

Aus dem Physiologischen Institut
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. med. M. Bleich)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Elektrophysiologische Charakterisierung der
Ionenkanäle TRPV1, TRPV3 und TRPV4
exprimiert in Xenopus Oozyten.**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Nils Hering
aus Cuxhaven

Kiel, 2015

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Baukrowitz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Ralph Lucius

Tag der mündlichen Prüfung: 16.03.2016

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 22.12.2015

gez. Prof. Dr. Johann Kuhtz-Buschbeck
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Abkürzungen

2-APB	2-Aminoethoxydiphenyl borate
2-AG	2-Arachidonylglycerol
4 α PDD	4 α -Phorbol 12,13-didecanoate
Abb.	Abbildung
AM404	N-arachidonoylaminophenol
ATP	Adenosintriphosphat
Ca ²⁺	Calcium
Cap.	Capsaicin
CoA	Coenzym A
cRNA	mRNA aus in vitro-Synthese von komplementärer DNA
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
H	Hill-Koeffizient
KCl	Kaliumchlorid
LC-CoA	langkettige Fettsäure-Ester mit CoA
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
PI(4,5)P ₂ diC8	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat diC8, kurzkettiges PtdIns(4,5)P ₂
pKa	Säurekonstante
PolyK	Polylysin
PtdIns(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (auch: PIP ₂ , LC-PIP ₂)
RR	Ruthenium Rot
RTX	Resiniferatoxin
SEM	Standartfehler des Mittelwertes
Tab.	Tabelle
TPA	Tetrapentylammonium
TRPV1	Transient receptor potential cation channel, Unterfamilie V, Mitglied 1
TRPV2	Transient receptor potential cation channel, Unterfamilie V, Mitglied 2
TRPV3	Transient receptor potential cation channel, Unterfamilie V, Mitglied 3
TRPV4	Transient receptor potential cation channel, Unterfamilie V, Mitglied 4

Inhaltsverzeichnis

Seiten

Zusammenfassung	7
1. Einleitung	10
1.1 TRP Ionenkanäle – Ein Überblick	10
1.1.1 Die Familie der TRPV Kanäle	11
1.1.2 Vorkommen der TRPV1 Kanäle	13
1.1.3 Vorkommen der TRPV2 Kanäle	13
1.1.4 Vorkommen der TRPV3 Kanäle	13
1.1.5 Vorkommen der TRPV4 Kanäle	14
1.2 Aktivatoren und Inhibitoren der TRPV Kanäle	14
1.2.1 Aktivatoren und Inhibitoren der TRPV1 Kanäle	14
1.2.2 Aktivatoren und Inhibitoren der TRPV2 Kanäle	16
1.2.3 Aktivatoren und Inhibitoren der TRPV3 Kanäle	16
1.2.4 Aktivatoren und Inhibitoren der TRPV4 Kanäle	17
1.3 Physiologische Eigenschaften der TRPV Kanäle	18
1.3.1 Physiologische Eigenschaften der TRPV1 Kanäle	18
1.3.2 Physiologische Eigenschaften der TRPV2 Kanäle	19
1.3.3 Physiologische Eigenschaften der TRPV3 Kanäle	19
1.3.4 Physiologische Eigenschaften der TRPV4 Kanäle	20
1.4 Regulation von Ionenkanälen durch Phosphoinositide	21
1.4.1 Struktur und Stoffwechsel von Phosphoinositiden	21
1.4.2 Regulation der TRPV Kanäle durch Phosphoinositide	21
1.5 Regulation von Ionenkanälen durch LC-CoA Ester	23
1.5.1 Struktur und Stoffwechsel von LC-CoA Estern	23
1.5.2 Regulation der TRPV Kanäle durch LC-CoA Ester	23

1.6 Wirkung von Divalenten auf die TRPV Regulation	25
1.6.1 Wirkung von Ca^{2+} auf die TRPV Regulation	25
1.6.2 Wirkung von Mg^{2+} auf die TRPV Regulation	26
1.7 Regulation der TRPV Kanäle durch Protonenkonzentration	27
1.7.1 Regulation der TRPV1 Kanäle durch Protonenkonzentration	27
1.7.2 Regulation der TRPV2 Kanäle durch Protonenkonzentration	27
1.7.3 Regulation der TRPV3 Kanäle durch Protonenkonzentration	27
1.7.4 Regulation der TRPV4 Kanäle durch Protonenkonzentration	28
2. Ziele der Arbeit	29
3. Material und Methoden	30
3.1. Oozytenpräparation und Expression	30
3.2 Elektrophysiologie	30
3.3 Rezepte verwendeter Lösungen und Chemikalien	32
3.4 Datenaufnahme und Datenauswertung	34
4. Ergebnisse	35
4.1 Elektrophysiologische Charakterisierung der TRPV1 Ionenkanäle	35
4.1.1 Aktivierung der TRPV1 Ionenkanäle durch 2-APB	35
4.1.2 Aktivierung der TRPV1 Ionenkanäle durch intrazelluläre Capsaicin- und 2-APB Applikation	37
4.1.3 Wirkung von Polylysin auf die $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ abhängige Capsaicinaktivierung des TRPV1 Kanals	38
4.1.4 Wirkung von Mg^{2+} und Mg-ATP auf die Capsaicinresponse des TRPV1 Kanals	38

4.2 Untersuchungen zur Regulation durch Protonen des TRPV3 Kanals	41
4.2.1 Aktivierung der TRPV3 Ionenkanäle durch 2-APB	41
4.2.2 Regulation der TRPV3 Ionenkanäle durch intrazelluläre Protonenkonzentration	43
4.2.3 pH-Abhängigkeit der TRPV3 Ionenkanäle	44
4.2.4 pH-Dosis-Wirkungs-Kurve der TRPV3 Ionenkanäle	45
4.3 Untersuchungen zur Regulation durch Protonen des TRPV4 Kanals	47
4.3.1 Aktivierung der TRPV4 Ionenkanäle durch 4 α PDD	47
4.3.2 Regulation der TRPV4 Ionenkanäle durch intrazelluläre Protonenkonzentration	49
4.3.3 pH-Abhängigkeit der TRPV4 Ionenkanäle	50
4.3.4 pH-Abhängigkeitskurve der TRPV4 Ionenkanäle	51
5. Diskussion	53
5.1 Die TRPV Kanäle als Protonensensor	53
5.2 Molekulare Determinanten der TRPV1 Kanalmodulation	54
5.3 Stoffwechsellage der Zelle determiniert TRPV Kanalaktivität	56
5.4 Klinischer Bezug und Therapieansätze unter physiologischen Aspekten	56
6. Literatur- und Quellenverzeichnis	59
7. Summary	65
8. Anhang	67

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Ionenkanäle TRPV1, TRPV3 und TRPV4 elektrophysiologisch charakterisiert. Es wird über die Stimulation dieser Ionenkanäle durch spezifische und unspezifische Aktivatoren als auch über die Aktivierung von TRPV3 und TRPV4 durch intrazelluläre Protonen berichtet. Zusätzlich wurden Messungen am TRPV1 Kanal mit unterschiedlichen physiologischen Lösungen durchgeführt. Hierbei wurde eine Herabsetzung der TRPV1 Capsaicinresponse in der Anwesenheit von intrazellulärem Mg^{2+} festgestellt. In diesem Zusammenhang wird eine Regulation der intrazellulären Phosphoinositidkonzentration durch Mg^{2+} , welche die Capsaicinantwort des TRPV1 Kanals moduliert, diskutiert. Die Ionenkanäle wurden mittels der Patch-Clamp-Technik in der inside-out Konfiguration elektrophysiologisch untersucht. Die Expression fand in *Xenopus* Oozyten statt.

TRPV (Transient receptor potential vanilloid) Kanäle sind eine Unterfamilie der TRP Ionenkanäle. Die TRPV Kanäle können wiederum in zwei Untergruppen unterteilt werden, TRPV1-4 und TRPV5/6. Die TRPV1-4 Kanäle sind nicht selektive Kationenkanäle, welche durch eine Vielzahl von Stimuli aktiviert werden. Hierzu gehören Hitze, Vanilloide, osmotischer Stress und niedriger extrazellulärer pH. TRPV Kanäle werden von zahlreichen Zelltypen (Neuronen, Keratinozyten, Lungen-, Milz- und Nierenzellen) exprimiert und sind an einer Reihe von physiologischen Regulationsprozessen beteiligt. Hierzu gehören die Thermosensation inklusive Regulation der Körpertemperatur, die Schmerzempfindung, die Empfindung von Schärfe, die Osmoregulation, als auch pathologische Mechanismen der Onkologie.

Die in dieser Arbeit beschriebene Aktivierung der TRPV3 und TRPV4 Kanäle durch intrazelluläre Protonen liefert einen weiteren Beitrag zur elektrophysiologischen Charakterisierung dieser Kanäle und erweitert das Verständnis zur Schmerzentstehung im entzündeten Gewebe. Besonders die Regulation der TRPV3 und TRPV4 Kanäle durch Protonen ist bisher wenig erforscht. Es wird gezeigt, dass die Aktivierung der TRPV3 und TRPV4 Kanäle direkt von der intrazellulären Protonenkonzentration abhängt. Dieser Mechanismus ist für den Kanal TRPV3 besonders stark ausgeprägt, während TRPV4 nur eine leichte Protonensensitivität zeigt. Eine detaillierte Untersuchung der Ionenkanäle TRPV3 und TRPV4 bei verschiedenen intrazellulären pH-Werten ergab eine für den TRPV3 Kanal spezifische Dosis-Wirkungs-Beziehung. Die hierbei ermittelten Dosis-Wirkungs-Kurven des TRPV3 Kanals wurden in die Hill-Gleichung eingefügt und somit erfolgte die Berechnung des EC_{50} und des Hill-Koeffizienten. Hierbei zeigt der TRPV3 Kanal einen EC_{50} von $6,3 \pm 0,1$, einen Hill-Koeffizienten von $7,3 \pm 3,4$ und eine maximale Aktivierung bei pH 5,5. Eine weitere Reduktion des pH-Wertes, niedriger als pH 5,5, führt beim TRPV3 Kanal zu einer Verminderung der Leitfähigkeit. Der TRPV4 Kanal zeigt eine, in Relation zum spezifischen Aktivator 4α -Phorbol, leichte Aktivierung bei einem intrazellulären pH-Wert von 4.

Bei Messungen mit physiologischen Lösungen wurde festgestellt, dass die intrazelluläre Mg^{2+} Applikation zu einem deutlichen Rückgang der TRPV1 Aktivität führt. Die TRPV1 Aktivität konnte durch intrazelluläre Mg-ATP Gabe wieder hergestellt werden. Aktuelle Veröffentlichungen zeigen, dass speziell der TRPV1 Kanal einer Regulation durch phosphorylierte Lipide unterliegt. In diesem Kontext werden besonders die Phosphoinositide, wie Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ($PtdIns(4,5)P_2$), genannt.

Die Phosphoinositide sind natürlicher Bestandteil von Zellmembranen und an diversen Signaltransduktionskaskaden beteiligt. Für die Phospholipide wird vermutet, dass sie mit der Zellmembran und den TRPV Kanälen in Interaktion treten und über eine hierdurch induzierte Konformationsänderung die TRPV Kanalaktivität modulieren. So unterliegt auch die Aktivierbarkeit des TRPV1 Kanals durch Capsaicin diesem Modulationsmechanismus. Somit ist eine Aktivierung des TRPV1 Kanals nur möglich, wenn phosphorylierte Fettsäurederivate in ausreichender Menge in der Plasmamembran vorhanden sind.

Anhand der Untersuchungen wird postuliert, dass durch intrazelluläre Mg^{2+} Applikation, welches einen Cofaktor für bestimmte Phospholipasen darstellt, die cytosolische Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat Konzentration reduziert wird. Mg-ATP, welches als Substrat der Phosphoinositidsynthese dient, erhöht die intrazelluläre Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat Konzentration durch $PtdIns(4,5)P_2$ Neogenese. Die molekularen Mechanismen dieser durch phosphorylierte Fettsäurederivate modulierten Kanalaktivität beruhen wahrscheinlich auf strukturellen Veränderungen der TRPV Kanäle, welche durch die Lipidbindung induziert werden. Der hier beobachtete Regulationsmechanismus impliziert eine Verknüpfung der TRPV Kanäle mit dem zellulären Fettsäuremetabolismus. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die TRPV1 Kanäle diesen evolutionär konservierten Modulationsmechanismen durch Phospholipide unterliegen.

Publikationen

Hering N, Cordeiro S, Baukowitz T. TRPV channels are regulated by the intracellular pH. Acta Physiologica, Official Journal Of The Federation Of European Physiological Societies, Abstracts of the 93rd Annual Meeting of the German Physiological Society. 13-15 March 2014, Mainz, Germany.

Cordeiro S, Hering N, Baukowitz T. Functional characterization of heteromeric TRPV channels. Acta Physiologica, Official Journal Of The Federation Of European Physiological Societies, Abstracts of the 93rd Annual Meeting of the German Physiological Society. 13-15 March 2014, Mainz, Germany.

Hering N, Cordeiro S, Baukowitz T. Intracellular pH regulates TRPV1-4 channels. 19. Annual Meeting "Physiologen im Ostseeraum", 09-10 May 2014, Lübeck, Germany

1. Einleitung

1.1 TRP Ionenkanäle – Ein Überblick

Die Transient Receptor Potential (TRP)-Kanäle sind eine umfangreiche Gruppe membranständiger nichtselektiver Kationenkanäle. Obwohl es sich dabei um Kationenkanäle mit hoher Sequenzhomologie und Strukturähnlichkeit handelt, variieren sie stark in ihrer Ionenselektivität und Art der Aktivierung (Montell et al., 2002).

TRP Kanäle wurden erstmals in der Licht-Signaltransduktion von *Drosophila melanogaster* entdeckt (Minke et al., 1975). Hier liegt der Ursprung für die Bezeichnung TRP Kanäle. Durch eine Mutation des TRP Gens in *Drosophila melanogaster* erfolgt eine transiente Reaktion der Photorezeptoren auf Lichtreize oder Depolarisation. Dieser schnell inaktivierende Membranstrom findet sich hingegen beim Wildtyp nicht, hier hält der Strom an, solange Licht auf die Photorezeptoren fällt. Die 10-fache Abnahme des durch Licht induzierten Kalzium-Einstroms, führte zu der Genbezeichnung TRP bei diesem Phänotyp.

TRP Kanäle werden sowohl in erregbaren als auch in nichterregbaren Zellen exprimiert (Clapham et al., 2001). Die großen strukturellen Unterschiede dieser Proteinfamilie korrelieren mit dem umfangreichen Aufgabenspektrum, welches durch die TRP Kanäle erfasst wird (Vriens et al., 2004). Nach aktuellem Wissensstand existieren sieben TRP Unterfamilien, welche man anhand ihrer strukturellen Eigenschaften in zwei Untergruppen einteilt (Montell et al., 2002).

Die erste Untergruppe der TRP Kanäle setzt sich aus folgenden Mitgliedern zusammen: TRPC (Canonical bzw. Classical), TRPV (Vanilloid), TRPM (Melastatin), TRPN (no mechanoreceptor potential C) und TRPA (Ankyrin). Diese Untergruppe weist überwiegende Sequenzgemeinsamkeiten in den Transmembrandomänen auf. Der zweiten Untergruppe der TRP Kanäle gehören folgende Mitglieder an: TRPP (Polycystin) und TRPML (Mucolipin). TRPP und TRPML unterscheiden sich durch geringe Sequenzübereinstimmungen und einer großen extrazellulären Schleife zwischen erster und zweiter Transmembrandomäne von der ersten Untergruppe (Clapham et al. 2005). Die TRPC Familie besteht aus sieben Mitgliedern (TRPC1 - TRPC7). Der TRPM Familie gehören acht Mitglieder an (TRPM1 - TRPM 8). Die TRPV Familie setzt sich aus sechs Mitgliedern zusammen (TRPV1 - TRPV6), die TRPML aus drei (TRPML1 - TRPML3) und die TRPP Familie aus drei kanalähnlichen (TRPP2, TRPP3, TRPP5) und weiteren fünf Mitgliedern, welche keine Kanalproteine sind. Die TRPA Familie beinhaltet nur ein in Säugern existierendes Mitglied (TRPA1). Eine Anwesenheit von TRPN, wurde bislang nur in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* und *Danio rerio* erforscht (Pedersen et al., 2005).

Die Strukturpostulate der TRP Kanäle wurden anhand von Gegenüberstellungen mit spannungsabhängigen Natrium-, Kalium- und Calciumkanälen erstellt. Charakteristisch fehlen bei den TRP Kanälen die positiv geladenen Aminosäuren im vierten Transmembransegment, welche den spannungsabhängigen Kanälen als Spannungssensor dienen. Das Auftreten von intrazellulären N- und C-Termini, sowie sechs Transmembransegmente (S1 - S6) sind typisch für alle TRP Kanaluntereinheiten. Es bestehen Variationen zwischen Sequenz und Länge der cytosolischen Termini zwischen den Unterfamilien, welche zur Unterteilung herangezogen werden können. Die Porenregion wird von der fünften und sechsten Transmembrandomäne und der sie verbindenden Schleife gebildet (Clapham et al., 2003).

Die Kanäle der Unterfamilie TRPN, TRPC, TRPA und TRPV weisen an ihrem N-Terminus zahlreiche Ankyrin-Repeats auf. Ankyrin-Repeats bestehen aus ca. 33 Aminosäuren und sind in unterschiedlichen Proteinen vorhanden (Michaely und Bennett, 1993). Es ist bekannt, dass diese Ankyrin-Repeats Membranproteine mit dem Cytoskelett verbinden, als auch für die Interaktion von TRP Kanaldomänen wichtig sind. Unterschiedliche Untersuchungen an TRPV6 zeigten, dass Ankyrin-Repeat drei (ANK 3) eine die Multimerisierung beeinflussende Interaktionsdomäne darstellt. Eine Entfernung dieser ANK 3 hat die Expression eines funktionslosen TRPV6 Kanals zur Folge (Erler et al., 2004; Lockwich et al., 2000; Lockwich et al., 2001).

TRP Kanäle sind aus vier Proteinuntereinheiten (Monomeren) aufgebaut. Man kann hierbei zwischen einem homologen und einem heterologen Ionenkanalaufbau unterscheiden. Für einige TRP Kanäle konnte bereits gezeigt werden, dass nicht nur eine Bildung von Homomultimeren möglich ist, sondern auch Heteromultimeren gebildet werden können. Dieses trifft zu auf: (TRPC1/TRPC4; TRPC1/TRPC5; TRPC3/TRPC6; TRPC5/TRPC3/ TRPC6; TRPV5/TRPV6) (Hellwig et al., 2005; Hofmann et al., 2002; Strubing et al., 2003; Hoenderop et al., 2003). Jedoch ist insgesamt über die Bildung von Heteromultimeren bei Mitgliedern der TRP Familie noch wenig bekannt und es sind wenige Daten vorhanden.

1.1.1 Die Familie der TRPV Kanäle

Die TRPV Kanal Unterfamilie hat sechs Mitglieder, welche in zwei Gruppen unterteilt werden: TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4 und TRPV5, TRPV6. Der vanilloid Receptor, TRPV1, ist der am besten verstandene Ionenkanal in dieser Klasse.

Der exprimierte TRPV1 Capsaicin Receptor ist ein Hitze, Protonen, Lipid und Spannungs modulierter Ionenkanal. Bei wärmeren Temperaturen, über 37°C, oder in Verbindung mit Capsaicin wird der TRPV1 Kanal auch im Bereich physiologischer Membranpotentiale stärker Spannungsaktiviert.

