgeleitet durch die nicht lineare Regression; Abb. 11) keinen signifikanten Unterschied der EC50 Werte für Senföl zwischen TRPA1- und TRPA1/ARMS-transfizierten Zellen (TRPA1 EC50 = 3,4 μM (95% KI 2,3 - 4,8 μM); TRPA1/ARMS EC50 = 4,3 μM (95% KI 3,4 - 5,5 μM); parametrischer t-Test, ns, $p > 0.05$).

Somit scheint es in Anwesenheit von ARMS zu keiner Sensitivierung des TRPA1 Kanals zu kommen.

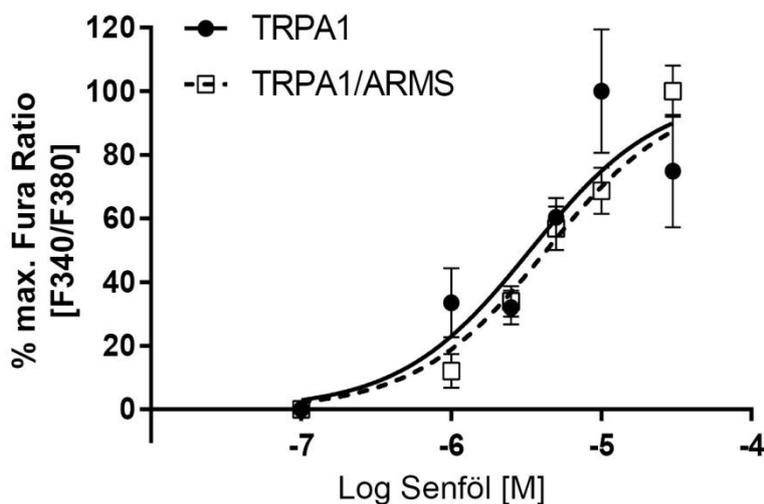


Abbildung 11: Dosis-Antwort-Kurve für Senföl von TRPA1 (Kreis) und TRPA1/ARMS (Quadrat) transfizierten HEK293 Zellen. Die Werte sind zur maximalen Änderung von F340/F380 normalisiert. Mittelwerte \pm SEM. Nicht lineare Regression ermittelt durch Hill Gleichung (TRPA1 schwarze Kurve; $n = 21$ (0,1 μM), $n = 16$ (1 μM), $n = 63$ (2,5 μM), $n = 132$ (5 μM), $n = 32$ (10 μM), $n = 23$ (30 μM) und TRPA1/ARMS gestrichelte Kurve; $n = 38$ (0,1 μM), $n = 24$ (1 μM), $n = 70$ (2,5 μM), $n = 48$ (5 μM), $n = 29$ (10 μM), $n = 29$ (30 μM)).

4. Diskussion

TRPV1 kann mit verschiedenen Proteinen interagieren. Dazu zählen unter anderem Calmodulin [25], Tubulin [45], das *GABA-A Rezeptor assoziierte Protein* (GABARAP) [46], Pirt [47], Snapin, Synaptotagmin IX [44] und das Adapterprotein *A Kinase Anchoring Protein 150* (AKAP150) [77]. Es lässt sich also vermuten, dass auch andere Adapterproteine wie das hier untersuchte Adapterprotein ARMS mit TRPV1 interagieren könnten.

In dieser Arbeit konnte mittels Immunzytochemie gezeigt werden, dass ARMS und TRPV1 in einem heterologen Zellsystem nach Transfektion koexprimiert werden. Des Weiteren konnte in Kalzium-Imaging und Patch-Clamp Experimenten, sowie in einer Kombination aus Kalzium-Imaging und Immunzytochemie gezeigt werden, dass ARMS mit TRPV1 funktionell interagiert und die TRPV1 Funktion moduliert. Somit konnte die Hypothese meiner Arbeit bestätigt werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich in Kalzium-Imaging Experimenten keine Sensibilisierung des TRPA1 Kanals gegenüber Senföl bei der Anwesenheit von ARMS.

Ein Teil der Ergebnisse meiner Arbeit konnte erfolgreich in einem Artikel im *European Journal of Pain* im Juli 2017 publiziert werden. In diesem Artikel teile ich mir mit Frau Jessica Peter die Erstautorenschaft [94].

4.1. TRPV1 wird durch die Koexpression von ARMS moduliert

4.1.1. Koexpression von TRPV1 und ARMS in einem heterologen System

ARMS und TRPV1 werden im zentralen und peripheren Nervensystem in Neuronen mit kleinen bis mittleren Durchmessern exprimiert [5], [79]. Aufgrund des Verteilungsmusters beider Proteine galt eine Koexpression in Neuronen als wahrscheinlich. In der aktuell publizierten Arbeit unserer Forschungsgruppe konnten wir nun erstmals diese Koexpression von TRPV1 und ARMS in Neuronen der Spinalganglien der Maus nachweisen [94].

In meiner Arbeit konnte ich in einem heterologen Zellsystem mittels immunzytochemischer Experimente feststellen, dass bei einer Kotransfektion von TRPV1 und ARMS beide Proteine in bis zu 41 % der Zellen gemeinsam exprimiert werden. Wenn die Zellen ARMS exprimierten, ließ sich fast immer (~98 %) auch TRPV1

nachweisen. In der Kombination aus Kalzium-Imaging und Immunzytochemie erfolgte ebenfalls die Untersuchung der Koexpression. Auch hier ließ sich in 84 % der ARMS-positiven Zellen TRPV1 nachweisen. Insgesamt wurden mehr als 27.000 Zellen untersucht.

Im Vergleich zu meinen Ergebnissen ergab sich in Neuronen der Spinalganglien der Maus eine niedrigere Koexpressionsrate von ~30 %. Im Gegensatz zu meiner Arbeit exprimierten auch nur 38 % der ARMS-exprimierenden Zellen TRPV1. Dahingegen ließ sich in ~85 % der TRPV1-exprimierenden Zellen ARMS nachweisen [94].

Die Koexpressions-Ergebnisse meiner Arbeit sind nicht in die primäre Zellkultur übertragbar, da man Rückschlüsse aus einem artifiziellen heterologen Zellkultursystem auf die native Expression in Neuronen nicht ohne weiteres ziehen kann. In meiner Arbeit handelte es sich um eine artifizielle Expression von TRPV1 und ARMS in HEK293 Zellen mittels transienter Transfektion. Diese Methode zielt darauf ab, so gut wie möglich Fremd-DNA in ein System einzuschleusen und ist von vielen äußeren Faktoren wie zum Beispiel der Zelllinie, -dichte, -viabilität und der Effizienz der Transfektionsagenzien abhängig. Das verwendete FuGene HD (Roche) erbringt in den meisten Zelllinien im Vergleich zu anderen Agenzien eine höhere Transfektionseffizienz, wobei diese meist bei ~ 40% liegt [95]–[97].

4.1.2. Die Anwesenheit von ARMS sensitiviert TRPV1

Nachdem festgestellt wurde, dass ARMS und TRPV1 in transfizierten HEK293 Zellen koexprimiert werden, wurde der Einfluss von ARMS auf die Funktion des TRPV1 Kanals untersucht. In Kalzium-Imaging Experimenten zeigten TRPV1/ARMS transfizierte Zellen auf 1 nM Capsaicin eine signifikant stärkere Änderung des Fura Verhältnisses im Vergleich zu nur mit TRPV1 transfizierten Zellen.

Die daraufhin erstellte Dosis-Antwort-Kurve (EC_{50} -Kurve) für Capsaicin in TRPV1- und TRPV1/ARMS-transfizierten Zellen ermöglichte die Ermittlung des EC_{50} Wertes für Capsaicin (Abb. 4). In Anwesenheit von ARMS betrug dieser 20,6 nM und war damit signifikant niedriger, was einen Hinweis auf eine Sensitivierung des TRPV1 Kanals gibt.

Der EC_{50} Wert für Capsaicin in TRPV1-transfizierten HEK293 beziehungsweise CHO Zellen in Kalzium-Imaging Experimenten von anderen Gruppen lag in einer Spanne von

16 nM bis 98 nM [98], [99]. Der in dieser Arbeit und diesem experimentellen Ansatz ermittelte EC50 Wert für Capsaicin von 41,3 nM in TRPV1-transfizierten HEK293 Zellen (Abb. 4) liegt in diesem Bereich.