TRPV1 wird desensitiviert durch Calciumionen. TRPV1 wird durch die synthetische Verbindung 2-aminoethoxydiphenylborate (2-APB) aktiviert. Endogene Cannabinoide Rezeptor Liganden, wie Anandamide sind potentielle Agonisten von TRPV1. Die Größe der TRPV1 Ströme wird erhöht durch sauren pH und wird moduliert durch intrazelluläres PIP₂.

Experimente an TRPV1 knock-out Mäusen haben bestätigt, dass TRPV1 essentiell für die Wahrnehmung von Entzündungen, Hautverletzungen und Schmerz ist. TRPV1 Ströme werden durch den Entzündungsmediator Bradykinin und den Nerve Growth Factor verstärkt. Hierfür gibt es mehrere mögliche Wege; Diskutiert werden in diesem Zusammenhang eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) oder die Hydrolyse von PIP₂, als auch eine Beteiligung der Phosphatidylinositol 3-Kinase.

Der TRPV2 Kanal (vanilloid receptor-like channel) ist zu 50% identisch mit dem TRPV1 Kanal. Jedoch wird dieser Kanal nicht durch Capsaicin aktiviert. Wie TRPV1 ist er mehr permeabel für Calcium, als für Natrium. Es wird vermutet, dass der TRPV2 zur Wahrnehmung von für den Körper schädlicher Hitze dient; möglicherweise in wenig myelinisierten A delta Nociceptoren. Jedoch lässt das Vorkommen von TRPV2 in nicht sensorischen Geweben noch weitere Funktionen von TRPV2 vermuten.

TRPV2 wurde durch immunologische Untersuchungen in hypothalamischen, paraventriculären, suprachiasmatischen und supraoptischen Kernen nachgewiesen. Bevorzugt befindet er sich hierbei in oxytocinergen und vasopressinergen Neuronen und im Plexus myentericus als auch im Ganglion nodosum afferenter Neuronen.

TRPV2 Kanäle in Maus Gefäßmuskelzellen können als Dehnungssensoren fungieren. TRPV2 Kanäle werden runterreguliert durch die Aktivierung der Proteinkinase A in Mastzellen.

TRPV3 ist weit verbreitet, jedoch liegt sein häufigstes Vorkommen in der Haut. Ein Ansteigen der Temperatur von 22°C auf 40°C in Säugerzellen in denen hTRPV3 exprimiert wird hebt den intrazellulären Calciumspiegel an durch Erhöhung einer nichtselektiven Kationenleitfähigkeit.

Der TRPV3 Kanal ist somit thermosensitiv im selben physiologischen Bereich, welcher sich zwischen TRPM8 und TRPV1 befindet. Möglicherweise spielt der TRPV3 Kanal somit auch eine Rolle bei der Schmerzwahrnehmung.

TRPV4 ist zu circa 40% identisch zu TRPV1 und TRPV2. Wird TRPV4 in Säugerzellen exprimiert stellt er einen mäßig selektiven Ionenkanal dar, welcher wie TRPV1 eine leichte Auswärtsrektifizierung zeigt.

In isotonischen Medien ist TRPV4 aktiv. Der Stromfluss kann noch weiter erhöht werden durch Reduzierung der extrazellulären Osmolarität, welche zur Zellschwellung führt. Dieses führt zu 50% Aktivierung bei 270 mOsmol/l; physiologisch sind 290 mOsmol/l.

Hypertonische Lösungen, also eine Zellschrumpfung, führen zu einer Stromabnahme. Löschung der Ankyrin-Repeat Domäne im C-Terminus insensitiviert das Ansprechverhalten auf hypoosmolare Lösungen.

Anandamid und sein Metabolit Arachidonsäure aktivieren TRPV4 indirekt über die Cytochrom P450 Epoxygenase abhängige Formation von Epoxyeicosatrienoic Säure. Experimente mit TRPV4 knock-out Mäusen haben widersprüchliche Ergebnisse in Bezug auf osmolare Regulation des TRPV4 Kanals gezeigt. TRPV4 scheint als eine Art Osmolaritätswandler in primären afferenten nozizeptiven Nervenfasern, in Wasser undurchlässigen Nephron Segmenten und in menschlicher Atemwegsmuskulatur zu fungieren.

Der TRPV4 Kanal reagiert auch thermosensitiv. Keratinozyten, welche aus Maushaut isoliert wurden, zeigten starke TRPV4 Ströme durch einen langsamen Anstieg der Temperatur. TRPV4 knock-out Mäuse reagieren vermindert auf Druckänderungen, Hitze und saure Reize.

TRPV5 und TRPV6 stellen eine separate Unterfamilie der TRPV Familie dar. Sie sind nur zu circa 30% Prozent identisch mit TRPV1. Exprimiert sind TRPV5 und TRPV6 stark einwärtsrektifizierend und stellen die am stärksten Calcium selektiven TRP Kanäle dar.

Diese Eigenschaften stehen im Einklang mit den vorgeschlagenen Gatingmechanismen für Calcium selektive Kanäle, in denen die negativ geladene Glutaminsäure oder Asparaginsäure Reste zur Verfügung stellen, die eine Bindungsstelle für divalente Kationen innerhalb der Pore darstellen.

Intrazelluläres und extrazelluläres Calcium regulieren die TRPV6 Aktivität. Versuche an knock-out Mäusen und Nierenzellen lassen vermuten, dass TRPV5 und TRPV6 eine entscheidende Rolle bei der

Calciumaufnahme in Epithelzellen spielen. TRPV5 knock-out Mäuse zeigen eine verminderte renale Calciumrückresorption, was zu einer Hypercalciurie führt, trotz hohem Vitamin D Spiegel.

TRPV6 wird, wie andere TRP Kanäle, in Verbindung mit Krebsentwicklung genannt. So wurde TRPV6 auch als prognostischer Marker für Prostatakrebs verwendet (Clapham et al., 2005).

1.1.2 Vorkommen der TRPV1 Kanäle

Die TRPV1 Gene weisen eine vielfältige Gewebeverteilung auf. TRPV1 RNA wird in relativ hohen Leveln in Hinterwurzelganglien (DRG) exprimiert. In Ratten wurde TRPV1 im Rückenmark, hauptsächlich in sensorischen efferenten Fasern, gefunden.

TRPV1 wird in verschiedenen Hirnregionen wie Hypothalamus, Hippocampus und Substantia nigra, Niere und Harnblase exprimiert. Im Gehirn ist TRPV1 RNA auf eine kleine Anzahl von diskreten Zellen in bestimmten Hirnarealen begrenzt.

Die TRPV1 Expression ist nicht auf neuronale Zellen begrenzt. Auch Zellen wie Keratinozyten der Haut, Blasen Urothel, glatte Muskelzellen, Leber, polymorphkernigen Granulozyten und Makrophagen weisen TRPV1 Kanäle auf (Cortright et al., 2004).

1.1.3 Vorkommen der TRPV2 Kanäle

TRPV2 ist weitgehend in den Trigeminalganglien, im Rückenmark und in den Spinalganglien lokalisiert. TRPV2 wird hier hauptsächlich in Neuronen von mittleren bis großen Durchmesser exprimiert.

TRPV2 ist auch in vaskulären glatten Muskelzellen lokalisiert, wo es möglicherweise als Mechanosensor fungiert. TRPV2 wird auch in Aortamuskelzellen exprimiert. Es wird vermutet, dass TRPV2 hier osmotischen Stress registriert.

TRPV2 wurde nachgewiesen in Pankreasgangzellen und in Beta-Zellen, sowie in MIN6 Insulinomzellen. TRPV2 wurde auch in Verbindung gebracht mit Makrophagen und Prostatakrebszellchemotaxis. Jedoch sind in diesem Zusammenhang nur wenige Daten vorhanden.

Außerdem ist TRPV2 lokalisiert in paraventriculären, suprachiasmatischen und supraoptischen Kernen und mit oxytocinergen und vasopressinerge Neuronen kolokalisiert (Nedungadi et al., 2012).

Des Weiteren wird über eine Verteilung von TRPV2 in Haut, Milz, Lunge, Magen, Darm, Blase, Prostata und Blut berichtet (Qin et al., 2008).

1.1.4 Vorkommen der TRPV3 Kanäle

TRPV3 wird überwiegend in Keratinozyten exprimiert. Mittels PCR, Northern Blots und Immunologischen Verfahren konnte TRPV3 in menschlicher und Nagetier Haut nachgewiesen werden.

Im Hinblick auf neuronale Expression ist die Gegenwart von TRPV3 in menschlichen DRG-Neuronen fest etabliert. Des Weiteren wurde TRPV3 im N. trigeminus, Hippocampus, in oberen Halsnervenzellen, peripheren Nervenenden und bestimmten Hirnregionen nachgewiesen.

Die Expression von TRPV3 im zentralen Nervensystem umfasst die ventralen Motorneurone, tiefere Schichten des Hinterhorns und dopaminerge Neurone in der Substantia nigra.

Außer in der Haut und in Zellen des Nervensystems wird TRPV3 in Nasen- und Mundhöhle, insbesondere in Zunge und Gaumen exprimiert. Hier ist TRPV3 weitgehend auf Epithelschichten, welche der Mundhöhle zugewandt sind, beschränkt.

Das Vorkommen in der Zunge und am Gaumen kann bedeuten, dass TRPV3 bei der Geschmackswahrnehmung eine Rolle spielt und Derivate wie Carvacrol von Oregano erkennt (Joshi et al., 2010).

1.1.5 Vorkommen der TRPV4 Kanäle

TRPV4 mRNA Transkripte wurden in Epithelzellen der Nierentubuli gefunden, in der Stria vascularis der Cochlea, in Schweißdrüsen, und in den osmosensorischen Zellen der zirkumventrikulären Organe des Gehirns.

Außerdem wurde TRPV4 in folgenden Geweben identifiziert: Atemwege, glatte Muskulatur, Eileiter, Milz, Herz, Leber, Hoden, Keratinozyten, Innenohrhaarzellen und Hinterwurzelganglien. Dieses deutet darauf hin, dass Osmoregulation nur eine von vielen weiteren Funktionen von TRPV4 ist (Cuajungco et al., 2006).

1.2 Aktivatoren und Inhibitoren der TRPV Kanäle

1.2.1 Aktivatoren und Inhibitoren der TRPV1 Kanäle

Der TRPV1 Rezeptor, veraltet Vanilloid Receptor 1 (VR1) oder Capsaicin-Rezeptor, wurde ursprünglich nach seinem prominentesten Aktivator, dem Capsaicin, benannt. Die halb-maximale effektive Dosis (EC_{50}) von Capsaicin bei der Aktivierung von TRPV1 beträgt $0,39 \pm 0,05 \mu\text{M}$ (Kim et al., 2006).

Der aktuell verwendete Name Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) leitet sich von der Stoffgruppe der Vanilloide ab. Hierunter fallen Vanillylalkohol, Vanillin, Vanillinsäure, Acetovanillon, Vanillinmandelsäure, Homovanillinsäure und das bereits genannte Capsaicin. Alle diese Substanzen sind potente TRPV1 Aktivatoren.

Ein weiterer Aktivator der TRPV1 Kanäle ist das Endovanilloid Anandamid. Der EC_{50} für Anandamid wurde in einem Bereich von 6 - 10 μM in Trigemini Nervenzellen, DRG Neuronen und Hinterhorn Neuronen ermittelt (Ross et al., 2005).

Eine weitere Besonderheit des TRPV1 Kanals ist seine Aktivierbarkeit durch Temperaturerhöhung. So wurde in mehreren Studien gezeigt, dass es bei 42°C zu einer Hitzeaktivierung des TRPV1 Kanals kommt (Ahemaiti, 2010).

Des Weiteren haben pH Änderungen Einfluss auf den Aktivitätszustand des TRPV1 Kanals. Es ist bekannt, dass die beiden unterschiedlichen extrazellulären Aminosäurereste (E600 und E648) als Protonensensor dienen.

So haben pH Änderungen einen dualen Effekt auf den TRPV1 Kanal, bei niedrigem pH (unter pH 6) öffnet sich der Kanal. Bei höherem pH (pH 6-7) wird die Schwelle zur TRPV1 Aktivierung herabgesetzt, zum Beispiel für Capsaicinaktivierung. Jedoch scheint Protonenaktivierung von TRPV1 Spannungsabhängig zu sein (Aneiros et al., 2011).

TRPV1 wird dosisabhängig durch 2-APB aktiviert. Bei 0,3 - 1,0 mM 2-APB wird ein TRPV1 Strom hervorgerufen, der vergleichbar groß ist, wie bei Aktivierung durch 1 µM Capsaicin. Dieser Strom entspricht in Stromamplitude, als auch in Form der Strom-Spannungs-Kurve dem durch 1 µM Capsaicin hervorgerufenem Strom.

Der EC₅₀ für 2-APB Aktivierung wird für TRPV1 mit 197 ± 13 µM bei -100 mV angegeben und 130 ± 17 µM bei +100 mV (Hu et al., 2004).

Spannung ist ein partieller Aktivator der TRPV1 Kanäle. Depolarisation bewirkt einen submaximalen TRPV1 Strom. So beträgt V_{1/2} (Spannung für halbmaximale Aktivierung) unter Kontrollbedingungen 121 ± 6 mV. Capsaicin und Protonen verschieben den V_{1/2} auf 69 ± 8 mV und 48 ± 10 mV (Matta et al., 2007).

TRPV1 Kanäle können auch durch ein anderes, weniger häufiges Endocannabinoid aktiviert werden, N-arachidonoyldopamine (NADA) (Di Marzo et al., 2012).

Kampfer aktiviert TRPV1 in Säugetierzelllinien. Kampfer Aktivierung von TRPV1 ist dosisabhängig. Bei niedrigen Konzentrationen von 1 - 3 mM erhöhten sich die Auswärtsströme bei TRPV1 exprimierenden Zellen stärker, als die nach innen gerichteten Ströme. Bei höheren Konzentrationen von Campher (10 mM), kommt es zur Aktivierung und somit zu einem großen inneren und äußerem Stromfluss (Xu et al., 2005).

Außerdem können Phorbolster wie Phorbol-12-Myristat 13-Acetat TRPV1 direkt aktivieren; auch in Abwesenheit von PKC(Proteinkinase C)-Aktivität (Cortright et al., 2004).

Auch ist bekannt, dass TRPV1 direkt durch Diacylglycerol (DAG) in dorsalen Wurzelganglien Neuronen (DRG) von Ratten aktiviert werden kann (Woo et al., 2008).

Weitere Aktivatoren des TRPV1 Kanals sind: 20-hydroxyeicosatetraenoicssäure (20-HETE), Hydroperoxyeicosatetraenoicssäure 12-HPETE (Wen et al., 2012), Allyl isothiocyanate (AITC) (Gees et al., 2013), N-arachidonoylaminophenol (AM404) (Högestätt et al., 2005), Resiniferatoxin (Raisinghani et al., 2005) und Vogelspinnengift (Bohlen et al., 2010).

Als nicht kompetitive Antagonisten, sogenannte Porenblocker, von TRPV1 gelten: Ruthenium Rot (RR) und Tetrabutylammonium (TBA). Ruthenium Rot (RR) ist ein nicht kompetitiver Inhibitor aller TRP Kanäle. Diese Verbindung interagiert vermutlich nicht nur mit der Ligandenbindungsstelle der

TRP Kanäle, sondern blockiert anscheinend auch seine wässrige Pore. RR bindet mit hoher Potenz und in einer spannungsabhängigen Weise an den TRPV1 Kanal. Nach innen gerichtete Ströme werden hierbei effizient blockiert, jedoch nicht nach außen gerichtete Ströme. Handelsübliches RR ist ein Gemisch verschiedener Rutheniumderivate, aber überraschenderweise ist die aktive Komponente noch nicht charakterisiert worden. Tetrabutylammonium (TBA) blockiert die leitende Pore des TRPV1 Kanals. TBA gehört zu einer Familie von klassischen Kaliumkanalblocker, die vielfach zur Bestimmung von Poreneigenschaften der Ionenkanäle verwendet werden (Vriens et al., 2009).

Ein weiterer Blocker der TRPV1 Kanäle ist das Capsazepin. Sein IC_{50} wurde in HEK293 Zellen bestimmt und liegt bei $30,7 \pm 7,77$ nM (Sophion Bioscience, 2007). Außerdem wird Lanthanchlorid in einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ als TRPV1 Blocker verwendet (Mergler et al., 2011).

1.2.2 Aktivatoren und Inhibitoren der TRPV2 Kanäle

Es konnte gezeigt werden, dass der TRPV2 Kanal auf Wärme reagiert. Dieser Kanal wird von Temperaturen über 52°C aktiviert (Neeper et al., 2007).

Das psychoaktive Cannabinoid Tetrahydrocannabinol (THC), welches aus der Marihuana Pflanze (*Cannabis sativa*) stammt, war der erste natürliche Ligand für TRPV2, über den berichtet wurde. Jedoch ist dieser Aktivator wenig Potent. Der EC_{50} liegt bei $16 \mu\text{M}$ für rTRPV2 und bei $43 \mu\text{M}$ für hTRPV2. Die Derivate Cannabidiol und Cannabinol weisen einen EC_{50} von $3,7 \mu\text{M}$ und $77 \mu\text{M}$ auf. Probenecid ist der spezifischste TRPV2 Agonist, der bis jetzt bekannt ist. Probenecid ist ein synthetisches Produkt. Es aktiviert TRPV2 mit einem EC_{50} von $32 \mu\text{M}$. Es hat lediglich minimale Effekte auf die anderen TRP Kanäle (Shahidul Islam, 2011). Wie der TRPV1 Kanal, wird auch der TRPV2 Kanal durch die synthetische Substanz 2-APB aktiviert (Hu et al., 2004).

Ruthenium Rot blockt den TRPV2 Kanal mit einem IC_{50} von $0,6 \mu\text{M}$ (Benham et al., 2003). Auch dreiwertige Kationen wie Lanthan (La^{3+}) und Gadolinium (Gd^{3+}) werden als potente Blocker des TRPV2 Kanals beschrieben (Leffler et al., 2007).

1.2.3 Aktivatoren und Inhibitoren der TRPV3 Kanäle

Carvacrol bewirkt einen konzentrationsabhängigen Anstieg des intrazellulären Calciums in nativen Hirnarterienendothelzellen durch TRPV3 Aktivierung, der EC_{50} beträgt $34 \mu\text{M}$. Somit ist Carvacrol ein wirksamerer TRPV3 Agonist als Allylisothiocyanat ($EC_{50} = 400 \mu\text{M}$) oder Eugenol ($EC_{50} = 2,3$ mM) (Earley et al., 2010).

Zusätzlich zu Carvacrol haben Kampfer, Thymol und Menthol auch gezeigt, dass sie TRPV3 aktivieren. Interessanterweise ist Menthol auch ein bekannter Agonist für den kälte empfindlichen Kanal TRPM8. Auch TRPV3 ist ein thermosensitiver Kanal, er kann bei 37°C aktiviert werden (Vogt-Eisele et al., 2007).

2-APB ist ebenfalls ein potenter TRPV3 Aktivator. Kleine TRPV3 Ströme wurden als Reaktion auf $3,2 \mu\text{M}$ 2-APB beobachtet. Der EC_{50} für TRPV3 beträgt $28,3 \mu\text{M}$ bei $+80$ mV und $41,6 \mu\text{M}$ bei -80 mV mit scheinbarer Sättigung zwischen 100 und $320 \mu\text{M}$ (Chung et al., 2004).

In HEK293 Zellen zeigt der TRPV3 Kanal bei pH 7,4 in inside-out Patchen eine gewisse Grundaktivität. Sobald der intrazelluläre pH von 7,4 auf 5,5 geändert wird führt dieses zur TRPV3 Stromzunahme. Dieses zeigt, dass intrazelluläre Ansäuerung zur direkten Aktivierung des Kanals führt. Bei pH 6,5 ist eine TRPV3 Stromzunahme zu sehen, bei pH 5,5 erreicht der Stromfluss sein Maximum. Weitere Ansäuerung, zum Beispiel auf pH 4,5, führt zur Inhibition des Kanals (Cao et al., 2012).

Ein bekannter TRPV3 Blocker ist das Ruthenium Red. Es blockt Einwärtsströme mit einem IC_{50} von $2,4 \pm 0,4 \mu M$ (Chung et al., 2004).

1.2.4 Aktivatoren und Inhibitoren der TRPV4 Kanäle

Wie die TRPV Kanäle 1-3 wird auch der TRPV4 Kanal hitzeaktiviert. So konnte in HEK293 Zellen gezeigt werden, dass Erwärmung über eine Schwellentemperatur von $25^{\circ}C$ TRPV4 aktiviert. Die Aktivierung erfordert intakte N-terminale Ankyrin Wiederholungen (Watanabe et al., 2002).

Exogene Agonisten, welche TRPV4 stark aktivieren, sind 4α -Phorbolesterderivate. 4α -Phorboldidecanoate ($4\alpha PDD$) aktiviert TRPV4 mit einem EC_{50} von $0,2 \mu M$ (Flockerzi et al., 2007).

In chinesischen Hamster-Eierstockzellen (CHO) konnte mittels der Patch-Clamp-Technik gezeigt werden, dass der TRPV4 Kanal sensitiv auf Ansäuerung reagiert. Als Reagenz wurde Zitronensäure verwendet. Die Aktivierung des TRPV4 Kanals stellte sich ähnlich der vom TRPV1 Kanal dar, jedoch bei deutlich niedrigerem pH mit einem Maximum bei pH 4 (Suzuki et al., 2003).

Die TRPV4 Kanäle werden außerdem aktiviert durch: hypotonischen Stress (225 mOsm/kg) und GSK1016790A (GSK101, GlaxoSmithKline), welches einen sehr potenten Aktivator darstellt (Jin et al., 2010).

Es konnte auch nachgewiesen werden, dass osmotisch hervorgerufene Zellschwellung und mehrfach ungesättigte Fettsäuren TRPV4 in Säugetierzellen aktivierten (Loukin et al., 2009).

Das Endocannabinoid Anandamid und sein Metabolit Arachidonsäure aktivieren TRPV4 auf indirekte Weise über die Cytochrom-P450-abhängige Epoxygenase Bildung. Die Anwendung von $5'$, $6'$ -Epoxyeicosatrienoide Säure in submikromolaren Konzentrationen aktiviert TRPV4 und verursacht einen Calciumeinstrom in vaskulären Endothelzellen (Watanabe et al., 2003).

In isolierten Schweine-Chondrozyten konnte ein durch $10 \mu M$ $4\alpha PDD$ hervorgerufener Calciumeinstrom durch den TRP-Blocker Ruthenium Rot mit einem IC_{50} von ungefähr 5 nM inhibiert werden. Ein selektiver TRPV4 Kanalblocker ist GSK-205 (N-(4-{2 [methyl(phenylmethyl)amino]ethyl}phenyl)-5-(3-pyridinyl)-1,3-thiazol-2-aminehydrobromide), dieses blockiert den durch $10 \mu M$ $4\alpha PDD$ hervorgerufenen Calciumeinstrom mit einem IC_{50} von ungefähr 600 nM (Phan et al., 2009).

Der selektive TRPV4 Antagonist RN 1734 (2,4-Dichloro-N-isopropyl-N-(2-isopropylaminoethyl)benzenesulfonamide) blockiert Ströme mit einem IC_{50} von $2,3 \mu M$, $3,2 \mu M$ und $5,9 \mu M$ für hTRPV4, rTRPV4 und mTRPV4. RN 1734 blockiert TRPV4 vermittelte Vasodilatation in Arteriolen und erhöht den myogenen Tonus (Tocris Bioscience, 2014).

HC-067047 (2-Methyl-1-[3-(4-morpholinyl)propyl]-5-phenyl-N-[3-(trifluoromethyl)phenyl]-1H-pyrrole-3-carboxamide) ist ein potenter und selektiver TRPV4 Antagonist. Er blockt reversibel Ströme die durch Maus, menschlichen und Ratten TRPV4 hervorgerufen werden mit einem IC_{50} von 17 nM, 48 nM und 133 nM (Tocris Bioscience, 2014).

1.3 Physiologische Eigenschaften der TRPV Kanäle

1.3.1 Physiologische Eigenschaften der TRPV1 Kanäle

Die physiologische Bedeutung des TRPV1 Kanals ist, wie anhand der großen Anzahl der Aktivatoren erkennbar wird, nicht auf ein kleines Wirkungsspektrum reduzierbar. Bemerkenswerterweise hat sich jedoch eine physiologische Eigenschaft herauskristallisiert. Heute wird angenommen, dass der TRPV1 Kanal eine Schlüsselfunktion als thermosensorischer Wandler im Nervensystem einnimmt.

Eine zweite, wichtige physiologische Eigenschaft, die hiermit im Zusammenhang steht, ist die Beteiligung des Kanals an der Schmerzwahrnehmung, speziell von durch Hitze induziertem Schmerz. Somit kommt dem Kanal eine zentrale Rolle als Wärmesensor und speziell unter pathologischen Bedingungen als Entzündungssensor zu, wie aus genetischen und pharmakologischen TRPV1 knock-out Studien hervorgeht.

Ereignisse wie pH Änderung oder Temperaturänderung setzen die Erregbarkeitsschwelle des TRPV1 Kanals herab. TRPV1 Phosphorylierung durch die Proteinkinase C verringert die Wärme Rezeptor Schwelle, so kann es auch zur Aktivierung des Kanals bei Körpertemperatur kommen. Außerdem fördert PKC-Aktivierung die schnelle Rekrutierung von vesikulären Rezeptoren an der Zelloberfläche. Diese Umstände erlauben den Verdacht, dass der empfundene Schmerz beim Duschen von sonnenverbrannter Haut auf das Auftreten mehrerer molekularer Mechanismen zurückzuführen ist.

Die Rolle von TRPV1 im Zentralnervensystem ist immer noch schwer zu erfassen, der Kanal wird jedoch mit der Freisetzung von erregenden Neurotransmittern wie L-Glutamat, Noradrenalin und Dopamin in Verbindung gebracht.

TRPV1 wurde außerdem in Dermis und Epidermis gefunden (Meissner-Körperchen und Keratinozyten). Es wird angenommen, dass hier die TRPV1 Aktivierung zur Freisetzung von Mediatoren führt, welche die Schmerzschwelle herabsetzen. Eine Aktivierung des TRPV1 Rezeptors hat auch zur Inhibition der zellulären Proliferation in kultivierten Keratinozyten geführt. Zusätzlich zu einer Runterregulation von Haarwachstumsfaktoren und einer Hochregulierung von endogenen Haarwachstumsinhibitoren. Folglich deuten diese Ergebnisse auf eine wichtige Rolle von TRPV1 bei epithelialen Wachstumsstörungen hin.

Es ist auch zu erwähnen, dass TRPV1 Rezeptoren scheinbar in hohem Maße in viszerale Afferenzen und im gastrointestinalen Trakt exprimiert werden. Es wird vermutet, dass der TRPV1 Kanal Teil einer Schutzbarriere im Magen und Duodenum ist. Somit spielt dieser Rezeptor eine Rolle bei Entzündungen im Magen und Darmtrakt. TRPV1 wird in Verbindung gebracht mit Hypermotilität des Gastrointestinaltrakts, Bauchschmerzen, welche mit funktionellen Darmerkrankungen assoziiert sind und der neurogenen Komponente der Pankreatitis.

In der Harnblase werden funktionelle TRPV1 Kanäle gefunden, betroffen sind das Uroepithelium als auch die oberflächlichen und basalen Schichten. Hier wird eine Verknüpfung des Proteins zum Miktionsreflex unter normalen und pathologischen Bedingungen angenommen.

Im Gefäßsystem begleiten TRPV1 exprimierende Fasern die Blutgefäße in allen Schichten der Eingeweide. Diese Rezeptoren scheinen am Baylisseffekt und der myogenen Verengung beteiligt zu sein, welche zur Hypertonie führt. Darüber hinaus scheint TRPV1 zur Myokardprotektion beizutragen.

Ein weiteres Gewebe, welches TRPV1 Kanäle exprimiert, ist das Innenohr, wo das Protein in den äußeren und inneren Haarzellen vorhanden ist. Inwieweit TRPV1 am Hörvorgang beteiligt ist bleibt unbekannt, jedoch wurden Vanilloid induzierte Veränderungen der Cochleaempfindlichkeit nachgewiesen (Messeguer et al., 2006).

1.3.2 Physiologische Eigenschaften der TRPV2 Kanäle

Über die physiologische Bedeutung des TRPV2 Kanals ist bisher noch wenig bekannt. TRPV2 wird als hitzeaktivierbarer Kanal beschrieben, welcher in sensorischen Neuronen und in heterologen Expressionssystemen unter Einwirkung von Temperaturen über 52°C aktiviert wird. TRPV2 ist daher eine Komponente der physiologischen Reaktion auf schädliche thermische Reize.

Jedoch sind sensorische Neurone nicht der einzige Ort für TRPV2 Expression. Mehrere Studien wiesen TRPV2 in Zelltypen nach, denen Sinnesfunktionen fehlen, wie zum Beispiel Myozyten, Neutrophile Zellen, Insulinomazellen und Lebertumorzellen. Auch wenn TRPV2 hier scheinbar durch andere Reize außer Hitze aktiviert werden kann, so ist die physiologische Funktion dieser Expression in nicht sensorischen Zellen nicht geklärt (Stokes et al., 2005).

1.3.3 Physiologische Eigenschaften der TRPV3 Kanäle

Die am besten beschriebene physiologische Rolle des TRPV3 Kanals ist seine Fähigkeit zur Thermosensation und Schmerzempfindung, welche wahrscheinlich aus seiner Aktivierbarkeit bei Temperaturen zwischen 31-39°C stammt. Eine Temperaturaktivierung in diesem Rahmen wurde auch in kultivierten Keratinozyten nachgewiesen, in denen TRPV3 stark exprimiert ist. Seitdem gezeigt wurde, dass TRPV3 durch Temperaturen nahe der Körpertemperatur aktiviert wird, ist es wichtig, Faktoren zu finden, welche die Kanalaktivität unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen dämpfen oder verstärken.

Es wurde gezeigt, dass chemische oder thermische TRPV3 Agonisten eine Freisetzung von potentiellen Signalmolekülen wie Prostaglandin E₂ (PGE₂), Adenosintriphosphat (ATP), Stickstoffmonoxid (NO) und Interleukin 1 α (IL-1 α , TGF- β) induzieren. Obwohl Details zu diesen molekularen Mechanismen fehlen kann jedoch postuliert werden, dass TRPV3 Stimulation zu einem Calcium abhängigen Signalweg führt, welcher Exozytose oder eine Aktivierung von Enzymen bewirkt. So wurde in Keratinozyten eine Aktivierung der Cyclooxygenase mit Freisetzung von Prostaglandin E₂ nach Aktivierung von TRPV3 mittels chemischen und thermischen Agonisten beobachtet.

Des Weiteren ist bekannt, dass Wärme die ATP Freisetzung aus Keratinozyten fördert und Keratinozyten, welche ein TRPV3 Defizit aufweisen einen reduzierten ATP Spiegel haben. So kann vermutlich eine TRPV3 induzierte ATP Freisetzung potenziell auf periphere Nerven wirken und so die Sinneswahrnehmung modulieren.

Auch ist bekannt, dass TRPV3 Wärmeaktivierung zur Stickstoffmonoxid (NO) Freisetzung führt. Ein näherer Zusammenhang ist jedoch nicht geklärt. Für die Stickstoffmonoxid Produktion bei TRPV3 Aktivierung werden genetische Hintergründe vermutet.

Ein weiterer Bereich, der Aufmerksamkeit verlangt, ist die Beteiligung von TRPV3 an der Keratinozytenbiologie und an dermatologischen Erkrankungen. So wird TRPV3 in Verbindung mit Haarwachstum gebracht, denn Tiere, welche ein TRPV3 Defizit aufweisen leiden meist unter Haaranomalien. In einer künstlich erzeugten Linie TRPV3 defizienter Mäuse, wurden wellige Körperbehaarung und lockige Barthaare beobachtet (Huang et al., 2013).

Welche Rolle die Expression von TRPV3 Kanälen im Gehirn spielt, kann bis jetzt nur vermutet werden. Wahrscheinlich ist, dass TRPV3 Kanäle eine Rolle bei der Stimmungsregulation und teilweise protektive Funktionen einnehmen (Moussaieff et al., 2008).

1.3.4 Physiologische Eigenschaften der TRPV4 Kanäle

Die TRPV4 Kanäle sind polymodale Rezeptoren der Zelle, welche der Mechanosensation, Osmosensation und Thermosensation dienen. Einige dieser Sinnesfunktionen sind evolutionär in verschiedenen Arten tief verwurzelt. Die weite Verbreitung von TRPV4 ist bezeichnend für die Beteiligung an verschiedenen physiologischen Funktionen.

TRPV4 Kanäle sind von Bedeutung bei der durch Scherbeanspruchung induzierte Vasodilatation. Des Weiteren ist TRPV4 an Gehörfunktionen beteiligt.

Kürzlich hat TRPV4 an weiterer Bedeutung gewonnen, da dieser Kanal mit der Entwicklung von verschiedenen pathophysiologischen Bedingungen, wie neuropathischem Schmerz, Mukoviszidose, Brachyolmie und Krebs in Verbindung gebracht wird.

Aus mehreren Studien kann entnommen werden, dass zwischen dem Zytoskelett und der Lokalisation als auch Funktion der TRPV4 Kanäle ein enger Zusammenhang besteht. Viele der Funktionen, für die TRPV4 bekannt ist, setzen eine aktive Beteiligung des Zytoskeletts voraus. So ist zum Beispiel die durch das Zytoskelett regulierte Volumenabnahme der Zelle ein Prozess, bei dem Aktin-bindende Proteine regulatorisch die TRPV4 Ionenkanal-Aktivierung steuern (Goswami et al., 2010).

TRPV4 wird hoch in Gelenkchondrozyten exprimiert und der Verlust der TRPV4 Funktion geht mit Arthropathie und Osteoarthritis einher. TRPV4 spielt eine kritische Rolle im physiologischen Zusammenhang zwischen mechanischer Beanspruchung und Chondrozytenfunktion. Insbesondere wirkt TRPV4 als ein Steuerglied, welches durch mechanische Belastung aktiviert wird und somit die Biosynthese von knorpelextrazellulärer Matrix reguliert (O'Conora et al., 2014).

Die Verteilung des TRPV4 Proteins in anderen Geweben, wie der glatten Muskulatur der Atemwege, Eileiter, Milz, Herz, Leber, Hoden, Keratinozyten, Innenohrhaarzellen und dorsalen Wurzelganglien legt nahe, dass die Rolle dieser Kanäle nicht nur auf Osmo- und Mechanosensation beschränkt ist. TRPV4 wird auch in Verbindung gebracht mit Thermosensation und Nozizeption in Mauskeratinozyten als auch menschlichen Keratinozyten (Cuajungco et al., 2006).

1.4 Regulation von Ionenkanälen durch Phosphoinositide

Zahlreiche Ionenkanäle können durch Phosphoinositide (auch Phospholipide) wie PtdIns(4,5)P₂ in ihrer Aktivität moduliert werden (Hilgemann et al., 2001).

1.4.1 Struktur und Stoffwechsel von Phosphoinositiden

Phosphoinositide sind Bestandteile der Zellmembran. Ihre Konzentration wird durch Enzyme des Phosphoinositidmetabolismus kontrolliert. Das aus physiologischer Sicht wichtigste Phosphoinositid ist das PtdIns(4,5)P₂. So wird für das PtdIns(4,5)P₂ eine Modulation des Erregungsverhaltens von erregbaren Zellen (Neurone, endokrine Zellen, Myozyten) beschrieben, infolge von räumlich-zeitlicher Änderungen der Phosphoinositidkonzentration. Weitere Phosphoinositide neben Phosphatidylinositol-4,5 bisphosphat sind die Derivate: das PtdIns(3)P, PtdIns(4)P, PtdIns(5)P, PtdIns(3,4)P₂, PtdIns(3,5)P₂, PtdIns(3,4,5)P₃. Diese liegen im Vergleich zum PtdIns(4,5)P₂ jedoch in geringeren Konzentrationen vor. Das Phosphoinositidmolekül besteht aus einem Fettsäureanteil und einer Phosphatkopfgruppe. Das hydrophobe Molekülteil setzt sich aus einem Arachidonoylrest (all-cis 5,8,11,15 Eicosatetraensäure; C20:4) und einem Stearoylrest (Octadecansäure; C18:0) zusammen, welche über ein Glycerolphosphat mit dem hydrophileren Inositolring verbunden sind. Die unterschiedlichen Derivate der Phosphoinositide sind ein Produkt, welches durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung der Hydroxylgruppen des Inositolringes durch PI-Kinasen und PI-Phosphatasen entsteht. Außerdem spaltet die Phospholipase C PtdIns(4,5)P₂ in IP₃ und DAG. So ist die Zelle in der Lage ihre Phosphoinositidkonzentration zu steuern und hiermit weitere Regulationsmechanismen einzuleiten. Weitere Signaltransduktionsmechanismen erfolgen durch G-Proteine und Tyrosinkinasen. Die Stimulation von G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren (GPCR) und Tyrosinkinaserezeptoren durch Zytokine und Wachstumsfaktoren beeinflussen die Phosphoinositidkonzentration in der Zellmembran (Rapedius et al., 2005).

1.4.2 Regulation der TRPV Kanäle durch Phosphoinositide

Die Regulation des TRPV1 Kanals durch Phosphoinositide wird in der Literatur mit diskrepanten Erkenntnissen beschrieben. Hierbei geht es nicht nur um die Art der Kanalmodulation sondern auch um die unterschiedlich spezifische Modulation für verschiedene Phosphoinositide.

Dem Voraus geht die Hypothese, dass das natürliche, langkettige PtdIns(4,5)P₂ als Cofaktor für die Aktivierung des TRPV1 Kanals durch Agonisten wie Capsaicin dient.

So wird angenommen, dass sich PtdIns(4,5)P₂ bereits in der Zellmembran von exzidierten Patches befindet und dort an den TRPV1 Rezeptor gebunden ist. Dementsprechend wird eine Abnahme der Konzentration von PtdIns(4,5)P₂ die Aktivierung von TRPV1 verhindern.

Es konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass eine Behandlung des Patches, aus F-11 Zellen, mit 50 µg/mL Polylysin (PolyK) zu einer kompletten Inhibition des durch Capsaicin hervorgerufenen Stromes führt. Des Weiteren wurde festgestellt, dass Polylysin den durch Capsaicin hervorgerufenen Strom dosisabhängig reduziert.

Polylysin, so wird angenommen, maskiert PtdIns(4,5)P₂ durch elektrostatische Wechselwirkungen mit der negativ geladenen Kopfgruppe der Phosphoinositide. Dieser Regulationsmechanismus wurde auch an zahlreichen K⁺ und weiteren TRP Kanälen beobachtet.