In den elektrophysiologischen Untersuchungen mittels *whole cell* Patch Clamp Technik konnte in meiner Arbeit die Sensitivierung von TRPV1 in Anwesenheit von ARMS ebenfalls nachgewiesen werden. In Anwesenheit von ARMS kommt es zu einem signifikant stärkeren Capsaicin-induzierten TRPV1 Einstrom (Abb. 6A). Die elektrische Stromdichte zwischen TRPV1- und TRPV1/ARMS-transfizierten Zellen war jedoch nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 6B).

Bavassano und Kollegen konnten in einer Studie zeigen, dass in Anwesenheit des spannungsabhängigen K⁺-Kanals (Kvβ2) eine Erniedrigung des EC50 Wertes für Capsaicin von TRPV1 und somit eine erhöhte Sensitivität des TRPV1 Kanals auftritt [48]. In dieser Studie gab es ebenfalls keinen Unterschied in der elektrischen Stromdichte von TRPV1 in An- beziehungsweise Abwesenheit von Kvβ2, obwohl eine vermehrte TRPV1 Expression in Anwesenheit von Kvβ2 in Zelloberflächen-Biotinylierungsassays festgestellt wurde. Als Erklärung dafür wurde angeführt, dass die durch die Anwesenheit von Kvβ2 erhöhte Anzahl der TRPV1 Kanäle in der Zellmembran möglicherweise nicht einem Pool voll funktionsfähiger TRPV1 Homotetramere entspricht [48].

Die elektrische Stromdichte ist von vielen Variablen abhängig wie z.B. der Verfügbarkeit vorhandener Ionenkanäle und der Affinität von Agonisten. Um Rückschlüsse auf die (Oberflächen-) Expression des TRPV1 Kanals in Anwesenheit von ARMS zu ziehen, bedarf es, wie in der Studie von Bavassano und Kollegen, einer weiteren Methode. Für die Untersuchung der (Oberflächen-) Expression des TRPV1 Kanals eignen sich Radioliganden-Rezeptor-Bindungs- und Biotinylierungs- Experimente.

In der aktuell publizierten Arbeit unserer Forschergruppe führten wir Radioliganden-Rezeptor-Bindungsstudien durch. In einem Teil der Experimente wurde zusätzlich ein Plasmamembran Extraktionskit verwendet, um zwischen Plasma-Membranfraktion und totaler Membranfraktion (bestehend aus Plasma- und Organell-Membran) zu unterteilen. In der totalen Membranfraktion zeigte sich eine erhöhte Bindung des TRPV1 Liganden ³[H]-Resiniferatoxin in TRPV1/ARMS-transfizierten Zellen im Vergleich zu nur mit TRPV1 transfizierten Zellen. Der prozentuale Anteil von Plasma-

Membranfraktion-gebundenem-TRPV1 relativ zur totalen Membranfraktion war in TRPV1 und TRPV1/ARMS transfizierten Zellen nicht unterschiedlich [94]. Die erhöhte TRPV1 Expression scheint demnach in TRPV1/ARMS transfizierten Zellen auf eine erhöhte intrazelluläre Expression von TRPV1 (entsprechend dem erhöhten Organell-Membrananteil) wie z. Bsp. in Vesikeln oder am endoplasmatischen Retikulum [100], [101] zurückzuführen zu sein. Das wäre auch eine Erklärung dafür, dass die in meiner Arbeit gemessene elektrische Stromdichte in TRPV1/ARMS- und TRPV1-transfizierten Zellen nicht unterschiedlich war. Die Ursache für die TRPV1 Sensitivierung durch ARMS ist demnach nicht allein durch eine gesteigerte TRPV1 Expression zu erklären. Es bedarf vermutlich weiterer post-translationaler Faktoren bzw. Protein-Protein Interaktionen.

Bisher gibt es noch wenige Erkenntnisse über die Interaktion von ARMS mit Ionenkanälen. Arévalo und Kollegen konnten im Zusammenhang mit der ARMS Expression eine inverse Korrelation zwischen dem ARMS Proteinlevel und der Oberflächenexpression des Glutamat-Rezeptors-1 nachweisen, wobei die Oberflächenexpression des Glutamat Rezeptors-2 unabhängig von ARMS war [90]. Dies scheint ein weiterer Hinweis darauf zu sein, dass ARMS die (Oberflächen-) Expression eines Ionenkanals beeinflussen kann.

4.1.3. Kein Unterschied in der Capsaicin-induzierten Tachyphylaxie

Trotz des verstärkten TRPV1 Einstroms durch Capsaicin bei Anwesenheit von ARMS, ändert sich die durch repetitive Capsaicin Applikation induzierte Tachyphylaxie nicht (Abb. 7). Bei einem verstärktem Kalzium-Einstrom in die Zelle würde man jedoch annehmen, dass die Tachyphylaxie verstärkt würde. Das konnte so bereits in früheren Studien gezeigt werden [6], [102]. Einen Einfluss auf die Tachyphylaxie hat unter anderem die elektrische Stromdichte [26]. Diese war in An- bzw. Abwesenheit von ARMS in TRPV1-transfizierten Zellen jedoch nicht unterschiedlich, was eine Erklärung für die nicht unterschiedliche Tachyphylaxie sein könnte. Inwiefern Proteinkinasen einen Einfluss auf die Tachyphylaxie von TRPV1 in An- bzw. Abwesenheit von ARMS haben, wurde in meiner Arbeit nicht weiter untersucht. Die mögliche Rolle von zwei Proteinkinasen für den TRPV1 sensitivierenden ARMS Effekt wird jedoch im nächsten Abschnitt diskutiert.

4.1.4. Ursache der ARMS vermittelten Sensitivierung von TRPV1

Was sind Ursachen für den von mir gemessenen Effekt? Möglichkeiten wären zum Beispiel eine direkte, physische Interaktion von ARMS und TRPV1, post-translationale Modifikationen wie Konformationsänderungen von TRPV1, oder eine Beteiligung intrazellulärer Signalkaskaden. Ein Zusammenspiel aus mehreren Faktoren wäre ebenso möglich.

In meiner Arbeit konzentrierte ich mich auf eine indirekte Interaktion über den Einfluss von Kinasen auf die ARMS-vermittelte TRPV1 Sensitivierung. In Kalzium-Imaging Experimenten wurde durch eine H-89 Behandlung die Aktivität der Proteinkinase A inhibiert. Es kam unter Inkubation mit H-89 in TRPV1/ARMS-transfizierten HEK293 Zellen zu einer signifikant niedrigeren Änderung des Fura Verhältnisses auf 1 nM Capsaicin im Vergleich zu unbehandelten TRPV1/ARMS transfizierten Zellen (Abb. 5). Die Sensitivierung von TRPV1 für Capsaicin in Anwesenheit von ARMS wird somit durch die PKA Inhibierung aufgehoben.

H-89 wirkt als ein kompetitiver Antagonist von ATP an dessen Bindungsstelle der katalytischen Untereinheit der PKA [103]. Es wird als ein potenter PKA Inhibitor vermarktet und von vielen Arbeitsgruppen genutzt. Durch H-89 können aber noch mindestens 8 weitere Kinasen inhibiert werden [104]. Um einen PKA-unabhängigen Effekt ausschließen zu können, bedürfte es der Verwendung einer zusätzlichen Methode der PKA Inhibierung. Eine Möglichkeit wäre die Verwendung von Rp-Adenosin-3',5'-cAMP (Rp-cAMP), welches als kompetitiver Antagonist an den cAMP Bindungsstellen der PKA wirkt und die Freisetzung der katalytischen Untereinheiten verhindert [105]. Ebenfalls möglich wäre der Einsatz eines Proteinkinase Inhibitor Peptids (PKI), welches die freie katalytische Untereinheit der PKA bindet und somit die Phosphorylierung der Zielstruktur verhindert [106].