Zu beachten ist, dass selbst nach Wegnahme von PolyK der durch Capsaicin hervorgerufene Strom nicht zurückkehrt, selbst nicht nach minütigem Waschen mit PolyK freier Lösung. Dieses wird mit der mehrfach positiven Ladung des Polylysins erklärt, welches scheinbar an mehrere Phosphoinositide gleichzeitig bindet.

Dieselbe Wirkung, wie das natürliche PtdIns(4,5)P₂ zeigt auch das kurzkettige diC8-PI(4,5)P₂. Es vermag, wie das langkettige PtdIns(4,5)P₂ auch, durch Capsaicin hervorgerufene TRPV1 Ströme, die durch PolyK inhibiert wurden, wieder herzustellen. Jedoch gibt es hierbei einen entscheidenden Unterschied: Während das langkettige PtdIns(4,5)P₂ den Strom dauerhaft wieder herstellt, so kann diC8-PI(4,5)P₂ den Stromfluss nur solange aufrechterhalten, wie der Patch mit diC8-PI(4,5)P₂ gespült wird. Nach Wegnahme von diC8-PI(4,5)P₂ zeigt der mit PolyK behandelte Patch keine Response auf Capsaicin. Dieser Unterschied zwischen natürlichem PtdIns(4,5)P₂ und diC8-PI(4,5)P₂ wird damit begründet, dass natürliches PtdIns(4,5)P₂ sich mit seiner langen Kette in der Zellmembran verankern kann, während diC8-PI(4,5)P₂ hierzu nicht in der Lage ist (Klein et al., 2008).

Ein weiterer Faktor der bei der TRPV1 Regulation eine Rolle zu spielen scheint ist, ob sich die Phosphoinositide auf der intrazellulären oder der extrazellulären Seite der Membran befinden. So können die Phosphoinositide sogar unterschiedliche Wirkungen hervorrufen. Es konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von diC8-PI(4,5)P₂, auf der intrazellulären Seite der Zellmembran, eine Potenzierung von durch Capsaicin hervorgerufenen TRPV1 Strömen bewirkt. Sobald sich das diC8-PI(4,5)P₂ jedoch auf beiden Seiten der Zellmembran befindet, bewirkt es jedoch das Gegenteil; eine Inhibition von durch Capsaicin hervorgerufenen TRPV1 Strömen. Dennoch muss für eine Inhibition dieser Ströme die Konzentration von Phosphoinositiden auf der Extrazellulärseite der Membran wesentlich höher sein als auf der Intrazellulärseite (Senning et al., 2014).

1.5 Regulation von Ionenkanälen durch LC-CoA Ester

1.5.1 Struktur und Stoffwechsel von LC-CoA Estern

Die Fettsäureseitenkette besteht beim Oleoyl-CoA aus einer Ölsäure (cis-9-Octadecensäure, C18:1), während die hydrophile CoA-Kopfgruppe ein Adenosin-3'-phosphat enthält. Dieses ist über einen Panthotensäurerest und einen β -Mercaptoethylaminrest mit der Fettsäure verbunden. Zwei dieser Phosphate sind in die Panthotensäure eingebunden, die übrige Phosphatgruppe befindet sich an Position drei des Riboseringes (3'-Ribosephosphatgruppe).

Fette (Fettsäuren) sind das zentralste Energiespeichermedium für Stoffwechselenergie. In den Mitochondrien wird diese gespeicherte Energie über die β -Oxidation rückgewonnen. Die Fettsäuren mit 16 und 18 Kohlenstoffatomen sind am zahlreichsten vertreten. Diese Moleküle können eine oder mehrere Doppelbindungen aufweisen. Im Intestinum tenue werden die Fettsäuren resorbiert und anschließend als Chylomikronen über das Lymphsystem in den Blutkreislauf transportiert. Die Aufnahme von Fettsäuren geschieht exogen oder die Fettsäuren werden „de-Novo“ synthetisiert. In Form von Lipoproteinen erfolgt die Beförderung der Fettsäuren im Organismus, das bindende Protein ist hierbei überwiegend Albumin. Die Aufnahme der Fettsäuren in die Zellen findet durch freie Diffusion statt, jedoch wird auch ein proteinvermittelter Transmembrantransport für langkettige Fettsäuren vermutet. Der Transport der langkettigen Fettsäuren in die Mitochondrien erfordert die Bindung an Coenzym A durch das Enzym Acyl-CoA-Synthetase. Diese Fettsäure-CoA-Ester werden durch die Carnitin-Palmitoyltransferase 1 (CPT1) auf Carnitin übertragen und in die Mitochondrien transportiert. Dieses ist erforderlich, damit die Fettsäuren in den Mitochondrien durch die β -Oxidation verstoffwechselt werden können. Im Rahmen der β -Oxidation wird Acyl-CoA zu Acetyl-CoA abgebaut und dem Zitratzyklus zur Verfügung gestellt. Zur Energiegewinnung werden die hierbei entstandenen Reduktionsäquivalente auf NAD und FAD übertragen und in der Atmungskette oxidiert. Unter Sauerstoffmangel kommt es zu einem Anstau von NADH₂ und FADH₂, da diese unter hypoxischen Konditionen nicht oxidiert werden können. Infolge dessen wird die β -Oxidation unterbrochen und es entsteht eine Erhöhung der intrazellulären Acyl-Coenzym A Konzentration. Durch die physiologische Inhibition von CPT1 durch Malonyl-CoA kann auch die β -Oxidation von Fettsäuren unterbrochen werden. Die Hemmung von CPT1 hat zur Folge, dass die Fettsäuren nicht mehr in die Mitochondrien transportiert werden können und somit der β -Oxidation nicht zur Verfügung stehen. Das bei der β -Oxidation entstehende Acetyl-CoA wird als Zitrat aus den Mitochondrien herausbefördert und durch das Enzym Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) in Malonyl-CoA transformiert. Somit kommt es zur verstärkten Malonyl-CoA Anreicherung im Cytosol während Phasen in denen ein Energieüberschuss vorliegt, wie zum Beispiel bei erhöhtem Glukosespiegel. Durch Inhibition der CPT1 mittels Malonyl-CoA wird die Metabolisierung von Glucose gefördert, demgegenüber werden keine Fettsäuren in die Mitochondrien transportiert. Dieses geht mutmaßlich mit einem Anstieg der intrazellulären Acyl-CoA Konzentration einher (Rapedius et al., 2005).

1.5.2 Regulation der TRPV Kanäle durch LC-CoA Ester

Wie bereits beschrieben ist das anionische Phospholipid, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, ein etablierter positiver Modulator des TRPV1 Kanals. Die negativ geladenen Phosphatgruppen interagieren mit zahlreichen Resten von basischen Aminosäuren in der TRP Domäne des proximalen

C-Terminus des TRPV1 Kanals. Einige Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass physiologisch sub-micromolare Konzentrationen von Long-Chain Acyl CoAs (LC-CoAs) auch als positive Modulatoren von Ionenkanälen und Transportern fungieren können. Hierbei stellen die LC-CoAs ein weiteres allgegenwärtiges anionisches Lipid dar; vergleichbar den Phospholipiden. Die Aktivität des TRPV1 Kanals wird durch LC-CoAs ähnlich reguliert wie durch PtdIns(4,5)P₂. LC-CoAs sind potente Modulatoren der TRPV1 Kanäle und interagieren mit derselben Bindungsstelle des TRPV1 Kanals, mit der auch das PtdIns(4,5)P₂ in Wechselwirkung tritt. Im Gegensatz zur Regulation durch PtdIns(4,5)P₂ ist die Modulation durch LC-CoAs Ca²⁺ unabhängig.

In diesen Zusammenhang kann an tsA201 Zellen, welche TRPV1 exprimieren, durch whole-cell Messungen gezeigt werden, dass PtdIns(4,5)P₂ und Palmitoyl CoA einen Rundown von Capsaicin induzierten Strömen verhindern können. Auffällig hierbei ist, dass Palmitoyl CoA einen Rundown noch potenter verhindert, als PtdIns(4,5)P₂.

Bei einem ähnlichen Experiment werden extrazelluläre Protonen (pH 5,5), im Gegensatz zu Capsaicin, als Aktivator des TRPV1 Kanals verwendet. Ohne Palmitoyl CoA zeigt sich auch hier nach gewisser Zeit ein Rundown, welcher mittels Palmitoyl CoA verhindert werden kann.

Die intrazelluläre C-Terminus Region ist der einzige cytosolische Teil der Aminosäuresequenz, welcher hoch konserviert ist bei TRPC, TRPM und TRPV Kanälen. Die TRP Box, welche Teil des C-Terminus ist, umfasst eine Sequenz von sechs Aminosäuren (EWKFQR). Diese mehrbasige Region wurde in der Vergangenheit vorgeschlagen an der PtdIns(4,5)P₂ Bindung beteiligt zu sein. Weitere Studien deuten jedoch darauf hin, dass die positiv geladenen basischen Aminosäurereste R701 und K710 in der TRP Domäne von TRPV1 eine bedeutende Rolle bei der PtdIns(4,5)P₂ Bindung und Stabilisierung der PtdIns(4,5)P₂ Bindungsstelle spielen. Außerdem wird vermutet, dass R702 und K711 an der Modulation durch PtdIns(4,5)P₂ beteiligt sind.

Um die Bedeutung von K711 zu überprüfen wurde an der TRPV1 Punktmutante K711A gezeigt, dass sich durch Capsaicin induzierte Ströme in Größe und kinetischem Profil, mit oder ohne Palmitoyl CoA, nicht verändern. Es wird bei TRPV1 K711A keine Potenzierung der Ströme in Anwesenheit von Palmitoyl CoA beobachtet. Insgesamt gleichen die mikroskopischen Ströme vom TRPV1 K711A denen eines desensitvierten TRPV1 Wildtyp Kanals. Somit wird beschrieben, dass K711A einen ähnlichen Regulationsmechanismus in Kombination mit LC-CoAs zeigt, wie bei PtdIns(4,5)P₂. Für R702A wird eine Insensitivität für Capsaicin beschrieben, wobei eine Response auf extrazelluläre Protonen weiterhin stattfindet. Jedoch zeigt TRPV1 R702A keine Response auf Palmitoyl CoA und unterscheidet sich auch sonst in der Kinetik vom TRPV1 Wildtyp. Zusammenfassend ist beschrieben, dass sowohl TRPV1 K711A und R702A ihre Modulation durch Palmitoyl CoA, im Vergleich zum Wildtyp, verloren haben. Da die Positionen K711 und R702 in der gesamten TRPV Familie stark konserviert sind, kann davon ausgegangen werden, dass auch andere Mitglieder dieser Familie eine Modulation durch Palmitoyl CoA aufweisen (Yu et al., 2014).

1.6 Wirkung von Divalenten auf die TRPV Regulation

1.6.1 Wirkung von Ca^{2+} auf die TRPV Regulation

In der Literatur wird häufig von einer Desensibilisierung des TRPV1 Kanals gesprochen, welche hauptsächlich in Anwesenheit von Ca^{2+} Ionen beobachtet wird.

Auf welchem Weg diese Herunterregulation des TRPV1 Kanal genau geschehen mag, dafür gibt es unterschiedliche Theorien.

Die erste Hypothese geht davon aus, dass die cytosolische Seite der Ankyrin-Repeat-Domäne des TRPV1 Kanals in einer Ca^{2+} abhängigen Reaktion einen Komplex mit Calmodulin bildet. Dieser Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex wirkt dann inhibierend auf den TRPV1 Kanal (VYKLIČKÝ et al., 2008).

Hierzu liegen Experimente an *Xenopus* Oozyten vor, welche TRPV1 exprimieren. Gemessen wird in der inside-out Konfiguration.

Es wird beschrieben, dass die Oozytenmembran von intrazellulär mit einer Lösung gespült wird, welche gereinigtes Calmodulin und $50 \mu\text{M}$ freies Ca^{2+} enthält. Dieses bewirkt einen starken Rückgang des durch Capsaicin hervorgerufenen Stromes. Dieser Versuch kann mit demselben Resultat an HEK 293 Zellen wiederholt werden. Diese Stromabnahme ist nicht zu beobachten, wenn Calmodulin ohne Ca^{2+} appliziert wird. Die Applikation von einer Lösung mit $50 \mu\text{M}$ freiem Ca^{2+} in Abwesenheit von Calmodulin auf die intrazelluläre Seite der Oozytenmembran bewirkt nur einen ganz leichten Rückgang des durch Capsaicin hervorgerufenen Stromes.

Um die Bedeutung des Calmodulins zu untermauern wurden in HEK 293 Zellen Calmodulin und TRPV1 coexprimiert. Hier findet unter Spülung mit einer Ca^{2+} haltigen Lösung ein statistisch signifikanter Rückgang der Capsaicin assoziierten Ströme statt. Dieser Versuch wird nochmal wiederholt, jedoch wird diesmal eine durch Mutation nicht funktionelle Variante des Calmodulins coexprimiert. Unter Spülung mit einer Ca^{2+} haltigen Lösung findet diesmal keine Desensitivierung statt.

Wie bereits beschrieben ist $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ für eine Aktivierung des TRPV1 Kanals durch Capsaicin notwendig. Demzufolge wird eine Hydrolyse von $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ die Desensitivierung der TRPV1 Kanals auf Capsaicin zur Folge haben.

Dieses ist der Ansatzpunkt der zweiten Hypothese, welche einen Zusammenhang zwischen der calciumabhängigen Regulation der Phosphoinositid-Phospholipase C und der TRPV1 Kanal Aktivität beschreibt. Phospholipasen sind Enzyme, welche Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ($\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$) zu Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) hydrolysieren. Die Phospholipase C benötigt Calcium als Cofaktor.

Folglich kann die Phospholipase C nur $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ abbauen, wenn Ca^{2+} als Cofaktor in ausreichender Menge zur Verfügung steht. Durch den $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ Abbau wird der TRPV1 Kanal insensitiv für Capsaicin.

Diese Theorie wird in zahlreichen Studien untermauert. So wird beschrieben, dass endogene Phosphoinositide in inside-out Messungen nach Spülung mit Polylysin gebunden wurden und der

TRPV1 Kanal desensitiviert, anschließend kann eine Spülung mit PtdIns(4,5)P₂ die Kanäle wieder reaktivieren.

Zahlreiche Labore konnten zeigen, dass in Anwesenheit eines hohen Calciumspiegels eine Aktivierung von TRPV1 den Abbau von PtdIns(4,5)P₂ zur Folge hat. Dieser Abbau kann nur der Phospholipase C zugeschrieben werden, da nach Aktivierung ein erhöhter IP₃ Spiegel nachgewiesen wird. Der Einsatz eines Phospholipase C Inhibitors verhindert den Capsaicin induzierten PtdIns(4,5)P₂ Abbau. Der Einsatz von PtdIns(4,5)P₂ oder eines Phospholipase C Inhibitors in der Patchpipette bei whole-cell Messungen verhindert ebenfalls eine Desensitivierung.

Es gibt viele Hinweise, welche die Annahme der PtdIns(4,5)P₂ Depletion durch die Phospholipase C stützen. Hingegen scheint die Theorie der Desensitivierung des TRPV1 Kanals durch Calmodulin noch nicht vollständig geklärt, denn Versuche, in denen eine Inhibition des Calmodulins mittels Calmidazolium probiert werden, können eine TRPV1 Desensitivierung nicht verhindern (Rohacs et al., 2008).

1.6.2 Wirkung von Mg²⁺ auf die TRPV Regulation

Jedoch ist Ca²⁺ nicht das einzige Divalent, welches regulatorische Wirkung auf TRPV Kanäle zeigt. So wurden von Lee et al. drei unterschiedliche Effekte von Mg²⁺ auf den TRPV5 Kanal gezeigt.

Der erste Effekt, den 1 mM Mg²⁺ auf TRPV5 zeigt ist eine reversible Inhibition der Kanals, welche über mehr als zehn Sekunden in inside-out Messungen anhält.

Der zweite Effekt äußert sich in einem schnellen reversiblen spannungsabhängigen Kanalblock. Dieser Effekt unterscheidet sich vornehmlich von dem Ersten durch seine unterschiedliche Kinetik. Wie zum Beispiel eine Verschiebung des Umkehrpotentials, eine steilere IV-Kurve nahe des Umkehrpotentials und einen Block von Auswärtsströmen. Eine Neutralisation von Aspartat an Position 542 im Poreselektivitätsfilter schaltet beide dieser Effekte aus.

Der dritte Effekt ist eine progressive irreversible Herunterregulierung der TRPV5 Kanalaktivität, welche nach wiederholter Applikation von Mg²⁺ auftritt. Eine Ergänzung mit exogen zugeführtem PtdIns(4,5)P₂ reaktiviert die TRPV5 Ströme. Dieses lässt darauf schließen, dass der Rundown Effekt durch Mg²⁺ auf eine Depletion von PtdIns(4,5)P₂ aus der Zellmembran zurückzuführen ist. Zur Untermauerung dieser These zeigen die Autoren, dass Mg-ATP, ein vermeintlicher Aktivator von Lipidkinasen, einen durch Mg²⁺ hervorgerufenen Rundown rückgängig machen kann. Diese durch Mg-ATP induzierte Wiederkehr des TRPV5 Stromes kann wiederum durch den Inhibitor der Phosphoinositid-4-Kinase, Wortmannin, unterbunden werden. Eine Applikation von PtdIns(4,5)P₂ reduziert ebenfalls die Tendenz des TRPV5 Kanals durch Mg²⁺ eine Inhibition zu erfahren (Lee et al., 2005).

1.7 Regulation der TRPV Kanäle durch Protonenkonzentration

1.7.1 Regulation des TRPV1 Kanals durch Protonenkonzentration

Bisherige Publikationen beschreiben lediglich eine Aktivierung des TRPV1 Kanals durch extrazelluläre Protonen. Bei outside-out Messungen an HEK 293 Zellen kann ein EC_{50} von $1,3 \mu\text{M}$ (dieses entspricht einem pH von 5,9) für Protonen ermittelt werden (Lee et al., 2014).

Es gilt als etabliert, dass Protonen den TRPV1 Wildtyp Kanal sensitivieren und aktivieren. Dieses geschieht durch Bindung an die beiden extrazellulären Aminosäurereste E600 und E648 in der Porenregion (Jordt et al., 2000).

Weitere whole-cell Messungen an TRPV1 haben ergeben, dass pH Änderungen einen dualen Effekt auf den TRPV1 Kanal haben. Bei niedrigem pH (unter pH 6) öffnet sich der Kanal. Bei höherem pH (pH 6-7) wird die Schwelle zur TRPV1 Aktivierung herabgesetzt, zum Beispiel für Capsaicinaktivierung. Jedoch scheint Protonenaktivierung von TRPV1 spannungsabhängig zu sein (Aneiros et al., 2011).

Ob eine intrazelluläre Ansäuerung eine Aktivierung des TRPV1 Kanals hervorruft wird von der Literatur nicht deutlich und mit diskrepanten Ergebnissen beschrieben.

So berichten Seungsoo Chung et al., dass bei whole-cell Messungen an Ratten DRG Neuronen eine intrazelluläre Ansäuerung zur Inhibition des TRPV1 Kanals führt. Um diese Ansäuerung zu realisieren, wurde der TRPV1 Kanal mit Capsaicin aktiviert und anschließend wurde das Neuron einer 20 mM Natrium Acetate ausgesetzt. Hier wurde gezeigt, dass der Strom dosisabhängig zurück geht (Chung et al., 2011).

Im Gegensatz hierzu konnten Ajay Dhaka et al. eine positiv Regulation des TRPV1 Kanals durch Änderung des intrazellulären pH Wertes feststellen. Die Applikation von alkalischen Lösungen im Bereich von pH 7,8 - 9,5 zeigt bei inside-out Messungen an HEK 293 Zellen eine zunehmende Aktivierung des TRPV1 Kanals. So wird beschrieben das TRPV1 Kanäle sowohl Response auf saure als auch auf basische Lösungen zeigen (Dhaka et al., 2009).

1.7.2 Regulation des TRPV2 Kanals durch Protonenkonzentration

Über eine pH abhängige Regulation des TRPV2 Kanals ist nur wenig Literatur bekannt. Jedoch kann vermutet werden, dass auch dieser Kanal aufgrund seiner engen Verwandtschaft zu TRPV1 und TRPV3 durch pH Änderungen in seiner Aktivität beeinflusst wird.

1.7.3 Regulation des TRPV3 Kanals durch Protonenkonzentration

Eindeutige Ergebnisse liegen zur direkten pH Regulation des TRPV3 Kanals vor. Xu Cao et al. zeigen bei whole-cell Messungen an HEK 293 Zellen eine Aktivierung des TRPV3 Kanals durch Glykolsäure. Die Konzentration an Glykolsäure beträgt hierbei 100 mM und der pH 5,5. Die Aktivierung ist reversibel nach Spülung mit einer neutralen Badlösung. Die Positivkontrolle mit dem TRPV3 Aktivator 2-APB in einer Konzentration von $300 \mu\text{M}$ ist erfolgreich. Um eine reine Aktivierung durch Protonen zu bestätigen wurde Glykolsäure (100 mM) bei einem pH von 7,4 appliziert, hierbei sind keine TRPV3

Ströme messbar. Somit ist die Aktivierung des TRPV3 Kanals direkt auf Protonen zurück zu führen. Diese TRPV3 Ströme konnten nicht nur in HEK 293 Zellen, sondern auch in humanen Keratinozyten gezeigt werden.

Bei inside-out Messungen an HEK 293 Zellen konnte in diesem Rahmen gezeigt werden, dass der TRPV3 Kanal auch direkt durch einen intrazellulären Anstieg der Protonenkonzentration aktiviert wird. Bei einem Wechsel des intrazellulären pH Wertes von 7,4 auf 5,5 zeigt sich eine Aktivierung des TRPV3 Kanals. Es wird festgestellt, dass bereits bei pH 6,5 eine Aktivierung des TRPV3 Kanals erkennbar ist, welche ihr Maximum bei pH 5,5 erreicht. Auch Einzelkanalmessungen bestätigen, dass die Offenheitswahrscheinlichkeit des TRPV3 Kanals mit zunehmender Protonenkonzentration ansteigt.

Eine weitere Ansäuerung, wie zum Beispiel bei pH 4,5, zeigt inhibierende Wirkung auf den TRPV3 Kanal. Diese Deaktivierungsreaktion erfolgt jedoch nur, solange pH 4,5 gehalten wird. Sobald der pH sich wieder 5,5 nähert überwiegt die aktivierende Wirkung der Protonen.

Zudem wird gezeigt, dass die Kurve der spannungsabhängigen Aktivierung des TRPV3 Kanals sich durch einen Anstieg der Protonenkonzentration nach links verschiebt. Dieses bedeutet, dass intrazelluläre Protonen einen Aktivierungsanstieg des TRPV3 Kanals, ähnlich wie Hitze oder 2-APB, über zwei Mechanismen bewirken können, durch direkte Aktivierung und eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit.

Des Weiteren wird vermutet, dass die Aminosäure His-426, im TRPV3 Kanal, an der Kanalsensitivierung durch einen Anstieg der intrazellulären Protonenkonzentration beteiligt ist. Dieses wird damit begründet, dass die TRPV3-H426N Mutante einen partiellen Verlust an Protonensensitivität zeigt (Cao et al., 2012).

1.7.4 Regulation des TRPV4 Kanals durch Protonenkonzentration

Über eine pH abhängige Regulation des TRPV4 Kanals ist nur wenig Literatur bekannt. Jedoch kann vermutet werden, dass auch dieser Kanal aufgrund seiner engen Verwandtschaft zu TRPV1 und TRPV3 durch pH Änderungen in seiner Aktivität beeinflusst wird.

2. Ziele der Arbeit

Bisher wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen die Response der TRPV Kanäle auf Änderungen der Protonenkonzentration untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass beispielsweise der TRPV1 Kanal durch Ansäuern des extrazellulären Milieus aktiviert wird.

Dieses legt die Vermutung nahe, dass auch die weiteren TRPV Kanäle, wie TRPV3 und TRPV4, welche mit dem TRPV1 Kanal verwandt sind, eine ähnliche Regulation durch Änderung der Protonenkonzentration erfahren.

Des Weiteren ist unklar, ob dieser Regulationsmechanismus nur Änderungen des extrazellulären Milieus umfasst, oder ob eine Regulation der TRPV Kanäle auch durch Änderung der intrazellulären Protonenkonzentration erfolgen kann. Die Literatur ist diesbezüglich widersprüchlich, beziehungsweise es liegen noch keine weiteren Forschungsergebnisse vor.

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit soll überprüft werden, ob die TRPV Kanäle: TRPV3 und TRPV4 durch intrazellulären pH-Wert reguliert werden. Sollten die Kanäle eine entsprechende Regulation erfahren, so ist es von Bedeutung die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) und die Konzentration der maximalen Aktivierung zu ermitteln.

Ein weiterer Abschnitt dieser Arbeit wird auf die Modulation der Capsaicin Response des TRPV1 Kanals eingehen. Da in der Literatur besonders die Modulation der TRPV1 Kanäle durch $PtdIns(4,5)P_2$ beschrieben wird, ist zu analysieren, ob eine endogen induzierte $PtdIns(4,5)P_2$ Depletion die TRPV1 Kanäle in ihrer Aktivität reguliert. Folglich sollte eine endogen induzierte $PtdIns(4,5)P_2$ Neogenese ebenfalls Auswirkungen auf die TRPV1 Aktivität haben. Auch dieses gilt es zu überprüfen.

3. Material und Methoden

3.1 Oozytenpräparation und Expression

Als Expressionssystem für die TRPV Kanäle dienten Oozyten des *Xenopus laevis*, eine afrikanische Krallenfroschart. Die Entnahme der Oozyten erfolgte nach Betäubung auf Eis mittels Tricain chirurgisch aus adulten *Xenopus laevis* auf Flockeneis. Die Frösche wurden höchstens vier Mal verwendet, wobei zwischen den einzelnen Operationen ein Zeitraum von mindestens zwölf Wochen bestand. Nach 90 minütiger Behandlung mit Kollagenase A wurden die Oozyten manuell vereinzelt und defollikuliert. Zur Injektion kamen nur Oozyten vom Reifestadium IV nach Dumont (Dumont 1972). In Vorbereitung der Injektion wurden die Borosilikatglaskapillaren (Durchmesser 2:1,6 mm) mit einem Micropipettenpuller (Model P-97, Sutter Instruments Co., Novato (CA), USA) sehr fein ausgezogen und anschließend auf den gewünschten Öffnungsdurchmesser gebrochen. Spätestens 24 Stunden nach Entnahme der Oozyten erfolgte, nach sorgfältiger Auswahl der Oozyten, unter mikroskopischer Sicht, manuell die Injektion. Hierbei wurden zirka 100 nL cRNA in jeweils eine Oozyte injiziert und die Oozyten bis zu den Experimenten im Brutschrank bei 18°C bereitgehalten. Die RNA wurde bei -80°C aufbewahrt. Die Untersuchungen erfolgten zwischen 48 beziehungsweise 72 Stunden und zehn Tagen nach der Injektion. Direkt vor den Experimenten wurde die jeweilige Oozyte manuell von ihrer Vitellinmembran befreit um freien Zugang zur Zellmembran zu schaffen. Die Oozyten wurden während der gesamten Zeit in ND96 Lösung aufbewahrt.

3.2 Elektrophysiologie

Die Experimente wurden unter Voltage Clamp (Spannungsklemme) Bedingungen bei Raumtemperatur durchgeführt, welche Hodgkin und Huxley im Jahr 1949 erstmalig beschrieben. Diese Methode machte es möglich Ionenströme und nicht nur den Verlauf des Membranpotentials präzise zu messen. Als heterologes Expressionssystem dienten bei allen Experimenten *Xenopus laevis* Oozyten. Die Oozyte befand sich in einer Badkammer gefüllt mit Badlösung oberhalb der Objektivseite des Mikroskops (Zeiss Axiovert 25, Carl-Zeiss, Jena, Deutschland). Ein kontinuierlicher Lösungswechsel wurde durch eine entsprechende Zulauf- und Absauggeschwindigkeit eingestellt. Außerdem ragte in die Kammer ein Applikationssystem (Multibarrelsystem) hinein. Dieses Multibarrelsystem bestand aus mehreren nebeneinander liegenden kleinen Röhren und war relativ zum Patch beweglich. Die Bewegung der Kammer erfolgte mittels eines Mikromanipulators der Firma Luigs-Neumann (SM1, Luigs-Neumann, Ratingen, Deutschland). Mit dem Multibarrelsystem konnten verschiedene Substanzen auf die zytoplasmatische Seite der Zellmembran appliziert werden. Das Applikationssystem bestand aus sechs miteinander verklebten Thetagläsern aus Borosilikatglas, welche über ein Teflonschlauchsystem mit den Reservoirgefäßen verbunden waren. Drei-Wege-Hähne dienten als Flüssigkeitsstop zwischen Reservoirgefäßen und Applikationssystem. Die Pipetten für die „giant-patch-clamp“ Experimente wurden aus Borosilikatglas (Durchmesser 2:1,4 mm) mittels eines Mikropipettenpullers (Model P-97, Sutter Instruments Co., Novato (CA), USA) ausgezogen und anschließend mit einem heißen Platindraht poliert (Microforge MF830, Narishige, Japan). Die Pipettenwiderstände betragen 400 - 500 kΩ, was einem Durchmesser von etwa 32 - 40 µM entspricht. Für die „giant-patch“ Experimente wurden die Pipetten vor dem Befüllen mit Pipettenlösung kurz in Paraffinöl getaucht um eine optimale Ankopplung an die Zellmembran zu gewährleisten. Das Befüllen der Pipetten mit Pipettenlösung konnte durch ein Microfilament mit

Spritze und Spritzenaufsatzfilter präzise durchgeführt werden. Im Weiteren wurde die Glaspipette auf eine chlorierte Silberelektrode, welche direkt mit der Head-Stage verbunden war, aufgesetzt. Eine weitere Elektrode, welche zur Schließung des Stromkreises notwendig war, befand sich in der Badlösung und stand ebenfalls über ein Kabel mit der Head-Stage in Verbindung. Um ein Membranstück aus dem Membranverband zu lösen, war ein Ohm'scher Widerstand von mindestens einem GΩ zwischen Patchpipette mit daran klebender Membran und dem umgebenden Milieu erforderlich. Die Durchführung der Experimente erfolgte immer in der so genannten „inside-out“ Konfiguration. Die Spannungen wurden mit einem EPC10 Verstärker (HEKA Electronics, Lambrecht, Deutschland) injiziert und anschließend die resultierenden Ströme mit selbigem Verstärker aufgenommen und mit einem Bessel Filter mit 3 kHz gefiltert. Das Haltepotential betrug +40 mV und die Aufnahme Frequenz 0,1 kHz.

3.3 Rezepte verwendeter Lösungen und Chemikalien

Rezepte verwendeter Lösungen und Chemikalien

Tab. 3.1: Verwendete Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
KCl-Badlösung pH 10,0	120 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM EGTA, pH 10,0 (Stammlösung)
KCl-Badlösung pH 9,5	120 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM EGTA, pH 9,5 mit HCl eingestellt
KCl-Badlösung pH 9,0	120 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM EGTA, pH 9,0 mit HCl eingestellt
KCl-Badlösung pH 8,5	120 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM EGTA, pH 8,5 mit HCl eingestellt
KCl-Badlösung pH 8,0	120 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM EGTA, pH 8,0 mit HCl eingestellt
KCl-Badlösung pH 7,5	120 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM EGTA, pH 7,5 mit HCl eingestellt
KCl-Badlösung pH 7,2	120 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM EGTA, pH 7,2 mit HCl eingestellt
KCl-Badlösung pH 7,0	120 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM EGTA, pH 7,0 mit HCl eingestellt
KCl-Badlösung pH 6,5	120 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM EGTA, pH 6,5 mit HCl eingestellt
KCl-Badlösung pH 6,0	120 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM EGTA, pH 6,0 mit HCl eingestellt
KCl-Badlösung pH 5,5	120 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM EGTA, pH 5,5 mit HCl eingestellt
KCl-Badlösung pH 5,0	120 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM EGTA, pH 5,0 mit HCl eingestellt
KCl-Badlösung pH 4,5	120 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM EGTA, pH 4,5 mit HCl eingestellt
KCl-Badlösung pH 4,0	120 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM EGTA, pH 4,0 mit HCl eingestellt
KCl/MgCl ₂ -Badlsg. pH 8	120 mM KCl, 10 mM HEPES, 5 mM MgCl ₂ , pH 8,0 mit HCl eingestellt
KCl/MgCl ₂ -Badlsg. pH 6	120 mM KCl, 10 mM HEPES, 5 mM MgCl ₂ , pH 6,0 mit HCl eingestellt
KCl/MgCl ₂ -Badlsg. pH 5	120 mM KCl, 10 mM HEPES, 5 mM MgCl ₂ , pH 5,0 mit HCl eingestellt
Mg-ATP-Badlsg. pH 8,0	120 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM Adenosine 5'-triphosphate magnesium salt, pH 8,0 mit HCl eingestellt
Mg-ATP-Badlsg. pH 5,0	120 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM Adenosine 5'-triphosphate magnesium salt, pH 5,0 mit HCl eingestellt
RbCl-Badlösung pH 8,0	120 mM RbCl, 10 mM HEPES, 2 mM EGTA, pH 8,0 mit HCl eingestellt
KCl-Pipettenlösung 1	120 mM KCl, 10 mM HEPES, 3,6 mM MgCl ₂ , pH 7,2 mit HCl eingestellt
KCl-Pipettenlösung 2	120 mM KCl, 10 mM HEPES, 1,8 mM MgCl ₂ , pH 7,2 mit HCl eingestellt
KCl-Pipettenlösung 3	120 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM EGTA, pH 7,2 mit HCl eingestellt
Testlösung (Oozyten)	54 mM NaCl, 30 mM KCl, 2,4 mM NaHCO ₃ , 0,82 mM MgSO ₄ , 0,41 mM CaCl ₂ , 0,33 mM Ca(NO ₃) ₂ x 4 H ₂ O, 7,5 mM TRIS, Penicillin/Streptomycin, Cefuroxim, pH 7,4 mit HCl eingestellt
ND96-Lösung (Oozyten)	93,5 mM NaCl, 2 mM KCl, 1,8 mM CaCl ₂ (2 H ₂ O), 2 mM MgCl ₂ (6H ₂ O), 5 mM HEPES, pH 7,5 mit NaOH eingestellt

Die pH-Wert Messung erfolgte mit einem pH-Meter (Modell: SevenEasy) des Unternehmens Mettler-Toledo (Mettler-Toledo GmbH, Ockerweg 3, 35396 Gießen, Deutschland).

Bezugsquellen der verwendeten Chemikalien:

SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Eschenstraße 5, 82024 Taufkirchen, Deutschland:

Arachidonsäure, Oleoyl-Coenzyme A, Anandamid, Tetrapentylammonium-Chloride, 2-Aminoethoxydiphenyl borate, 2-Arachidonyl glycerol, Capsaicin, Poly-L-Lysin hydrobromid, 4 α -phorbol 12,13-didecanoate, L- α -Phosphatidyl-D-myo-inositol 4,5-diphosphate, dioctanoyl, Heparin, Probenecid, Adenosine 5'-triphosphate magnesium salt.

BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Obere Hauptstraße 10b, 85386 Eching, Deutschland:

8-(Tributylammonium)octyl Methanethiosulfonate Bromide

Avanti Polar Lipids, Inc., 700 Industrial Park Drive, Alabaster, Alabama 35007-9105, USA:

L- α -Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (Brain, Porcine-Triammonium Salt)

Alle aufgeführten Substanzen wurden in speziellen Lösungsmitteln gelöst, als Stammlösung bei -20°C eingefroren und erst am Tag ihrer Verwendung auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Alle Lipide und CoA-Ester wurden zusätzlich vor Gebrauch 15 Minuten in einem Eisbad sonifiziert (Modell Sonorex RK 52, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Heinrichstraße 3-4, 12207 Berlin, Deutschland) und innerhalb von drei Stunden verwendet.

Tab. 3.2: Verwendete Lösungsmittel für die Substanzen

Lösungsmittel	gelöste Substanz
DMSO	Oleoyl-Coenzyme A, 2-Arachidonyl glycerol, 2-Aminoethoxydiphenyl borate, 4 α -phorbol 12,13-didecanoate, 8-(Tributylammonium)octyl Methanethiosulfonate Bromide, Capsaicin, L- α -Phosphatidyl-D-myo-inositol 4,5-diphosphate, dioctanoyl, L- α -Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (Brain, Porcine-Triammonium Salt)
1 M NaOH	Probenecid
Ethanol	Arachidonsäure, Anandamid
Wasser	Tetrapentylammonium-Chloride, Poly-L-Lysin hydrobromid, Heparin, Adenosine 5'-triphosphate magnesium salt

3.4 Datenaufnahme und Datenauswertung

Zur Aufnahme und Auswertung der Daten wurde ein Apple Macintosh Power PC G4, mit dem Betriebssystem Mac OS X 10.4.11, (Apple Inc., Cupertino CA, USA) verwendet. Die Datenaufnahme erfolgte mit dem Programm PatchMaster Version 2x71 (HEKA Electronics, Lambrecht, Deutschland). Die weitere Verarbeitung der Daten wurde mittels IGOR Pro Version 6.3.4.1 (WaveMetrics Inc., Oregon, USA) und Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) durchgeführt. Die graphische Darstellung der Messkurven und Diagramme erfolgte mittels CorelDrawX3 Graphics Suite (Corel Corporation, Ottawa, Ontario, Kanada). Die Textverarbeitung wurde durch Microsoft Word 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) realisiert. Der Berechnung der Inhibitionskonstanten und Hill Koeffizienten liegt die Hill Gleichung zugrunde: $I/I_{max} = (1/1 + (X/K_i)^H)$; I_{max} = Maximalamplitude des Stromes, X = Konzentration der Substanz, I = Strom resultierend aus der Applikation von X , K_i = Inhibitionskonstante, H = Hill-Koeffizient. Alle angegebenen Mittelwerte sind immer Mittelwerte aus mindestens drei Experimenten. Die Fehlerwerte entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

4. Ergebnisse

TRPV (Transient receptor potential vanilloid) Kanäle sind eine Unterfamilie der TRP Ionenkanäle. TRPV Kanäle werden in zwei Gruppen unterteilt, TRPV1-4 und TRPV5/6. TRPV1-4 Kanäle sind nicht selektive Kationen Kanäle, welche durch unterschiedliche Stimuli wie Hitze, Vanilloide, osmotischen Stress und niedrigen extrazellulären pH-Wert aktiviert werden. TRPV Kanäle exprimieren in zahlreichen Zelltypen und sind an einer Reihe von physiologischen Regulationsprozessen beteiligt.