In unserer aktuell publizierten Arbeit verwendeten wir die zuletzt genannte Methode. Es konnte in Kalzium-Imaging und Patch Clamp Experimenten gezeigt werden, dass die erhöhte Capsaicin-induzierte TRPV1 Aktivität in TRPV1/ARMS-kotransfizierten HEK293 Zellen durch PKI aufgehoben wird. Ebenso zeigte sich in Radioliganden-Rezeptor-Bindungs-Experimenten, dass die in Anwesenheit von ARMS erhöhte TRPV1 Expression, durch die Inhibierung der PKA aufgehoben wird [94]. Vetter und Kollegen fanden bereits in einer HEK Zelllinie (Stabile Transfektion von TRPV1 und μ -Opioid

Rezeptor) Hinweise darauf, dass es durch die Aktivierung der PKA zum Einbau von intrazellulär TRPV1-beladenen Vesikeln in die Plasmamembran kommt [100]. Die zusätzlichen Experimente scheinen somit das in meiner Arbeit erhobene Ergebnis zu bestätigen, dass die ARMS-vermittelte TRPV1 Sensibilisierung zum Teil durch PKA verursacht wird.

Als nächstes wurde der Einfluss einer weiteren Proteinkinase untersucht. Um die PKC zu hemmen, wurde der Inhibitor GF109203X verwendet. Die PKC-Hemmung führt generell zu einer niedrigeren TRPV1-Aktivität, unabhängig davon, ob ARMS koexprimiert ist oder nicht (Abb. 5). Li und Kollegen haben in einer Subpopulation von Neuronen gezeigt, dass die basale Sensitivität von TRPV1 von PKC (im speziellen PKC β II) abhängig ist. TRPV1 aktiviert PKC β II über eine direkte Bindung, die wiederum zu einer Phosphorylierung von TRPV1 und somit zu einer erhöhten Sensitivität führt [107]. Das könnte eine Erklärung für die in meiner Arbeit gesehene Abschwächung des Fura Verhältnisses durch die PKC Inhibierung sein.

Es scheint, dass zumindest ein Teil der Sensitivierung des TRPV1 Kanals gegenüber Capsaicin bei Anwesenheit von ARMS über die Aktivierung der PKA vermittelt wird. Der Einfluss der PKC hingegen ist fraglich, da diese, unabhängig von ARMS, Einfluss auf die basale Sensitivität des TRPV1 Kanals hat.

4.2. TRPV1 Funktionalität verbunden mit der Proteinexpression der Zelle

Mit einem innovativen experimentellen Ansatz konnte direkt die Funktionalität von TRPV1/ARMS-transfizierten Zellen mit der Proteinexpression verknüpft und untersucht werden. Unmittelbar nach dem Kalzium-Imaging Experiment wurde eine immunzytochemische Untersuchung exakt der Zellen, die im Kalzium-Imaging gemessen wurden, durchgeführt.

4.2.1. Funktionelle Unterschiede abhängig von der TRPV1 Expression

Am Ende jeder Messung wurden alle Zellen mit 3 μ M Capsaicin stimuliert und nur die Capsaicin-Responder in die weitere Auswertung einbezogen. Erstaunlicherweise gibt es jedoch eine Population von Zellen, die nach dem funktionellen Kriterium TRPV1 exprimierten, jedoch in der immunzytochemischen Färbung als TRPV1-negativ

("TRPV1 low") eingeteilt wurden (Abb. 8). Ein Grund dafür könnte eine geringere Sensitivität des Antikörperfluoreszenzsignals für TRPV1 im Vergleich zur funktionellen Reaktion von Capsaicin auf TRPV1 sein. Bevor der Kanal von Caterina und Kollegen geklont wurde, war dieser zunächst nur aufgrund der spezifischen Reaktion auf Capsaicin detektierbar und wurde als Vanilloid- beziehungsweise Capsaicinrezeptor beschrieben [5].

Die quantitative Auswertung immunzytochemischer Färbungen gestaltet sich schwierig, da meist anhand der subjektiven Wahrnehmung des Untersuchers die Pixelintensität in positiv und negativ für ein zu untersuchendes Protein eingeteilt wird. Um die Subjektivität einzuschränken, wurde die unter 2.4. beschriebene Methode verwendet. Da jedoch der Untersucher die „Regions of interest“ für das Hintergrundsignal weiterhin durch seine Wahrnehmung auswählen muss, ist das Verfahren nur als semiobjektiv anzusehen. Die Auswertungsmethode wurde bereits von Brandao und Kollegen in einer immunzytochemischen Studie etabliert und von unserer Forschungsgruppe in Neuronen der Spinalganglien angewendet [93], [94]. Inwiefern die Pixelintensität auch Aussagen über die Proteinexpression der Zelle zulässt, wird meist nicht berücksichtigt. Brandao und Kollegen versuchten diesen Aspekt in ihrer Studie zu untersuchen, indem sie eine weitere Kategorie für die immunzytochemische Färbung für, in diesem Fall, AKAP150 einführten. Zellen wurden als "AKAP150 high" klassifiziert, wenn die Pixelintensität größer als 15 Standardabweichungen über dem Hintergrundsignal war. Ob diese Population sich auch in funktioneller Hinsicht unterscheidet, konnte in ihrer Studie nicht überprüft werden [93].

Im Gegensatz dazu habe ich in meiner Arbeit anhand der immunzytochemischen Färbung eine Gruppe von "TRPV1 low" Zellen detektieren können. Unabhängig von der ARMS Expression, zeigte die untersuchte Population von TRPV1-negativen Zellen eine signifikant kleinere Änderung des maximalen Fura Verhältnisses auf Capsaicin im Vergleich zu TRPV1-positiven Zellen. Somit scheint es sich bei dieser Gruppe um eine eigenständige und schwach TRPV1 exprimierende Population zu handeln (Abb. 8).

4.2.2. Stimulierung der PKA

Werden die auf Capsaicin reagierenden Zellen nun anhand der Immunzytochemie in ARMS-positive (anti-ARMS+) und negative Zellen (anti-ARMS-) gruppiert, zeigt sich eine signifikant höhere maximale Änderung des Fura Verhältnisses von ARMS-positiven Zellen im Vergleich zu ARMS-negativen. Das trifft sowohl für eine unter den hier ermittelten EC50 Werten für Capsaicin liegende Konzentration (10 nM), als auch für eine darüber liegende Konzentration (50 nM) zu (Abb. 9 unbehandelt und Abb. 10 unbehandelt). Somit konnten die aus den klassischen Kalzium-Imaging und Patch Clamp Experimenten gewonnenen Resultate bestätigt werden.

Mit der Kombination aus Kalzium-Imaging und Immunzytochemie sollte der Einfluss der PKA auf die Sensitivierung des TRPV1 in Anwesenheit von ARMS durch die Stimulierung der PKA untersucht werden. Wie bereits von anderen Gruppen beschrieben, kommt es durch Forskolin und IBMX zur Aktivierung der PKA und somit zur Sensitivierung des TRPV1 Kanals [26], [35].

In Hinblick auf die Anwesenheit von ARMS ließ sich aus den bisherigen Ergebnissen vermuten, dass die Interaktion mit TRPV1 durch die PKA vermittelt wird. Sollte dieser Effekt ausschließlich PKA-vermittelt sein, wäre bei der Aktivierung der PKA durch Forskolin/IBMX in Abwesenheit von ARMS die gleiche verstärkte Reaktion auf Capsaicin des TRPV1 wie in Anwesenheit von ARMS zu erwarten gewesen.

Bei einer unter dem EC50 Wert liegenden Capsaicin Konzentration (10 nM) kam es durch die PKA Aktivierung jedoch zu einer additiven Sensitivierung in Anwesenheit von ARMS. Das lässt vermuten, dass ARMS die PKA nicht maximal stimuliert oder TRPV1 nicht maximal sensitiviert ist (Abb. 9). Bei einer über den ermittelten EC50 Wert liegenden (und somit submaximalen) Capsaicin-Konzentration konnte in Ab- sowie Anwesenheit von ARMS die Capsaicin-induzierte Zellantwort durch die Aktivierung der PKA nicht weiter gesteigert werden (Abb. 10). Das könnte daran liegen, dass durch 50 nM Capsaicin bereits alle TRPV1 Kanäle maximal aktiviert wurden, so dass eine zusätzliche PKA-Aktivität keinen weiteren Einfluss mehr hat. Die Änderung des Fura Verhältnisses in Anwesenheit von ARMS war jedoch weiterhin signifikant größer als in Abwesenheit von ARMS, was auf eine Beteiligung weiterer noch ungeklärter Faktoren schließen lässt (Abb. 9 FSK + IBMX, Abb. 10 FSK + IBMX).