In dieser Arbeit wurden die Ionenkanäle TRPV1, TRPV3 und TRPV4 unter zur Hilfenahme des *Xenopus* Oozyten Expressionssystems elektrophysiologisch charakterisiert. Im Rahmen der Messungen wurden die Ionenkanäle unterschiedlichen Aktivatoren und Lösungen ausgesetzt. Hierbei zeigten die Ionenkanäle TRPV3 und TRPV4 eine Aktivierung durch intrazelluläre Protonen und TRPV1 eine Herabsetzung der Capsaicinresponse in der Anwesenheit von intrazellulärem Mg^{2+} . Alle Messungen von TRPV Strömen in dieser Arbeit sind in der inside-out Konfiguration der Patch-Clamp-Technik registriert worden.

4.1 Elektrophysiologische Charakterisierung der TRPV1 Ionenkanäle

4.1.1 Aktivierung der TRPV1 Ionenkanäle durch 2-APB

Um zu überprüfen, ob eine suffiziente Expression der TRPV1 Kanäle in *Xenopus* Oozyten stattfindet wurde die RNA von TRPV1 in die Oozyten injiziert. Nach der Inkubation der Oozyten wurden die Kanäle als Positivkontrolle, in der inside-out Technik, mittels des Aktivators 2-Aminoethoxydiphenyl borate stimuliert.

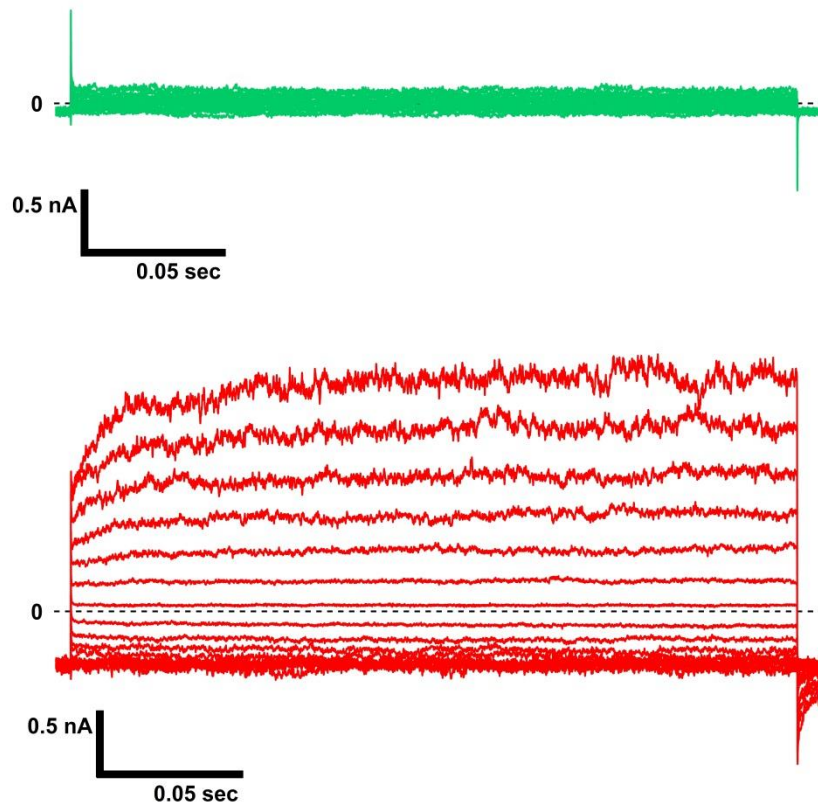
Die Messungen wurden in einer 120 mM Kaliumchloridlösung intra- als auch extrazellulär durchgeführt und 500 μ M 2-Aminoethoxydiphenyl borate an die exzidierten inside-out Patche gespült.

Die TRPV1 Ströme unter Kontrollbedingungen sind in Grün dargestellt. Kontrollbedingungen bedeutet in diesem Fall, dass die 120 mM Kaliumchloridlösung einen pH von 8 aufweist und die Lösung keinen Aktivator enthält.

Die Ströme der aktivierten TRPV1 Kanäle sind in Rot dargestellt. Das in PatchMaster verwendete IV-Protokoll weist 250 msec Spannungssprünge von -100 mV bis +60 mV und ein Haltepotential von -80 mV auf. Deutlich zu sehen ist, dass nach TRPV1 Kanalstimulierungen durch 2-Aminoethoxydiphenyl borate der Stromfluss spannungsabhängig zunimmt.

Zusätzlich ist eine Strom-Spannungs-Beziehung für TRPV1 dargestellt. Auch hier steht die grüne Kurve für die Messung unter Kontrollbedingungen und die rote Kurve für die Messung unter Aktivierung durch 2-Aminoethoxydiphenyl borate (Abb. 4.1).

A



B

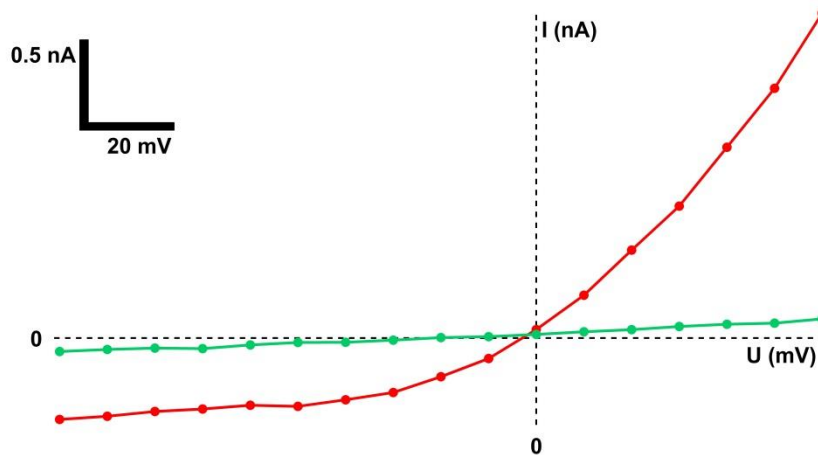


Abb. 4.1: TRPV1 Ströme nach Aktivierung mit 2-APB

(A) TRPV1 Ströme unter Kontrollbedingungen (Grün) und nach Stimulation mit 500 μ M 2-APB (Rot), gemessen in inside-out Patches aus *Xenopus* Oozyten unter der Benutzung von 250 msec Spannungssprüngen von -100 mV bis +60 mV und einem Haltepotential von -80 mV.

(B) Strom-Spannungs-Beziehung der in (A) gemessenen Ströme. (Kontrolle: Grün, nach Stimulation: Rot).

4.1.2 Aktivierung der TRPV1 Ionenkanäle durch intrazelluläre Capsaicin- und 2-APB Applikation

Um die Capsaicin- und 2-Aminoethoxydiphenyl borate Response der TRPV1 Kanäle zu untersuchen, wurden die Kanäle mit einem Rampenprotokoll stimuliert, welches eine Spannungsrampe von -80 mV bis +80 mV und ein Haltepotential von -80 mV aufweist. Das Sweep-Intervall beträgt 2 sec.

Gezeigt sind inside-out Messungen an *Xenopus* Oozyten, welche TRPV1 exprimieren. Als Positivkontrolle wurden die Kanäle mittels 10 μ M Capsaicin aktiviert. Die entsprechende Rampe unter Capsaicin Zugabe ist in Rot gekennzeichnet.

Ebenso erfolgte eine TRPV1 Kanalstimulation mittels 500 μ M 2-Aminoethoxydiphenyl borate. Die zugehörige Rampe unter 2-Aminoethoxydiphenyl borate Applikation ist in Magenta dargestellt.

Um zu testen, ob sich die TRPV1 Ströme auch inhibieren lassen, wurde der etablierte Blocker Tetrapentylamonium (TPA) ausgewählt. Dieser wurde in einer Konzentration von 40 μ M auf die exidierten Patche gegeben. Die Rampe unter TPA Applikation ist in Schwarz gekennzeichnet.

Die Kontrollbedingung, bei Spülung mit einer 120 mM Kaliumchloridlösung (pH 8) ohne Aktivator, ist in Grün markiert.

Wie erwartet aktivieren Capsaicin und 2-Aminoethoxydiphenyl borate den TRPV1 Kanal. Unter Kontrollbedingungen ist kaum ein Stromfluss zu beobachten. Die in Schwarz dargestellte Rampe zeigt deutlich, dass der minimale Reststrom der bei Kontrollbedingungen noch fließt unter Tetrapentylamonium Zugabe vollständig geblockt werden kann (Abb. 4.2).

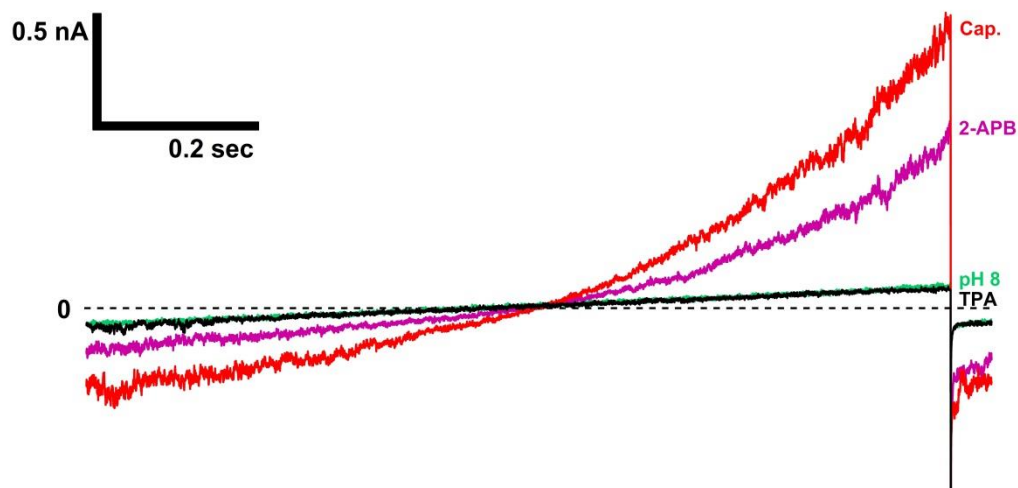


Abb. 4.2: TRPV1 Ströme nach Aktivierung durch intrazelluläre Capsaicin- und 2-APB Applikation

Inside-out Stromspuren gemessen in *Xenopus* Oozyten von TRPV1 Kanälen nach Stimulation mit Rampenprotokollen (2 sec Sweep-Intervall, von -80 mV bis +80 mV, -80 mV Haltepotential). Als Positivkontrolle erfolgte die Aktivierung mit 10 μ M Capsaicin (Rot). Ebenso erfolgte eine Kanalstimulation mittels 500 μ M 2-Aminoethoxydiphenyl borate (Magenta). Unter Kontrollbedingungen ist kaum ein Stromfluss zu beobachten (Grün). TRPV1 Ströme wurden mit 40 μ M Tetrapentylamonium (TPA) inhibiert.

4.1.3 Wirkung von Polylysin auf die PtdIns(4,5)P₂ abhängige Capsaicinaktivierung des TRPV1 Kanals

Die Modulation des TRPV1 Kanals durch natürliches Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdIns(4,5)P₂) wird in der Literatur häufig beschrieben. Anhand von Messungen bei denen TRPV1 durch Capsaicin aktiviert wird ist mehrfach gezeigt worden, dass durch Depletion von PtdIns(4,5)P₂ die TRPV1 Kanalaktivität deutlich abnimmt.

Auch bekannt aus der Literatur ist, dass Polylysin (PolyK) an PtdIns(4,5)P₂ bindet und somit das PtdIns(4,5)P₂ der Bindung an TRPV1 nicht mehr zu Verfügung steht. Dieses bewirkt eine Inhibition der durch Capsaicin hervorgerufenen Aktivierung. Somit scheint eine Modulation durch PtdIns(4,5)P₂ für den TRPV1 Kanal physiologisch relevant zu sein.

Wie in der Literatur gezeigt wird, ist eine Aktivierung des TRPV1 Kanals durch Capsaicin nur möglich, solange ausreichend PtdIns(4,5)P₂ zur Bindung an den TRPV1 Kanal zur Verfügung steht. Wird PtdIns(4,5)P₂ zum Beispiel durch Polylysin gebunden steht es hierfür nicht mehr zur Verfügung.

Somit ist nach Polylysin Behandlung keine Aktivierung des TRPV1 Kanals durch Capsaicin mehr möglich. Nach einer Spülung mit PtdIns(4,5)P₂ zeigt die Literatur jedoch, dass anschließend der TRPV1 haltige Patch wieder durch Capsaicin aktivierbar wird. Der TRPV1 Kanal reagierte nach PtdIns(4,5)P₂ Behandlung erneut mit einer Stromantwort, welche zuvor durch die Polylysinbehandlung unterbunden werden konnte (Ufret-Vincenty et al., 2011).

4.1.4 Wirkung von Mg²⁺ und Mg-ATP auf die Capsaicinresponse des TRPV1 Kanals

Bei Messungen am TRPV1 Kanal mit unterschiedlichen physiologischen Lösungen wurde eine Herabsetzung der TRPV1 Capsaicinresponse in Anwesenheit von intrazellulärem Mg²⁺ festgestellt. Ebenso konnte in diesem Rahmen eine Rückkehr der TRPV1 Capsaicinresponse durch Mg-ATP Applikation beobachtet werden.

Zur genaueren elektrophysiologischen Charakterisierung dieses Effekts, wurde ein TRPV1 haltiger inside-out Patch bei +40 mV von einem kontinuierlichem Puls gehalten. Ausgehend von den Kontrollbedingungen wurde der Patch mittels 10 µM Capsaicin aktiviert. Anschließend wurde unter Applikation von 5 mM MgCl₂ ein Rundown der TRPV1 Kanalaktivität beobachtet. Aus dem herunterregulierten Zustand erfolgte dann durch Applikation von 10 µM Capsaicin und 2 mM Mg-ATP eine Reaktivierung des TRPV1 Kanals, welche auch unter alleiniger Gabe von 10 µM Capsaicin anhielt. Unter Kontrollbedingungen zeigte der Patch abschließend keine Aktivität (Abb. 4.3 und Abb. 4.4).

Wie in der Literatur bereits beschrieben, ist die Bindung von PtdIns(4,5)P₂ durch Polylysin ein wirksamer Mechanismus um die Capsaicinsensitivität des TRPV1 Kanals herunter zu regulieren. Somit ist PtdIns(4,5)P₂ ein entscheidender Faktor für die Aktivierbarkeit des TRPV1 Kanals durch Capsaicin.

Basierend auf der Theorie, welche durch die Literatur getragen wird, dass sich im exidierten Patch auch Phosphatasen befinden müssen, ist die Induktion einer endogenen PtdIns(4,5)P₂ Depletion denkbar. Da der überwiegende Teil der Phosphatasen Mg²⁺ als Cofaktor benötigt, sollte ein Anstieg der intrazellulären Mg²⁺ Konzentration zahlreiche der mit exidierten Phosphatasen rekrutieren

können. Folglich müsste eine PtdIns(4,5)P₂ Depletion durch endogene Phosphatasen ablaufen, welche eine Inhibierung des TRPV1 Kanals hervorruft (Lee et al., 2005).

Eine, durch im Patch befindliche Kinasen, endogene PtdIns(4,5)P₂ Neogenese ist ebenso wahrscheinlich. Wie schon in der Literatur gezeigt wurde, kann dieses unter zur Hilfenahme von Mg-ATP (Magnesium- Adenosine 5'-triphosphate) geschehen. Dieses ermöglicht, in Anwesenheit bestimmter Kinasen, Inositide, beziehungsweise Phosphoinositide, zu phosphorylieren. Daher kann unter Mg-ATP Zugabe und unter der Voraussetzung das sich Kinasen im exidierten inside-out Patch befinden, endogen PtdIns(4,5)P₂ generiert werden (Lukacs et al., 2013).

Daher ist davon auszugehen, dass endogene Kinasen im exidierten Patch unter Zufuhr von Mg-ATP Inositide, beziehungsweise Phosphoinositide, weiter phosphorylieren und somit endogen PtdIns(4,5)P₂ produzieren. Dieses PtdIns(4,5)P₂ steht anschließend bereit, um eine Bindung zum TRPV1 Kanal einzugehen und somit das depletierte PtdIns(4,5)P₂ zu ersetzen. Daher, so wird postuliert, führt Mg-ATP durch endogene PtdIns(4,5)P₂ Produktion zu einer Reaktivierung der TRPV1 Capsaicinsensitivität.

Die durchgeführten Messungen zeigten anfangs unter Capsaicinabgabe eine, wie bisher beschriebene, Aktivierung des TRPV1 Kanals. Sobald von der Capsaicinlösung auf eine 5 mM MgCl₂ haltige Capsaicinlösung gewechselt wurde, war ein deutlicher Rundown zu sehen. Dieses bedeutet, dass der durch Capsaicin hervorgerufene TRPV1 Strom unter MgCl₂ Gabe sehr stark im zeitlichen Verlauf abnahm. Somit war durch Zugabe von 5 mM MgCl₂ die Capsaicinsensitivität des TRPV1 Kanals inhibiert worden.

Anschließend wurde der exidierte Patch ausgiebig mit Mg-ATP gespült. Nach Spülung mit Mg-ATP zeigte sich, dass der Kanal seine Capsaicinsensitivität zurückgewonnen hatte. Dieses gibt einen Hinweis darauf, dass eine PtdIns(4,5)P₂ Depletion durch endogene Phosphatasen stattgefunden haben muss, welche zu einer Inhibierung des TRPV1 Kanals führte. Die anschließende Mg-ATP Applikation bewirkte eine endogene Neogenese von PtdIns(4,5)P₂, welche somit die Funktionalität des TRPV1 Kanals wieder herstellte. Somit deuteten die Untersuchungen darauf hin, dass ein Magnesium abhängiger PtdIns(4,5)P₂ Katabolismus und ein Mg-ATP abhängiger PtdIns(4,5)P₂ Anabolismus bestehen, welche die TRPV1 Aktivität regulieren.

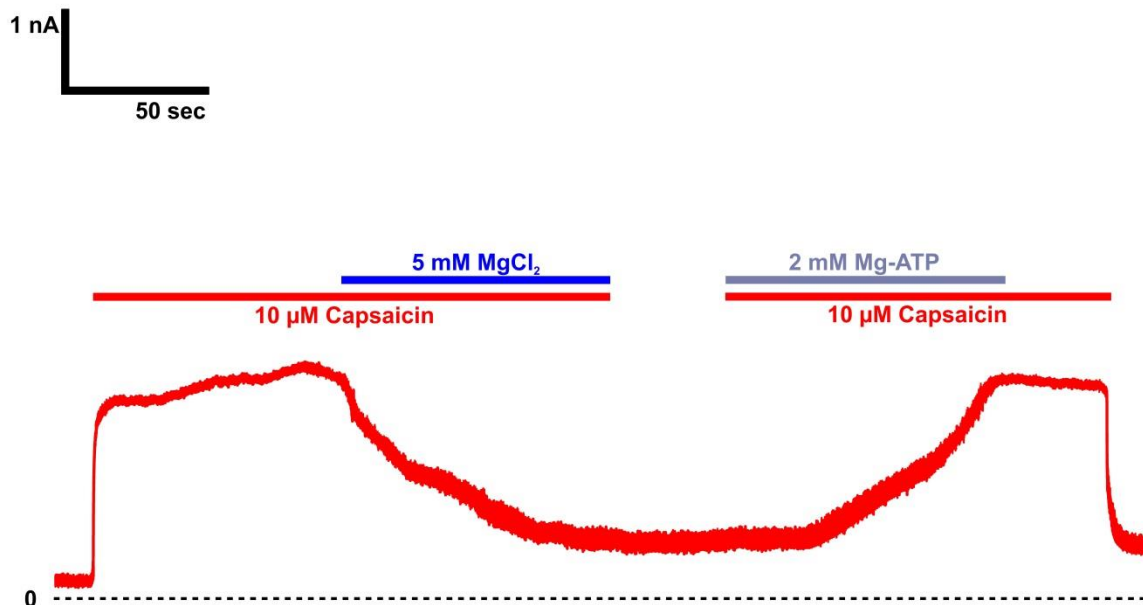


Abb. 4.3: Mg-ATP Applikation reaktiviert TRPV1 Kanal nach MgCl₂ Gabe

Die Expression der TRPV1 Kanäle erfolgte in *Xenopus* Oozyten. Die Patch-Clamp Messungen wurden in der inside-out Technik bei einem Haltepotential von +40 mV durchgeführt. Die Applikation von 5 mM MgCl₂ reguliert die Aktivierbarkeit des TRPV1 Kanals durch Capsaicin deutlich herunter. Die exogene Zufuhr von 2 mM Mg-ATP hebt die MgCl₂ Wirkung wieder auf und der Kanal lässt sich erneut durch Capsaicin aktivieren (n = 5).

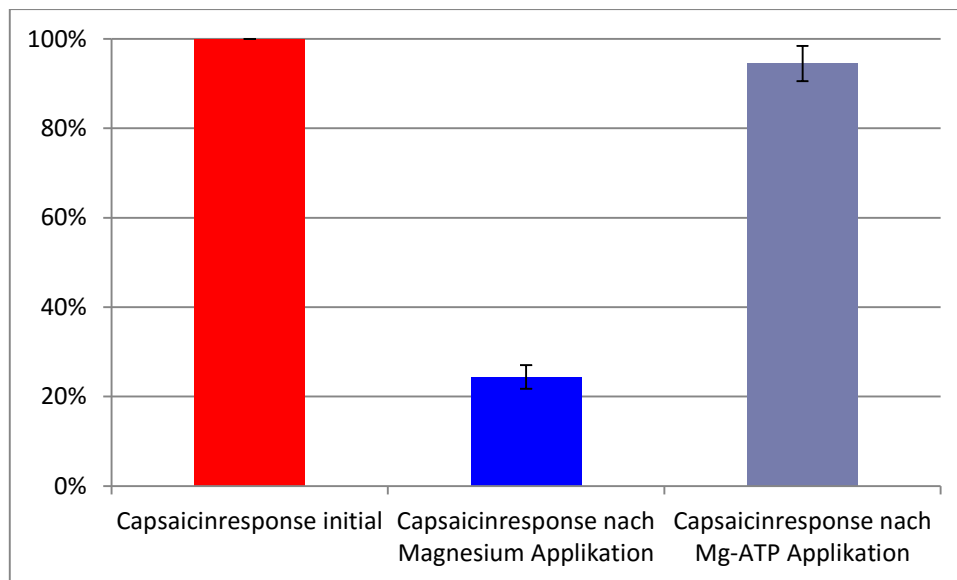


Abb. 4.4: Prozentuale Reaktivierung der TRPV1 Kanäle nach Mg-ATP Applikation

Die Expression der TRPV1 Kanäle erfolgte in *Xenopus* Oozyten. Die Patch-Clamp Messungen wurden in der inside-out Technik bei einem Haltepotential von +40 mV durchgeführt. Die Applikation von 5 mM MgCl₂ reguliert die Aktivierbarkeit des TRPV1 Kanals durch Capsaicin deutlich herunter. Die exogene Zufuhr von 2 mM Mg-ATP hebt die MgCl₂ Wirkung wieder auf und der Kanal lässt sich erneut durch Capsaicin aktivieren. Die Capsaicinaktivierung vor MgCl₂ Gabe wurde als 100% Aktivierung definiert. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes (n = 5).

4.2 Untersuchungen zur Regulation durch Protonen des TRPV3 Kanals

4.2.1 Aktivierung der TRPV3 Ionenkanäle durch 2-APB

Um zu überprüfen, ob eine suffiziente Expression der TRPV3 Kanäle in *Xenopus* Oozyten stattfindet wurde die RNA von TRPV3 in die Oozyten injiziert. Nach der Inkubation der Oozyten wurden die Kanäle als Positivkontrolle, in der inside-out Technik, mittels des bereits für sie beschriebenen Aktivators 2-APB stimuliert.

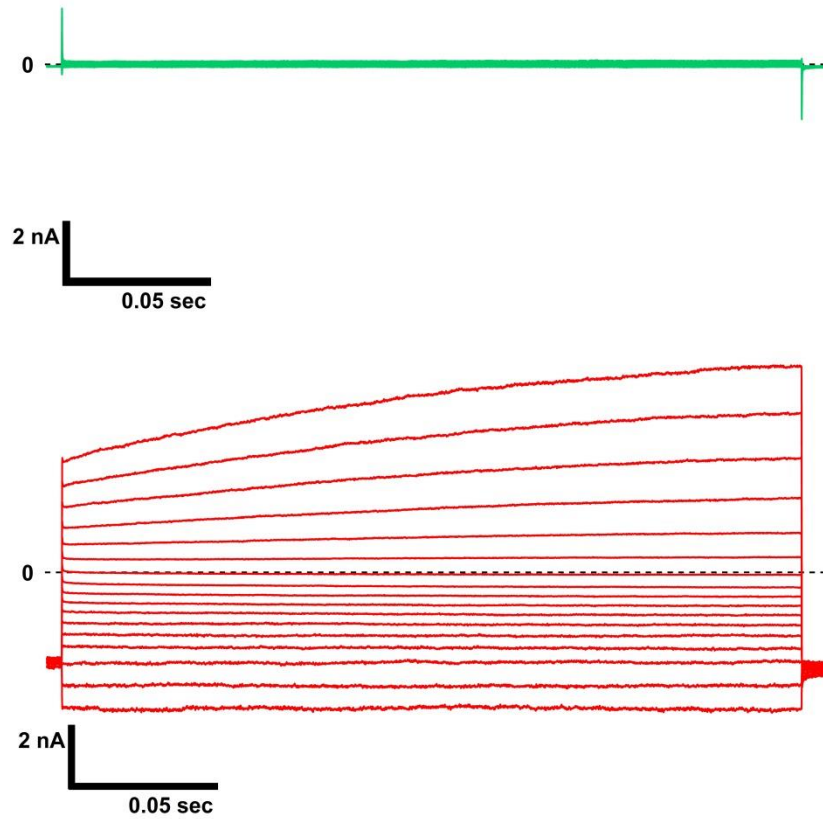
Die Messungen wurden in einer 120 mM Kaliumchloridlösung intra- als auch extrazellulär durchgeführt und 500 μ M 2-APB an die exzidierten inside-out Patche gespült.

Die TRPV3 Ströme unter Kontrollbedingungen sind in Grün dargestellt. Kontrollbedingungen bedeutet in diesem Fall, dass die 120 mM Kaliumchloridlösung einen pH von 8 aufweist und die Lösung keinen Aktivator enthält.

Die Ströme der aktivierten TRPV3 Kanäle sind in Rot dargestellt. Das in PatchMaster verwendete IV-Protokoll weist 250 msec Spannungssprünge von -100 mV bis +60 mV und ein Haltepotential von -80 mV auf. Deutlich zu sehen ist, dass nach TRPV3 Kanalstimulierungen durch 2-APB der Stromfluss spannungsabhängig zunimmt.

Zusätzlich ist eine Strom-Spannungs-Beziehung für TRPV3 dargestellt. Auch hier steht die grüne Kurve für die Messung unter Kontrollbedingungen und die rote Kurve für die Messung unter Aktivierung durch 2-APB (Abb. 4.5).

A



B

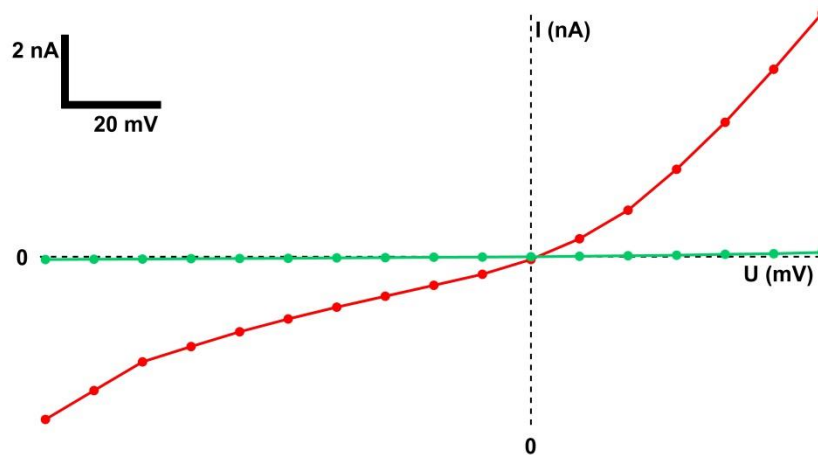


Abb. 4.5: TRPV3 Ströme nach Aktivierung mit 2-APB

(A) TRPV3 Ströme unter Kontrollbedingungen (Grün) und nach Stimulation mit 500 μM 2-APB (Rot), gemessen in inside-out Patches aus *Xenopus* Oozyten unter der Benutzung von 250 msec Spannungssprüngen von -100 mV bis +60 mV und einem Haltepotential von -80 mV.

(B) Strom-Spannungs-Beziehung der in (A) gemessenen Ströme. (Kontrolle: Grün, nach Stimulation: Rot).

4.2.2 Regulation der TRPV3 Ionenkanäle durch intrazelluläre Protonenkonzentration

Um zu untersuchen, ob die TRPV3 Kanäle einer intrazellulären pH abhängigen Regulation unterliegen, wurden die Kanäle mit einem Rampenprotokoll stimuliert, welches eine Spannungsrampe von -80 mV bis +80 mV und ein Haltepotential von -80 mV aufweist. Das Sweep-Intervall beträgt 2 sec.

Gezeigt sind inside-out Messungen an *Xenopus* Oozyten, welche TRPV3 exprimieren. Als Positivkontrolle wurden die Kanäle mittels 500 μ M 2-APB aktiviert. Die entsprechende Rampe unter 2-APB Zugabe ist in Rot gekennzeichnet.

Die Kontrollbedingung, bei Spülung mit einer 120 mM Kaliumchloridlösung (pH 8) ohne Aktivator, ist in Grün markiert.

Eine Protonensensitivität wurde mittels einer auf pH 5 eingestellten 120 mM Kaliumchloridlösung überprüft. Die Rampe hierzu ist in Blau gekennzeichnet.

Um zu testen, ob sich die TRPV3 Ströme auch inhibieren lassen, wurde der etablierte Blocker Tetrapentylamonium (TPA) ausgewählt. Dieser wurde in einer Konzentration von 40 μ M auf die exidierten Patche gegeben. Die Rampe unter TPA Applikation ist in Schwarz gekennzeichnet.

Wie erwartet aktiviert 2-APB den TRPV3 Kanal. Unter Kontrollbedingungen ist kaum ein Stromfluss zu beobachten. Die in Schwarz dargestellte Rampe zeigt deutlich, dass der minimale Reststrom der bei Kontrollbedingungen noch fließt unter Tetrapentylamonium Zugabe vollständig geblockt werden kann.

Deutlich zu erkennen ist, dass die auf pH 5 eingestellte 120 mM Kaliumchloridlösung den TRPV3 Kanal potent aktiviert (Abb. 4.6).

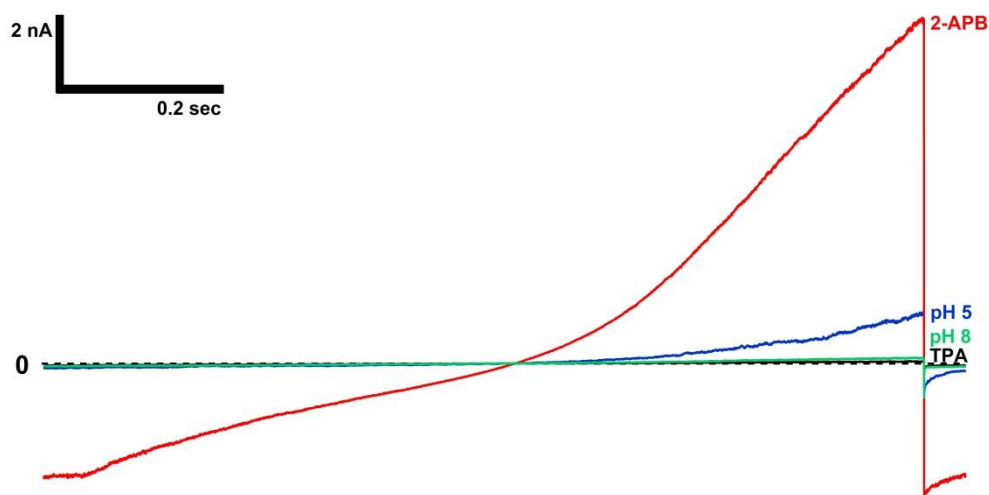


Abb. 4.6: TRPV3 Ströme nach Aktivierung durch intrazelluläre Protonen

Inside-out Stromspuren gemessen in *Xenopus* Oozyten von TRPV3 Kanälen nach Stimulation mit Rampenprotokollen (2 sec Sweep-Intervall, von -80 mV bis +80 mV, -80 mV Haltepotential). Als Positivkontrolle erfolgte die Aktivierung mit 500 μ M 2-APB. TRPV3 Ströme wurden mit 40 μ M Tetrapentylamonium (TPA) inhibiert.

4.2.3 pH-Abhängigkeit der TRPV3 Ionenkanäle

Um zu ermitteln, ob der TRPV3 Kanal ausschließlich eine Response auf pH 5 zeigt, oder ob auch andere Protonenkonzentrationen den TRPV3 Kanal stimulieren, wurden hierzu weitere Messungen durchgeführt.

Mittels eines Multibarrelapplikationssystems wurden die existierenden Patche mit 120 mM Kaliumchloridlösungen, welche unterschiedliche pH-Werte aufwiesen, in einer definierten Reihenfolge gespült. Verwendet wurden die pH-Werte pH 8, pH 7, pH 6,5, pH 6, pH 5,5, pH 5 und pH 4,5 in der genannten Reihenfolge.

Um den Grad der Spannungsaktivierung und damit die Versuchsbedingungen konstant zu halten, wurden die Messungen unter inside-out Bedingungen mit einem kontinuierlichen Puls bei +40 mV Haltepotential durchgeführt.

Die hierbei entstandene Grafik zeigt, dass bei pH 8 nur ein minimaler TRPV3 Reststrom zu erkennen ist. Auch bei pH 7 ist keine Aktivierung des TRPV3 Kanals zu erkennen. Wird von pH 7 auf pH 6,5 gewechselt wird der TRPV3 Kanal leicht aktiviert. Diese Aktivierung nimmt stetig mit Abnahme des pH-Wertes zu, bis letztlich bei pH 5,5 die Aktivierung maximal ist. Zu beachten ist, dass weiteres Absenken des pH-Wertes zu einer Inhibition des TRPV3 Kanals führt, welche bei pH 5 zu erkennen ist und bei pH 4,5 noch weiter zunimmt. Abschließend wurde der TRPV3 Kanal unter Zugabe von 40 μ M Tetrapentylamonium vollständig geblockt (Abb. 4.7).

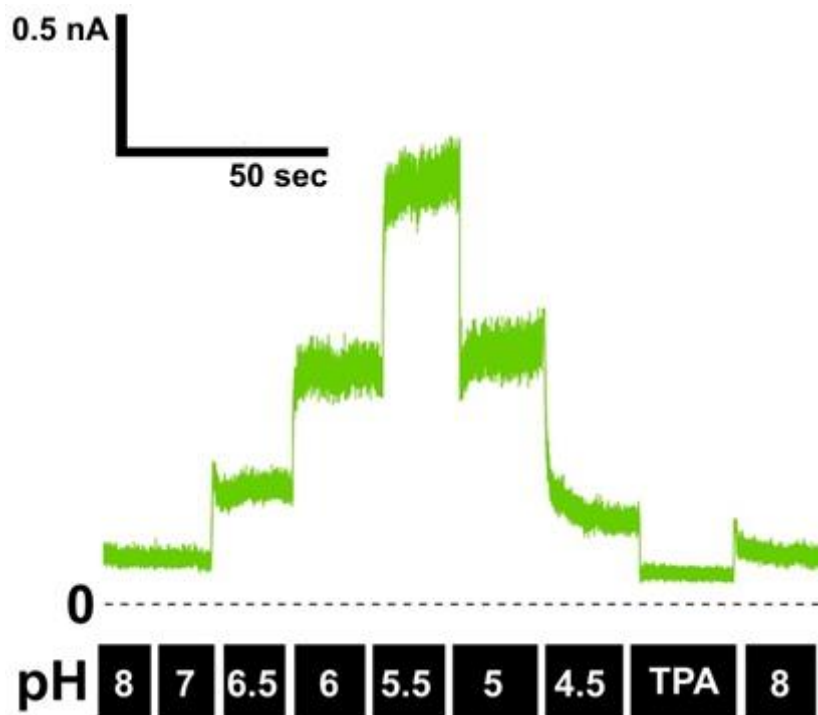


Abb. 4.7: pH-Abhängigkeit der TRPV3 Kanäle

TRPV3 Kanäle, gemessen bei +40 mV Haltepotential. Die TRPV3 Kanäle wurden mit den angegebenen unterschiedlichen pH-Werten stimuliert. Ab pH-Werten unter pH 5,5 erfolgt eine Reduzierung der TRPV3 Ströme. Ströme gemessen in inside-out Patchen aus Xenopus Oozyten (n = 6).

4.2.4 pH-Dosis-Wirkungs-Kurve der TRPV3 Ionenkanäle

Anhand der intrazellulären TRPV3 pH-Abhängigkeitsmessungen, welche unter konstanten Bedingungen durchgeführt wurden, konnten anschließend die halbmaximale und die maximale pH-Aktivierung der Kanäle berechnet werden.

Hierzu wurde der Grad der maximalen Aktivierung als 100 Prozent definiert. 100 Prozent Aktivierung hatte der TRPV3 Kanal bei pH 5,5 erreicht. Für jeden verwendeten pH-Wert konnte aus der Continuous Pulse Messung (+40 mV Haltepotential) die entsprechend durch Aktivierung hervorgerufene Stromstärke ermittelt werden. Hierzu wurde in der PatchMaster Software der entsprechende Messbereich markiert und mittels der Mean-Funktion die durchschnittliche Stromstärke für den jeweiligen pH-Wert berechnet. Mittels des Dreisatzes konnte somit für jeden pH-Wert, in Relation zur maximalen Aktivierung (100 Prozent), eine relative prozentuale Aktivierung berechnet werden.

Ferner konnte für alle relativen prozentualen Aktivierungen aus den diversen Einzelmessungen eine mediane relative prozentuale Aktivierung für die pH-Werte pH 8, pH 7, pH 6,5, pH 6, pH 5,5, pH 5 und pH 4,5 mittels der Software Excel berechnet werden.

Diese Werte der medianen relativen prozentualen Aktivierung wurden in der Software Igor tabellarisch den jeweiligen pH-Werten beziehungsweise Protonenkonzentrationen zugeordnet. Aus den eingegebenen Daten kalkulierte Igor die entsprechende pH-Abhängigkeitskurve für TRPV3. Auf diese durch Igor kalkulierte Kurve wurde die Hill-Gleichung angewendet.

Nach Anwendung der Hill-Gleichung konnten durch Igor der EC_{50} für die pH abhängige Aktivierung des TRPV3 Kanals ermittelt werden. Der EC_{50} beträgt $6,3 \pm 0,1$, der Hill-Koeffizient $7,3 \pm 3,4$ und die maximale Aktivierung liegt bei pH 5,5 (Abb. 4.8 und Abb. 4.9).