Der exakte Mechanismus, wie ARMS auf den TRPV1 Kanal wirkt, ist aktuell nicht bekannt. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Sensitivierung zu einem Teil über Kinasen, im speziellen durch die PKA, vermittelt wird. Des Weiteren konnten wir in unserer aktuell publizierten Forschungsarbeit mittels Immunpräzipitation nachweisen, dass TRPV1 und ARMS nicht nur funktionell, sondern auch physikalisch miteinander interagieren. Das konnte in HEK293 Zellen sowie in Neuronen der Spinalganglien der Maus nachgewiesen werden [94].

4.3. Die Interaktion mit ARMS ist nicht TRP-spezifisch

Ein weiterer Vertreter der TRP Kanäle ist TRPA1. In Studien konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des TRPA1 Kanals zu einer Sensitivierung des TRPV1 führt. Dabei wird die Sensitivierung durch den Kalziumeinstrom ausgelöst, der infolge die PKA aktiviert und diese TRPV1 phosphoryliert [108]. Ebenso konnte in Verhaltensexperimenten gezeigt werden, dass es nach Applikation eines TRPA1 Agonisten zu einer verstärkten Hitzeschmerz Sensitivität kommt [109]. Frühere Studien kamen hingegen zu dem Ergebnis, dass es durch die TRPA1 Stimulation über den Kalzium-abhängigen Calcineurin Signalweg zur Desensitivierung des TRPV1 kommt [33], [110]. Sicher scheint zu sein, dass es durch die Aktivität von TRPA1 zu einer Beeinflussung des TRPV1 Kanals kommt. Wie diese jedoch ausfällt, ist von weiteren noch zu untersuchenden Faktoren abhängig.

Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass ARMS eine funktionelle Interaktion mit TRPV1 eingeht und TRPA1 ebenfalls TRPV1 moduliert, sollte die TRPA1 Funktion in Anwesenheit von ARMS untersucht werden. Die ermittelten EC50 Werte für Senföl von TRPA1 und TRPA1/ARMS-transfizierten HEK293 Zellen waren jedoch nicht signifikant unterschiedlich voneinander, wonach die Anwesenheit von ARMS keinen Effekt auf die TRPA1 Funktion gegenüber Senföl zu haben scheint. Die Interaktion mit ARMS scheint somit nicht generalisierbar für (alle) TRP-Kanäle zu sein.

Andere Proteine, die TRPV1 modulieren konnten, zeigten auf die TRPA1 Funktion auch keinen Einfluss. Das Protein "Fas-associated factor 1" (FAF1), welches eine wichtige Rolle in der Sensitivierung von TRPV1 spielt, konnte ebenfalls die Kanalaktivität von TRPA1 nicht modulieren [111]. Des Weiteren ist das Protein PIRT in der Lage TRPV1, sowie TRPM8 zu binden, jedoch nicht TRPA1. Ebenfalls wird die TRPA1 Funktion im

Gegensatz zur TRPV1 Funktion in einem PIRT Knock-out Mausmodell nicht beeinflusst [47]. Eine mögliche Erklärung, warum es zur Beeinflussung der TRPV1 Funktion und nicht der TRPA1 Funktion kommt, könnte in der unterschiedlichen Struktur beider Proteine liegen. TRPV1 und TRPA1 gehören zwar beide zur TRP-Familie, jedoch ist diese, wie eingangs unter 1.2. aufgeführt, sehr heterogen. TRPA1 ist bisher der einzige Vertreter seiner Untergruppe. Durch die Struktur mit einem langen N-Terminus und multiplen Ankyrin Repeats [64], [76] unterscheidet sich TRPA1 stark von TRPV1. In wie weit ARMS spezifisch für den TRPV1 Kanal ist oder ob eine Interaktion mit anderen Vertretern der TRP-Kanäle vorhanden ist, muss in weiterer Forschung eruiert werden.

4.4. Klinische Relevanz und Ausblick auf zukünftige Forschung

Die meisten aktuell genutzten Analgetika zielen darauf ab, das Entzündungsgeschehen beziehungsweise die Übertragung der Signale von Nozizeptoren in das Zentralnervensystem zu beeinflussen. Der TRPV1 Kanal könnte ein Ziel darstellen, durch dessen Inhibierung die Schmerzentstehung am Ort des Geschehens unterbunden wird. Deshalb forschen eine Vielzahl an Pharmazeutischen Unternehmen an der Entwicklung von TRPV1 Modulatoren. Bisher haben jedoch verschiedene TRPV1 Antagonisten, auch wenn sie sich in ihrer chemischen Struktur unterschieden haben, starke Nebenwirkungen gezeigt. Dabei handelte es sich um die Entstehung einer Hyperthermie sowie der Verringerung der Hitzetoleranzgrenze, die zur Gefahr einer Verbrühung durch Heißgetränke oder zu heißes Duschen führte. Die Nebenwirkungen waren meist so ernsthaft, dass die weitere Entwicklung vor dem Erreichen einer zufriedenstellenden Schmerzkontrolle gestoppt werden musste [62]. Aus diesem Grund ist es notwendig, neue Angriffsziele zu finden, um die durch TRPV1 vermittelte Nozizeption zu mindern. Die Ergebnisse meiner Arbeit könnten das Adapterprotein ARMS als eine neue Zielstruktur für die Entwicklung einer neuen Klasse von Analgetika einführen.

Die Ergebnisse meiner Arbeit beschränken sich ausschließlich auf ein heterologes Zellsystem. In der aktuell publizierten Arbeit unserer Forschungsgruppe ist es uns jedoch gelungen diese Interaktion erstmals in einer primären Zellkultur nachzuweisen [94]. Eine Herausforderung für die weitere Forschung wird es sein, Experimente an

ARMS Knock-out Tieren durchzuführen. In der Vergangenheit sind Forschungsgruppen an deren Herstellung bisher gescheitert [81], [82], [84]. Eine Variante wäre die Verwendung von siRNA, durch die es zu einem Knockdown von ARMS in den zu untersuchenden Zellen beziehungsweise Tieren kommt.

5. Literaturverzeichnis

- [1] J. D. Loeser and R. D. Treede, "The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology," *Pain*, vol. 137, no. 3. pp. 473–477, 2008.
- [2] L.-J. Wu, T.-B. Sweet, and D. E. Clapham, "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family.," *Pharmacol. Rev.*, vol. 62, pp. 381–404, 2010.
- [3] R. G. Walker, A. T. Willingham, and C. S. Zuker, "A Drosophila Mechanosensory Transduction Channel," *Science (80-.)*, vol. 287, no. 5461, pp. 2229–2234, 2000.
- [4] D. E. Clapham, D. Julius, C. Montell, and G. Schultz, "International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels.," *Pharmacol. Rev.*, vol. 57, no. 4, pp. 427–450, 2005.
- [5] M. J. Caterina, M. A. Schumacher, M. Tominaga, T. A. Rosen, J. D. Levine, and D. Julius, "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway.," *Nature*, vol. 389, no. 6653, pp. 816–24, Oct. 1997.
- [6] M. Tominaga, M. J. Caterina, A. B. Malmberg, T. A. Rosen, H. Gilbert, K. Skinner, B. E. Raumann, A. I. Basbaum, and D. Julius, "The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli.," *Neuron*, vol. 21, no. 3, pp. 531–43, Sep. 1998.
- [7] M. D. Southall, T. Li, L. S. Gharibova, Y. Pei, G. D. Nicol, and J. B. Travers, "Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes.," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 304, pp. 217–222, 2003.
- [8] S. Kato, E. Aihara, A. Nakamura, H. Xin, H. Matsui, K. Kohama, and K. Takeuchi, "Expression of vanilloid receptors in rat gastric epithelial cells: role in cellular protection," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 66, pp. 1115–1121, 2003.
- [9] Y. Akiba, S. Kato, K. Katsube, M. Nakamura, K. Takeuchi, H. Ishii, and T. Hibi, "Transient receptor potential vanilloid subfamily 1 expressed in pancreatic islet beta cells modulates insulin secretion in rats.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 321, pp. 219–225, 2004.
- [10] L. A. Birder, Y. Nakamura, S. Kiss, M. L. Nealen, S. Barrick, A. J. Kanai, E. Wang, G. Ruiz, W. C. De Groat, G. Apodaca, S. Watkins, and M. J. Caterina, "Altered urinary bladder function in mice lacking the vanilloid receptor TRPV1.," *Nat. Neurosci.*, vol. 5, pp. 856–60, 2002.
- [11] S. E. Jordt, M. Tominaga, and D. Julius, "Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, pp. 8134–8139, 2000.
- [12] M. J. Caterina, "Impaired Nociception and Pain Sensation in Mice Lacking the Capsaicin Receptor," *Science (80-.)*, vol. 288, no. 5464, pp. 306–313, Apr. 2000.
- [13] J. B. Davis, J. Gray, M. J. Gunthorpe, J. P. Hatcher, P. T. Davey, P. Overend, M. H. Harries, J. Latcham, C. Clapham, K. Atkinson, S. A. Hughes, K. Rance, E. Grau, A. J. Harper, P. L. Pugh, D. C. Rogers, S. Bingham, A. Randall, and S. A. Sheardown, "Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal

- hyperalgesia.," *Nature*, vol. 405, pp. 183–187, 2000.
- [14] M. Trevisani, D. Smart, M. J. Gunthorpe, M. Tognetto, M. Barbieri, B. Campi, S. Amadesi, J. Gray, J. C. Jerman, S. J. Brough, D. Owen, G. D. Smith, A. D. Randall, S. Harrison, A. Bianchi, J. B. Davis, and P. Geppetti, "Ethanol elicits and potentiates nociceptor responses via the vanilloid receptor-1.," *Nat. Neurosci.*, vol. 5, pp. 546–551, 2002.
- [15] E. Cuypers, A. Yanagihara, E. Karlsson, and J. Tytgat, "Jellyfish and other cnidarian envenomations cause pain by affecting TRPV1 channels," *FEBS Lett.*, vol. 580, pp. 5728–5732, 2006.
- [16] J. Siemens, S. Zhou, R. Piskorowski, T. Nikai, E. A. Lumpkin, A. I. Basbaum, D. King, and D. Julius, "Spider toxins activate the capsaicin receptor to produce inflammatory pain.," *Nature*, vol. 444, pp. 208–212, 2006.
- [17] R. A. Ross, "Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors.," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 140, pp. 790–801, 2003.
- [18] S. W. Hwang, H. Cho, J. Kwak, S. Y. Lee, C. J. Kang, J. Jung, S. Cho, K. H. Min, Y. G. Suh, D. Kim, and U. Oh, "Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, pp. 6155–6160, 2000.
- [19] M. Liao, E. Cao, D. Julius, and Y. Cheng, "Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy.," *Nature*, vol. 504, no. 7478, pp. 107–12, Dec. 2013.
- [20] P. V Lishko, E. Procko, X. Jin, C. B. Phelps, and R. Gaudet, "The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity.," *Neuron*, vol. 54, no. 6, pp. 905–18, Jun. 2007.
- [21] R. Gaudet, "TRP channels entering the structural era.," *J. Physiol.*, vol. 586, no. Pt 15, pp. 3565–75, 2008.
- [22] S.-Y. Lau, E. Procko, and R. Gaudet, "Distinct properties of Ca²⁺-calmodulin binding to N- and C-terminal regulatory regions of the TRPV1 channel," *J. Gen. Physiol.*, vol. 140, no. 5, pp. 541–555, 2012.
- [23] N. Kedei, T. Szabo, J. D. Lile, J. J. Treanor, Z. Olah, M. J. Iadarola, and P. M. Blumberg, "Analysis of the Native Quaternary Structure of Vanilloid Receptor 1," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 30, pp. 28613–28619, 2001.
- [24] E. Cao, M. Liao, Y. Cheng, and D. Julius, "TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms.," *Nature*, vol. 504, no. 7478, pp. 113–8, Dec. 2013.
- [25] R. J. Docherty, J. C. Yeats, S. Bevan, and H. W. Boddeke, "Inhibition of calcineurin inhibits the desensitization of capsaicin-evoked currents in cultured dorsal root ganglion neurones from adult rats.," *Pflugers Arch.*, vol. 431, no. 6, pp. 828–37, Apr. 1996.
- [26] G. Bhave, W. Zhu, H. Wang, D. J. Brasier, G. S. Oxford, and R. W. Gereau, "cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation.," *Neuron*, vol. 35, no. 4, pp. 721–31, Aug. 2002.
- [27] L. S. Premkumar and G. P. Ahern, "Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C.," *Nature*, vol. 408, no. 6815, pp. 985–90, 2000.

- [28] X. Jin, N. Morsy, J. Winston, P. J. Pasricha, K. Garrett, and H. I. Akbarali, "Modulation of TRPV1 by nonreceptor tyrosine kinase, c-Src kinase.," *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 287, pp. C558–C563, 2004.
- [29] J. Jung, J. S. Shin, S.-Y. Lee, S. W. Hwang, J. Koo, H. Cho, and U. Oh, "Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding.," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, pp. 7048–7054, 2004.
- [30] H. H. Chuang, E. D. Prescott, H. Kong, S. Shields, S. E. Jordt, A. I. Basbaum, M. V. Chao, and D. Julius, "Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition.," *Nature*, vol. 411, no. 6840, pp. 957–62, Jun. 2001.
- [31] A. T. Stein, C. A. Ufret-vincenty, L. Hua, L. F. Santana, and S. E. Gordon, "Phosphoinositide 3-Kinase Binds to TRPV1 and Mediates NGF-stimulated TRPV1 Trafficking to the Plasma Membrane," vol. 128, no. 5, pp. 509–522, 2006.
- [32] D. P. Mohapatra and C. Nau, "Regulation of Ca²⁺-dependent desensitization in the vanilloid receptor TRPV1 by calcineurin and cAMP-dependent protein kinase.," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 14, pp. 13424–32, Apr. 2005.
- [33] N. A. Jeske, A. M. Patwardhan, N. Gamper, T. J. Price, A. N. Akopian, and K. M. Hargreaves, "Cannabinoid WIN 55,212-2 regulates TRPV1 phosphorylation in sensory neurons.," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 43, pp. 32879–90, Oct. 2006.
- [34] V. Vellani, S. Mapplebeck, A. Moriondo, J. B. Davis, and P. A. McNaughton, "Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide.," *J. Physiol.*, vol. 534, no. Pt 3, pp. 813–25, Aug. 2001.
- [35] P. K. Rathee, C. Distler, O. Obreja, W. Neuhuber, G. K. Wang, S.-Y. Wang, C. Nau, and M. Kress, "PKA/AKAP/VR-1 module: A common link of Gs-mediated signaling to thermal hyperalgesia.," *J. Neurosci.*, vol. 22, no. 11, pp. 4740–5, Jun. 2002.
- [36] N. A. Jeske, A. Diogenes, N. B. Ruparel, J. C. Fehrenbacher, M. Henry, A. N. Akopian, and K. M. Hargreaves, "A-kinase anchoring protein mediates TRPV1 thermal hyperalgesia through PKA phosphorylation of TRPV1.," *Pain*, vol. 138, no. 3, pp. 604–16, Sep. 2008.
- [37] N. A. Jeske, A. M. Patwardhan, N. B. Ruparel, A. N. Akopian, M. S. Shapiro, and M. A. Henry, "A-kinase anchoring protein 150 controls protein kinase C-mediated phosphorylation and sensitization of TRPV1.," *Pain*, vol. 146, no. 3, pp. 301–7, Dec. 2009.
- [38] X. Zhang, J. Huang, and P. A. McNaughton, "NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels.," *EMBO J.*, vol. 24, no. 24, pp. 4211–23, Dec. 2005.
- [39] N. Hellwig, N. Albrecht, C. Harteneck, G. Schultz, and M. Schäfer, "Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits.," *J. Cell Sci.*, vol. 118, no. Pt 5, pp. 917–28, Mar. 2005.
- [40] B. Liu, C. Zhang, and F. Qin, "Functional recovery from desensitization of vanilloid receptor TRPV1 requires resynthesis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate.," *J. Neurosci.*, vol. 25, no. 19, pp. 4835–43, May 2005.
- [41] V. Lukacs, Y. Yudin, G. R. Hammond, E. Sharma, K. Fukami, and T. Rohacs, "Distinctive changes in plasma membrane phosphoinositides underlie differential

- regulation of TRPV1 in nociceptive neurons.," *J. Neurosci.*, vol. 33, no. 28, pp. 11451–63, 2013.
- [42] C. A. Ufret-Vincenty, R. M. Klein, L. Hua, J. Angueyra, and S. E. Gordon, "Localization of the PIP2 sensor of TRPV1 ion channels," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 11, pp. 9688–9698, 2011.
- [43] E. N. Senning, M. D. Collins, A. Stratiievska, C. A. Ufret-Vincenty, and S. E. Gordon, "Regulation of TRPV1 ion channel by phosphoinositide (4,5)-bisphosphate: the role of membrane asymmetry.," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 16, pp. 10999–1006, Apr. 2014.
- [44] C. Morenilla-Palao, R. Planells-Cases, N. García-Sanz, and A. Ferrer-Montiel, "Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity.," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 24, pp. 25665–72, Jun. 2004.
- [45] C. Goswami, M. Dreger, R. Jahnel, O. Bogen, C. Gillen, and F. Hucho, "Identification and characterization of a Ca²⁺ -sensitive interaction of the vanilloid receptor TRPV1 with tubulin.," *Journal of neurochemistry*, vol. 91, no. 5. pp. 1092–103, Dec-2004.
- [46] S. Laínez, P. Valente, I. Ontoria-Oviedo, J. Estévez-Herrera, M. Camprubí-Robles, A. Ferrer-Montiel, and R. Planells-Cases, "GABAA receptor associated protein (GABARAP) modulates TRPV1 expression and channel function and desensitization.," *FASEB J.*, vol. 24, no. 6, pp. 1958–70, Jun. 2010.
- [47] A. Y. Kim, Z. Tang, Q. Liu, K. N. Patel, D. Maag, Y. Geng, and X. Dong, "Pirt, a phosphoinositide-binding protein, functions as a regulatory subunit of TRPV1.," *Cell*, vol. 133, no. 3, pp. 475–85, May 2008.
- [48] C. Bavassano, L. Marvaldi, M. Langeslag, B. Sarg, H. Lindner, L. Klimaschewski, M. Kress, A. Ferrer-Montiel, and H.-G. Knaus, "Identification of voltage-gated K(+) channel beta 2 (Kvβ2) subunit as a novel interaction partner of the pain transducer Transient Receptor Potential Vanilloid 1 channel (TRPV1).," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1833, no. 12, pp. 3166–75, Dec. 2013.
- [49] P. Cesare and P. McNaughton, "A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, no. 26, pp. 15435–9, Dec. 1996.
- [50] P. Cesare, L. V Dekker, A. Sardini, P. J. Parker, and P. A. McNaughton, "Specific involvement of PKC-epsilon in sensitization of the neuronal response to painful heat.," *Neuron*, vol. 23, no. 3, pp. 617–24, Jul. 1999.
- [51] M. Numazaki, T. Tominaga, H. Toyooka, and M. Tominaga, "Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase Cepsilon and identification of two target serine residues.," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 16, pp. 13375–8, Apr. 2002.
- [52] G. Bhave, H.-J. Hu, K. S. Glauner, W. Zhu, H. Wang, D. J. Brasier, G. S. Oxford, and R. W. Gereau, "Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1).," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, pp. 12480–12485, 2003.
- [53] C. Distler, P. K. Rathee, K. S. Lips, O. Obreja, W. Neuhuber, and M. Kress, "Fast Ca²⁺-induced potentiation of heat-activated ionic currents requires cAMP/PKA signaling and functional AKAP anchoring.," *J. Neurophysiol.*, vol. 89, no. 5, pp. 2499–505, May 2003.

- [54] R.-R. Ji, T. A. Samad, S.-X. Jin, R. Schmoll, and C. J. Woolf, "p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia.," *Neuron*, vol. 36, no. 1, pp. 57–68, Sep. 2002.
- [55] R. Bron, L. J. Klesse, K. Shah, L. F. Parada, and J. Winter, "Activation of Ras is necessary and sufficient for upregulation of vanilloid receptor type 1 in sensory neurons by neurotrophic factors," *Mol. Cell. Neurosci.*, vol. 22, pp. 118–132, 2003.
- [56] P. Puntambekar, D. Mukherjea, S. Jajoo, and V. Ramkumar, "Essential role of Rac1/NADPH oxidase in nerve growth factor induction of TRPV1 expression," *J. Neurochem.*, vol. 95, pp. 1689–1703, 2005.
- [57] I. Vetter, B. D. Wyse, G. R. Monteith, S. J. Roberts-Thomson, and P. J. Cabot, "The mu opioid agonist morphine modulates potentiation of capsaicin-evoked TRPV1 responses through a cyclic AMP-dependent protein kinase A pathway.," *Mol. Pain*, vol. 2, p. 22, Jan. 2006.
- [58] J. Endres-Becker, P. A. Heppenstall, S. A. Mousa, D. Labuz, A. Oksche, M. Schäfer, C. Stein, and C. Zöllner, "-Opioid Receptor Activation Modulates Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) Currents in Sensory Neurons in A Model of Inflammatory Pain," *Animals*, vol. 71, no. 1, pp. 12–18, 2007.
- [59] A. M. Patwardhan, N. A. Jeske, T. J. Price, N. Gamper, A. N. Akopian, and K. M. Hargreaves, "The cannabinoid WIN 55,212-2 inhibits transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and evokes peripheral antihyperalgesia via calcineurin.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, pp. 11393–11398, 2006.
- [60] W. Wang, X. Cao, C. Liu, and L. Liu, "Cannabinoid WIN 55,212-2 inhibits TRPV1 in trigeminal ganglion neurons via PKA and PKC pathways.," *Neurol. Sci.*, vol. 33, no. 1, pp. 79–85, Feb. 2012.
- [61] S. Derry, A. Sven-Rice, P. Cole, T. Tan, and R. A. Moore, "Topical capsaicin (high concentration) for chronic neuropathic pain in adults.," *Cochrane database Syst. Rev.*, vol. 2, p. CD007393, 2013.
- [62] J.-D. Brederson, P. R. Kym, and A. Szallasi, "Targeting TRP channels for pain relief.," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 716, no. 1–3, pp. 61–76, Sep. 2013.
- [63] D. Jaquemar, T. Schenker, and B. Trueb, "An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, pp. 7325–7333, 1999.
- [64] G. M. Story, A. M. Peier, A. J. Reeve, S. R. Eid, J. Mosbacher, T. R. Hricik, T. J. Earley, A. C. Hergarden, D. A. Andersson, S. W. Hwang, P. McIntyre, T. Jegla, S. Bevan, and A. Patapoutian, "ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures," *Cell*, vol. 112, pp. 819–829, 2003.
- [65] J. F. Doerner, G. Gisselmann, H. Hatt, and C. H. Wetzel, "Transient receptor potential channel A1 is directly gated by calcium ions," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, pp. 13180–13189, 2007.
- [66] S. Zurborg, B. Yurgionas, J. A. Jira, O. Caspani, and P. A. Heppenstall, "Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca²⁺.," *Nat. Neurosci.*, vol. 10, no. 3, pp. 277–9, Mar. 2007.
- [67] S.-E. Jordt, D. M. Bautista, H.-H. Chuang, D. D. McKemy, P. M. Zygmunt, E. D. Högestätt, I. D. Meng, and D. Julius, "Mustard oils and cannabinoids excite

- sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1.," *Nature*, vol. 427, pp. 260–265, 2004.
- [68] D. M. Bautista, S. E. Jordt, T. Nikai, P. R. Tsuruda, A. J. Read, J. Poblete, E. N. Yamoah, A. I. Basbaum, and D. Julius, "TRPA1 Mediates the Inflammatory Actions of Environmental Irritants and Proalgesic Agents," *Cell*, vol. 124, pp. 1269–1282, 2006.
- [69] C. R. McNamara, J. Mandel-Brehm, D. M. Bautista, J. Siemens, K. L. Deranian, M. Zhao, N. J. Hayward, J. A. Chong, D. Julius, M. M. Moran, and C. M. Fanger, "TRPA1 mediates formalin-induced pain.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, pp. 13525–13530, 2007.
- [70] B. F. Bessac, M. Sivula, C. A. Von Hehn, J. Escalera, L. Cohn, and S. E. Jordt, "TRPA1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons," *J. Clin. Invest.*, vol. 118, pp. 1899–1910, 2008.
- [71] B. F. Bessac, M. Sivula, C. A. von Hehn, A. I. Caceres, J. Escalera, and S.-E. Jordt, "Transient receptor potential ankyrin 1 antagonists block the noxious effects of toxic industrial isocyanates and tear gases.," *FASEB J.*, vol. 23, no. 4, pp. 1102–14, Apr. 2009.
- [72] K. Kobayashi, T. Fukuoka, K. Obata, H. Yamanaka, Y. Dai, A. Tokunaga, and K. Noguchi, "Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with A δ /C-fibers and colocalization with Trk receptors," *J. Comp. Neurol.*, vol. 493, pp. 596–606, 2005.
- [73] C. Nassenstein, K. Kwong, T. Taylor-Clark, M. Kollarik, D. M. Macglashan, A. Braun, and B. J. Udem, "Expression and function of the ion channel TRPA1 in vagal afferent nerves innervating mouse lungs.," *J. Physiol.*, vol. 586, pp. 1595–1604, 2008.
- [74] T. E. Taylor-Clark, M. A. McAlexander, C. Nassenstein, S. A. Sheardown, S. Wilson, J. Thornton, M. J. Carr, and B. J. Udem, "Relative contributions of TRPA1 and TRPV1 channels in the activation of vagal bronchopulmonary C-fibres by the endogenous autacoid 4-oxononenal.," *J. Physiol.*, vol. 586, pp. 3447–3459, 2008.
- [75] R. Atoyán, D. Shander, and N. V. Botchkareva, "Non-neuronal expression of transient receptor potential type A1 (TRPA1) in human skin.," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 129, no. 9, pp. 2312–5, Sep. 2009.
- [76] T. L. Cvetkov, K. W. Huynh, M. R. Cohen, and V. Y. Moiseenkova-Bell, "Molecular architecture and subunit organization of TRPA1 ion channel revealed by electron microscopy," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, pp. 38168–38176, 2011.
- [77] X. Zhang, L. Li, and P. A. McNaughton, "Proinflammatory mediators modulate the heat-activated ion channel TRPV1 via the scaffolding protein AKAP79/150.," *Neuron*, vol. 59, no. 3, pp. 450–61, Aug. 2008.
- [78] T. Iglesias, N. Cabrera-Poch, M. P. Mitchell, T. J. Naven, E. Rozengurt, and G. Schiavo, "Identification and cloning of Kidins220, a novel neuronal substrate of protein kinase D.," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 51, pp. 40048–56, Dec. 2000.
- [79] H. Kong, J. Boulter, J. L. Weber, C. Lai, and M. V. Chao, "An evolutionarily conserved transmembrane protein that is a novel downstream target of neurotrophin and ephrin receptors.," *J. Neurosci.*, vol. 21, no. 1, pp. 176–85, Jan. 2001.

- [80] A. Bracale, F. Cesca, V. E. Neubrand, T. P. Newsome, M. Way, and G. Schiavo, "Kidins220 / ARMS Is Transported by a Kinesin-1 – based Mechanism Likely to be Involved in Neuronal Differentiation □," vol. 18, no. January, pp. 142–152, 2007.
- [81] F. Cesca, A. Yabe, B. Spencer-Dene, A. Arrigoni, M. Al-Qatari, D. Henderson, H. Phillips, M. Koltzenburg, F. Benfenati, and G. Schiavo, "Kidins220/ARMS is an essential modulator of cardiovascular and nervous system development.," *Cell Death Dis.*, vol. 2, no. 11, p. e226, Jan. 2011.
- [82] F. Cesca, A. Yabe, B. Spencer-Dene, J. Scholz-Starke, L. Medrihan, C. H. Maden, H. Gerhardt, I. R. Orriss, P. Baldelli, M. Al-Qatari, M. Koltzenburg, R. H. Adams, F. Benfenati, and G. Schiavo, "Kidins220/ARMS mediates the integration of the neurotrophin and VEGF pathways in the vascular and nervous systems.," *Cell Death Differ.*, vol. 19, no. 2, pp. 194–208, Feb. 2012.
- [83] R. M. Jean-Mairet, C. López-Menéndez, L. Sánchez-Ruiloba, S. Sacristán, M. Rodríguez-Martínez, L. Riol-Blanco, P. Sánchez-Mateos, F. Sánchez-Madrid, J. L. Rodríguez-Fernández, M. R. Campanero, and T. Iglesias, "The neuronal protein Kidins220/ARMS associates with ICAM-3 and other uropod components and regulates T-cell motility," *Eur. J. Immunol.*, vol. 41, pp. 1035–1046, 2011.
- [84] S. H. Wu, J. C. Arévalo, F. Sarti, L. Tessarollo, W.-B. Gan, and M. V. Chao, "Ankyrin Repeat-rich Membrane Spanning/Kidins220 protein regulates dendritic branching and spine stability in vivo.," *Dev. Neurobiol.*, vol. 69, no. 9, pp. 547–57, Aug. 2009.
- [85] A. M. Higuero, L. Sánchez-Ruiloba, L. E. Doglio, F. Portillo, J. Abad-Rodríguez, C. G. Dotti, and T. Iglesias, "Kidins220/ARMS modulates the activity of microtubule-regulating proteins and controls neuronal polarity and development.," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 2, pp. 1343–57, Jan. 2010.
- [86] L. Sánchez-Ruiloba, N. Cabrera-Poch, M. Rodríguez-Martínez, C. López-Menéndez, R. M. Jean-Mairet, A. M. Higuero, and T. Iglesias, "Protein kinase D intracellular localization and activity control kinase D-interacting substrate of 220-kDa traffic through a postsynaptic density-95/discs large/zonula occludens-1-binding motif.," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 27, pp. 18888–900, Jul. 2006.
- [87] J. C. Arévalo, H. Yano, K. K. Teng, and M. V. Chao, "A unique pathway for sustained neurotrophin signaling through an ankyrin-rich membrane-spanning protein.," *EMBO J.*, vol. 23, no. 12, pp. 2358–68, Jun. 2004.
- [88] Y.-H. Liao, S.-M. Hsu, and P.-H. Huang, "ARMS depletion facilitates UV irradiation induced apoptotic cell death in melanoma.," *Cancer Res.*, vol. 67, no. 24, pp. 11547–56, Dec. 2007.
- [89] Y. H. Liao, S. M. Hsu, H. L. Yang, M. S. Tsai, and P. H. Huang, "Upregulated ankyrin repeat-rich membrane spanning protein contributes to tumour progression in cutaneous melanoma.," *Br. J. Cancer*, vol. 104, no. 6, pp. 982–8, Mar. 2011.
- [90] J. C. Arévalo, S. H. Wu, T. Takahashi, H. Zhang, T. Yu, H. Yano, T. A. Milner, L. Tessarollo, I. Ninan, O. Arancio, and M. V. Chao, "The ARMS/Kidins220 scaffold protein modulates synaptic transmission.," *Mol. Cell. Neurosci.*, vol. 45, no. 2, pp. 92–100, Oct. 2010.
- [91] J. C. Arévalo, D. B. Pereira, H. Yano, K. K. Teng, and M. V. Chao, "Identification of a switch in neurotrophin signaling by selective tyrosine phosphorylation.," *J.*

- Biol. Chem.*, vol. 281, no. 2, pp. 1001–7, Jan. 2006.
- [92] S. Deswal, A. Meyer, G. J. Fiala, A. E. Eisenhardt, L. C. Schmitt, M. Salek, T. Brummer, O. Acuto, and W. W. a Schamel, “Kidins220/ARMS associates with B-Raf and the TCR, promoting sustained Erk signaling in T cells.,” *J. Immunol.*, vol. 190, no. 5, pp. 1927–35, Mar. 2013.
- [93] K. E. Brandao, M. L. Dell’Acqua, and S. R. Levinson, “A-kinase anchoring protein 150 expression in a specific subset of TRPV1- and CaV1.2-positive nociceptive rat dorsal root ganglion neurons,” *J. Comp. Neurol.*, vol. 520, no. 1, pp. 81–99, 2012.
- [94] J. Peter, C. Kasper, M. Kaufholz, R. Buschow, J. Isensee, T. Hucho, F. W. Herberg, F. Schwede, C. Stein, S.-E. Jordt, M. Brackmann, and V. Spahn, “Ankyrin-rich membrane spanning protein as a novel modulator of transient receptor potential vanilloid 1-function in nociceptive neurons,” *Eur. J. Pain*, vol. 21, no. 6, pp. 1072–1086, Jul. 2017.
- [95] S. Yamano, J. Dai, and A. M. Moursi, “Comparison of transfection efficiency of nonviral gene transfer reagents,” *Mol. Biotechnol.*, vol. 46, no. 3, pp. 287–300, 2010.
- [96] M. C. Durán, S. Willenbrock, A. Barchanski, J.-M. V Müller, A. Maiolini, J. T. Soller, S. Barcikowski, I. Nolte, K. Feige, and H. Murua Escobar, “Comparison of nanoparticle-mediated transfection methods for DNA expression plasmids: efficiency and cytotoxicity,” *J. Nanobiotechnology*, vol. 9, no. 1, p. 47, 2011.
- [97] A. Asgharian, M. Banan, and H. Najmabadi, “Optimizing a lipocomplex-based gene transfer method into HeLa cell line,” *Cell J.*, vol. 15, no. 4, pp. 372–377, 2014.
- [98] N. R. Gavva, L. Klionsky, Y. Qu, L. Shi, R. Tamir, S. Edenson, T. J. Zhang, V. N. Viswanadhan, A. Toth, L. V. Pearce, T. W. Vanderah, F. Porreca, P. M. Blumberg, J. Lile, Y. Sun, K. Wild, J. C. Louis, and J. J. S. Treanor, “Molecular Determinants of Vanilloid Sensitivity in TRPV1,” *J. Biol. Chem.*, vol. 279, pp. 20283–20295, 2004.
- [99] A. Tóth, P. M. Blumberg, Z. Chen, and A. P. Kozikowski, “Design of a high-affinity competitive antagonist of the vanilloid receptor selective for the calcium entry-linked receptor population.,” *Mol. Pharmacol.*, vol. 65, pp. 282–291, 2004.
- [100] I. Vetter, W. Cheng, M. Peiris, B. D. Wyse, S. J. Roberts-Thomson, J. Zheng, G. R. Monteith, and P. J. Cabot, “Rapid, opioid-sensitive mechanisms involved in transient receptor potential vanilloid 1 sensitization.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 28, pp. 19540–50, Jul. 2008.
- [101] R. Zhao and S. Y. Tsang, “Versatile Roles of Intracellularly Located TRPV1 Channel,” *Journal of Cellular Physiology*, vol. 232, no. 8, pp. 1957–1965, 2017.
- [102] P. A. Koplas, R. L. Rosenberg, and G. S. Oxford, “The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons.,” *J. Neurosci.*, vol. 17, no. 10, pp. 3525–37, May 1997.
- [103] R. A. Engh, A. Girod, V. Kinzel, R. Huber, and D. Bossemeyer, “Crystal structures of catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in complex with isoquinolinesulfonyl protein kinase inhibitors H7, H8, and H89. Structural implications for selectivity.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 42, pp. 26157–26164, 1996.

- [104] S. P. Davies, H. Reddy, M. Caivano, and P. Cohen, "Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors.," *Biochem. J.*, vol. 351, no. Pt 1, pp. 95–105, 2000.
- [105] R. J. de Wit, D. Hekstra, B. Jastorff, W. J. Stec, J. Baraniak, R. Van Driel, and P. J. Van Haastert, "Inhibitory action of certain cyclophosphate derivatives of cAMP on cAMP-dependent protein kinases," *Eur. J. Biochem.*, vol. 142, no. 2, pp. 255–60, 1984.
- [106] G. D. Dalton and W. L. Dewey, "Protein kinase inhibitor peptide (PKI): A family of endogenous neuropeptides that modulate neuronal cAMP-dependent protein kinase function," *Neuropeptides*, vol. 40, no. 1. pp. 23–34, 2006.
- [107] L. Li, R. Hasan, and X. Zhang, "The basal thermal sensitivity of the TRPV1 ion channel is determined by PKC β II.," *J. Neurosci.*, vol. 34, no. 24, pp. 8246–58, 2014.
- [108] V. Spahn, C. Stein, and C. Zöllner, "Modulation of transient receptor vanilloid 1 activity by transient receptor potential ankyrin 1.," *Mol. Pharmacol.*, vol. 85, no. 2, pp. 335–44, Feb. 2014.
- [109] I. Nozadze, N. Tsiklauri, G. Gurtskaia, and M. G. Tsagareli, "Role of thermo TRPA1 and TRPV1 channels in heat, cold, and mechanical nociception of rats.," *Behav. Pharmacol.*, vol. 27, no. 1, pp. 29–36, 2015.
- [110] A. N. Akopian, N. B. Ruparel, N. A. Jeske, and K. M. Hargreaves, "Transient receptor potential TRPA1 channel desensitization in sensory neurons is agonist dependent and regulated by TRPV1-directed internalization.," *J. Physiol.*, vol. 583, no. Pt 1, pp. 175–93, 2007.
- [111] S. Kim, C. Kang, C. Y. Shin, S. W. Hwang, Y. D. Yang, W. S. Shim, M.-Y. Park, E. Kim, M. Kim, B.-M. Kim, H. Cho, Y. Shin, and U. Oh, "TRPV1 recapitulates native capsaicin receptor in sensory neurons in association with Fas-associated factor 1.," *J. Neurosci.*, vol. 26, pp. 2403–2412, 2006.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Christian Kasper, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Die Modulation des TRPV1 Kanals durch das Adapterprotein ARMS" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Christian Kasper hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Jessica Peter*, **Christian Kasper***, Melanie Kaufholz, René Buschow, Jörg Isensee, Tim Hucho, Friedrich W. Herberg, Frank Schwede, Christoph Stein, Sven-Eric Jordt, Marian Brackmann, Viola Spahn. "Ankyrin-rich membrane spanning protein as a novel modulator of transient receptor potential vanilloid 1-function in nociceptive neurons," *Eur. J. Pain*, vol. 21, no. 6, pp. 1072–1086, Jul. 2017.

* *geteilte Erstauferschaft*

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):

Design von Experimenten

Erhebung und Interpretation der Daten

Mitgestaltung des Manuskriptes

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Jessica Peter*, **Christian Kasper***, Melanie Kaufholz, René Buschow, Jörg Isensee, Tim Hucho, Friedrich W. Herberg, Frank Schwede, Christoph Stein, Sven-Eric Jordt, Marian Brackmann, Viola Spahn. "Ankyrin-rich membrane spanning protein as a novel modulator of transient receptor potential vanilloid 1-function in nociceptive neurons," *Eur. J. Pain*, vol. 21, no. 6, pp. 1072–1086, Jul. 2017.
* *geteilte Erstaautorenschaft*

Kongressbeitrag:

Kasper C, Khalighy P, Galler A, Thalemann R, Raile K, Vergleich der krankheitsspezifischen Belastung bei Familien mit jungen Kindern mit Typ-1 Diabetes in Abhängigkeit von der Therapieform (Pumpe versus ICT).DGKJ 2010; PV-225. Postervortrag

Khalighy P, **Kasper C**, Galler A, Thalemann R, Raile K, Psychosoziale Risikoindikatoren für eine schlechte Stoffwechseleinstellung bei Jugendlichen mit Typ-1 Diabetes während der Pubertät. DGKJ 2010; PV-226. Postervortrag

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Christoph Stein bedanken, für die Möglichkeit diese Arbeit im Forschungslabor der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin am Campus Benjamin Franklin durchzuführen sowie für seine Anregungen und Kommentare um dieses Manuskript fertig zu stellen.

Meinem Betreuer Herrn Dr. Marian Brackmann danke ich für das Heranführen an mein Promotionsthema sowie an das wissenschaftliche Arbeiten und für die enge Betreuung während der experimentellen Phase dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Viola Spahn für ihre Geduld, Ermutigung und Betreuung während der Schreibphase. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht zum Abschluss gekommen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Tim Hucho für die Möglichkeit einen Teil meiner experimentellen Arbeit am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik Berlin durchzuführen. Hier gilt im Speziellen mein Dank René Buschow.

Ich danke meiner Mit-Doktorandin Frau Jessica Peter für die gemeinsame Zeit, die durch gegenseitige fachliche wie emotionale Unterstützung eine ganz besondere war.

Meiner ganzen Familie, insbesondere meinen Eltern, danke ich für ihre ständige Unterstützung, Förderung und ihrem Verständnis dafür, dass ich bei einigen Familienfeiern passen musste.

Schließlich danke ich meiner Frau, Stephanie Kasper, für ihre immerwährende Unterstützung, Ermutigung und Liebe.