Als Grenze für die Anwendung der Hill-Gleichung und zur Berechnung des EC_{50} wurde der Bereich von pH 8 bis einschließlich pH 5,5 definiert. Nachfolgende, weiter im sauren Milieu liegende pH-Werte, wurden nicht in die Berechnungen mit aufgenommen, da die maximal durch Protonen hervorgerufene TRPV3 Aktivierung bei pH 5,5 liegt. Eine weitere Zunahme der Protonenkonzentration führt zur Inhibition des TRPV3 Kanals. Daher verläuft die pH-Dosis-Wirkungs-Kurve in Abb. 4.8 durch den Bereich der pH-Werte 8 bis einschließlich 5,5. Alle weiter im sauren Milieu liegenden Punkte liegen außerhalb der Kurve.

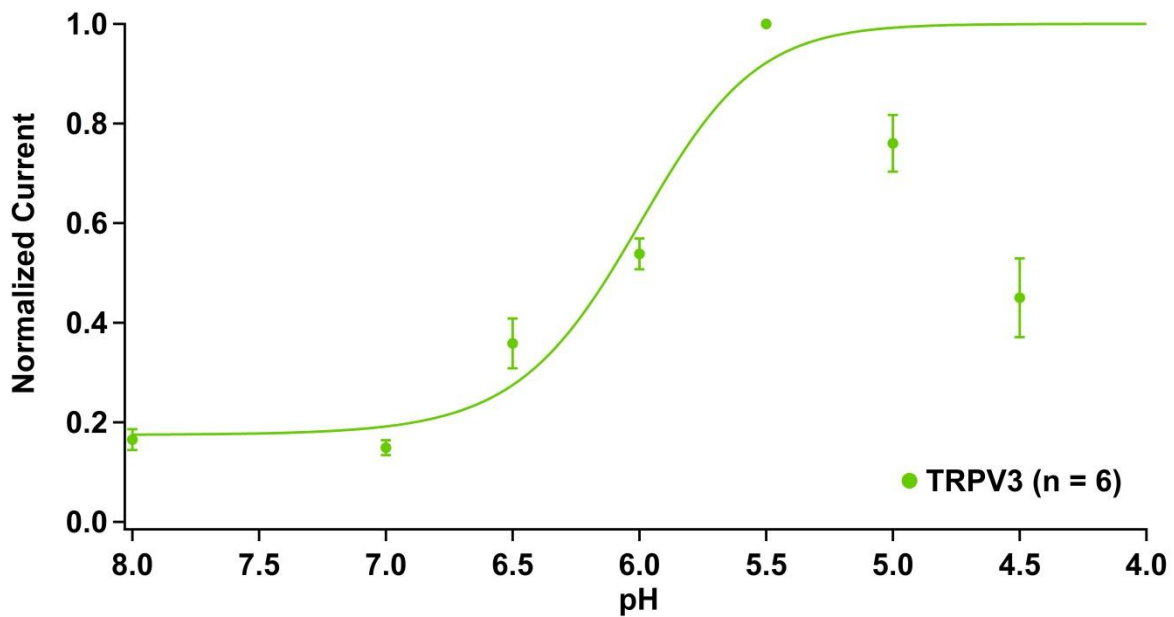


Abb. 4.8: pH-Dosis-Wirkungs-Kurve des TRPV3 Kanals

Dosis-Wirkungs-Kurve der durch Protonen induzierten Ströme für den TRPV3 Kanal. Nach Anwendung der Hill-Gleichung, innerhalb der definierten Grenze pH 8 bis einschließlich 5,5, ergeben sich für den TRPV3 Kanal ein EC_{50} von $6,3 \pm 0,1$, ein Hill Koeffizient von $7,3 \pm 3,4$ und eine maximale Aktivierung bei pH 5,5. Weiteres Absenken des pH-Wertes unter pH 5,5 führt zu einer Inhibition des TRPV3 Kanals. Die Ströme wurden gemessen in inside-out Patches aus *Xenopus* Oozyten (n = 6).

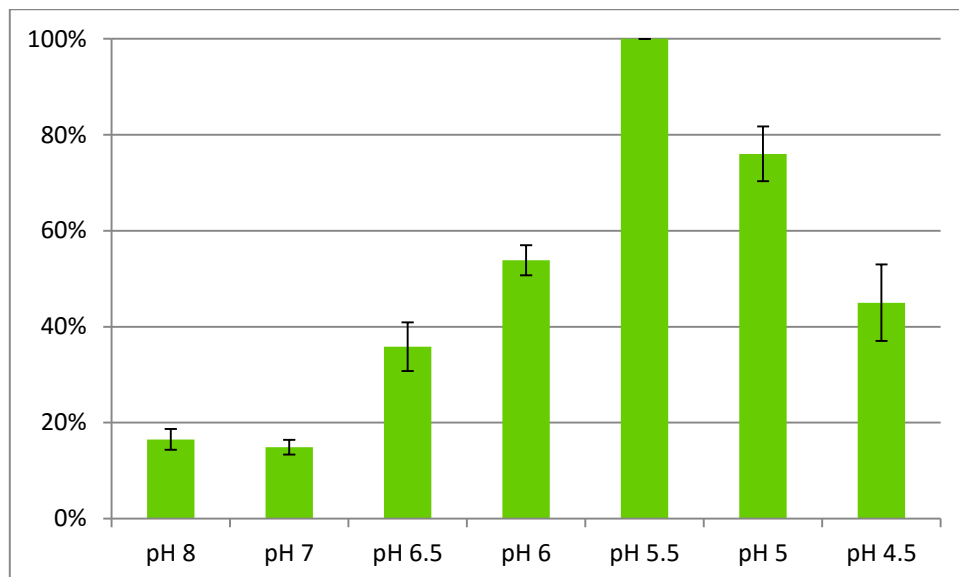


Abb. 4.9: pH-Abhängigkeit des TRPV3 Kanals

Wie in der vorherigen Abbildung gezeigt, wurden die durch Protonen induzierten Ströme für den TRPV3 Kanal bei den jeweils angegebenen pH-Werten ermittelt. Dieses erfolgte durch eine Continuous Pulse Messung bei +40 mV Haltepotential. Die maximale Aktivierung wurde bei pH 5,5 erreicht und als 100% definiert. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes. Die Ströme wurden gemessen in inside-out Patches aus *Xenopus* Oozyten (n = 6).

4.3 Untersuchungen zur Regulation durch Protonen des TRPV4 Kanals

4.3.1 Aktivierung der TRPV4 Ionenkanäle durch 4 α PDD

Um zu überprüfen, ob eine suffiziente Expression der TRPV4 Kanäle in *Xenopus* Oozyten stattfindet wurde die RNA von TRPV4 in die Oozyten injiziert. Nach der Inkubation der Oozyten wurden die Kanäle als Positivkontrolle, in der inside-out Technik, mittels des für sie spezifischen Aktivators 4 α PDD (4 α -Phorbol 12,13-didecanoate) stimuliert.

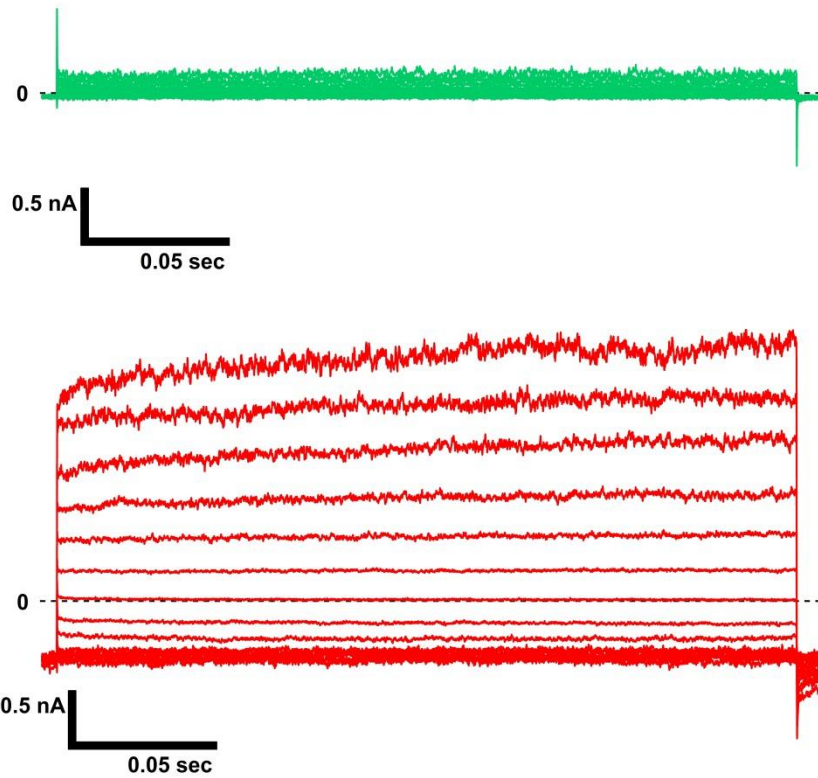
Die Messungen wurden in einer 120 mM Kaliumchloridlösung intra- als auch extrazellulär durchgeführt und 1 μ M 4 α PDD an die exzidierten inside-out Patche gespült.

Die TRPV4 Ströme unter Kontrollbedingungen sind in Grün dargestellt. Kontrollbedingungen bedeutet in diesem Fall, dass die 120 mM Kaliumchloridlösung einen pH von 8 aufweist und die Lösung keinen Aktivator enthält.

Die Ströme der aktivierten TRPV4 Kanäle sind in Rot dargestellt. Das in PatchMaster verwendete IV-Protokoll weist 250 msec Spannungssprünge von -100 mV bis +60 mV und ein Haltepotential von -80 mV auf. Deutlich zu sehen ist, dass nach TRPV4 Kanalstimulierungen durch 4 α PDD der Stromfluss spannungsabhängig zunimmt.

Zusätzlich ist eine Strom-Spannungs-Beziehung für TRPV4 dargestellt. Auch hier steht die grüne Kurve für die Messung unter Kontrollbedingungen und die rote Kurve für die Messung unter Aktivierung durch 4 α PDD (Abb. 4.10).

A



B

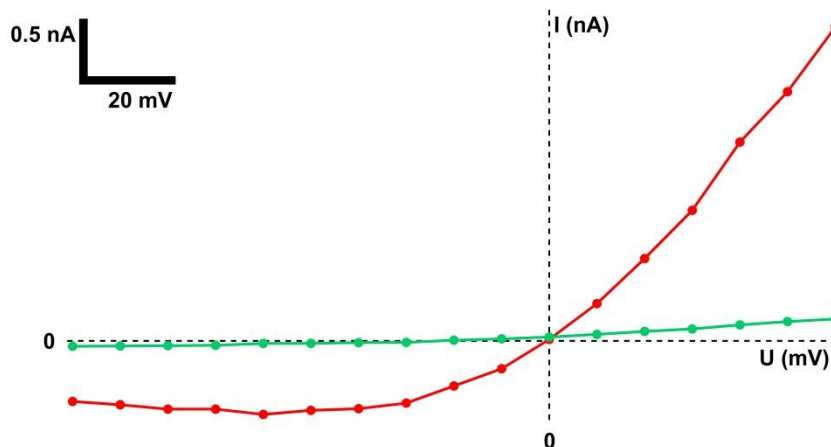


Abb. 4.10: TRPV4 Ströme nach Aktivierung mit 4αPDD

(A) TRPV4 Ströme unter Kontrollbedingungen (Grün) und nach Stimulation mit 1 μ M 4αPDD (Rot), gemessen in inside-out Patches aus *Xenopus* Oozyten unter der Benutzung von 250 msec Spannungssprüngen von -100 mV bis +60 mV und einem Haltepotential von -80 mV.

(B) Strom-Spannungs-Beziehung der in (A) gemessenen Ströme. (Kontrolle: Grün, nach Stimulation: Rot).

4.3.2 Regulation der TRPV4 Ionenkanäle durch intrazelluläre Protonenkonzentration

Um zu untersuchen, ob die TRPV4 Kanäle einer intrazellulären pH abhängigen Regulation unterliegen, wurden die Kanäle mit einem Rampenprotokoll stimuliert, welches eine Spannungsrampe von -80 mV bis +80 mV und ein Haltepotential von -80 mV aufweist. Das Sweep-Intervall beträgt 2 sec.

Gezeigt sind inside-out Messungen an *Xenopus* Oozyten, welche TRPV4 exprimieren. Als Positivkontrolle wurden die Kanäle mittels 1 μ M 4 α PDD aktiviert. Die entsprechende Rampe unter 4 α PDD Zugabe ist in Rot gekennzeichnet.

Die Kontrollbedingung, bei Spülung mit einer 120 mM Kaliumchloridlösung (pH 8) ohne Aktivator, ist in Grün markiert.

Eine Protonensensitivität wurde mittels einer auf pH 5 eingestellten 120 mM Kaliumchloridlösung überprüft. Die Rampe hierzu ist in Blau gekennzeichnet.

Um zu testen, ob sich die TRPV4 Ströme auch inhibieren lassen, wurde der etablierte Blocker Tetrapentylamonium (TPA) ausgewählt. Dieser wurde in einer Konzentration von 40 μ M auf die exidierten Patche gegeben. Die Rampe unter TPA Applikation ist Schwarz gekennzeichnet.

Wie erwartet aktiviert 4 α PDD den TRPV4 Kanal. Unter Kontrollbedingungen ist kaum ein Stromfluss zu beobachten. Die in Schwarz dargestellte Rampe zeigt deutlich, dass der minimale Reststrom der bei Kontrollbedingungen noch fließt unter Tetrapentylamonium Zugabe vollständig geblockt werden kann.

Deutlich zu erkennen ist, dass die auf pH 5 eingestellte 120 mM Kaliumchloridlösung den TRPV4 Kanal nicht aktiviert (Abb. 4.11).

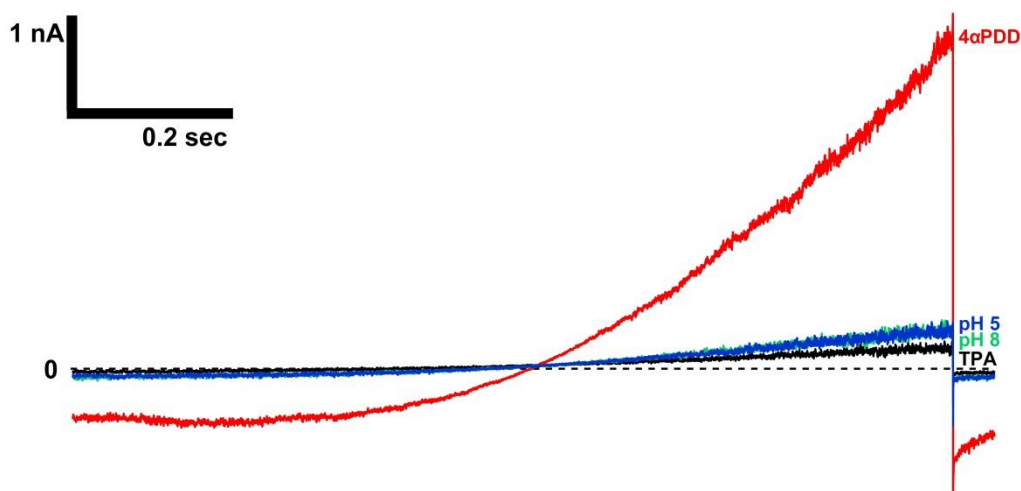


Abb. 4.11: TRPV4 Ströme nach Aktivierung durch 4 α -Phorbol 12,13-didecanoate

Inside-out Stromspuren gemessen in *Xenopus* Oozyten von TRPV4 Kanälen nach Stimulation mit Rampenprotokollen (2 sec Sweep-Intervall, von -80 mV bis +80 mV, -80 mV Haltepotential). Als Positivkontrolle erfolgte die Aktivierung mit 1 μ M 4 α PDD. TRPV4 Ströme wurden mit 40 μ M Tetrapentylamonium (TPA) inhibiert.

4.3.3 pH-Abhängigkeit der TRPV4 Ionenkanäle

Um zu ermitteln, ob der TRPV4 Kanal ausschließlich keine Response auf pH 5 zeigt, oder ob eventuell andere Protonenkonzentrationen den TRPV4 Kanal stimulieren, wurden hierzu weitere Messungen durchgeführt.

Mittels eines Multibarrelapplikationssystems wurden die existierenden Patche mit 120 mM Kaliumchloridlösungen, welche unterschiedliche pH-Werte aufwiesen, in einer definierten Reihenfolge gespült. Verwendet wurden die pH-Werte pH 8, pH 7, pH 6, pH 5, pH 4 und der TRPV4 Aktivator 4 α PDD in der genannten Reihenfolge.

Um den Grad der Spannungsaktivierung und damit die Versuchsbedingungen konstant zu halten, wurden die Messungen unter inside-out Bedingungen mit einem kontinuierlichen Puls bei +40 mV Haltepotential durchgeführt.

Die hierbei entstandene Grafik zeigt, dass der TRPV4 Kanal im Bereich von pH 8 bis einschließlich pH 5 weitgehend pH-insensitiv ist. Erst ab pH 4 scheint der TRPV4 Kanal eine leichte Aktivierung zu erfahren. Zur Kontrolle und zur Schaffung eines Referenzwertes für die spätere Auswertung wurde der Kanal mit 1 μ M 4 α PDD erfolgreich aktiviert. Abschließend wurde der TRPV4 Kanal unter Zugabe von 40 μ M Tetrapentylammonium geblockt (Abb. 4.12).

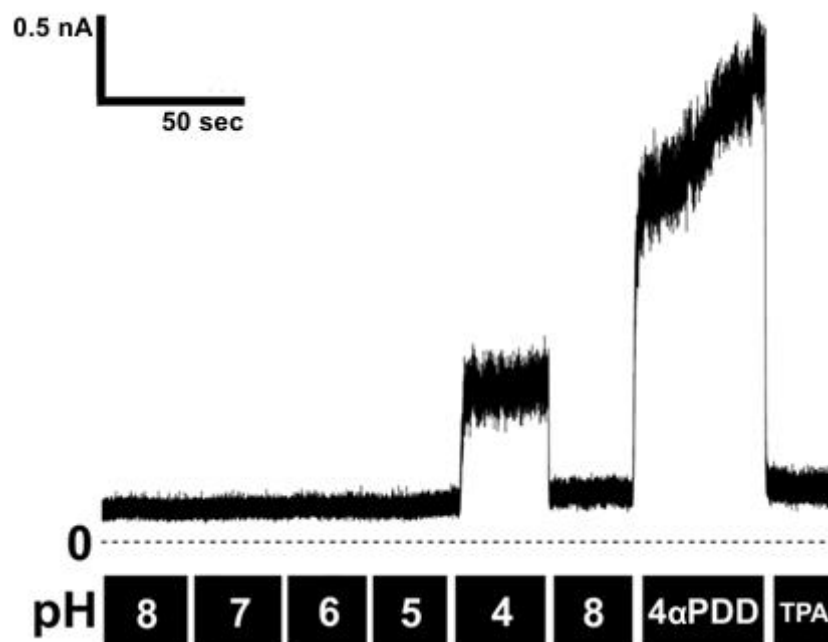


Abb. 4.12: pH-Abhängigkeit der TRPV4 Kanäle

TRPV4 Kanäle, gemessen bei +40 mV Haltepotential. Die TRPV4 Kanäle wurden mit den angegebenen unterschiedlichen pH-Werten stimuliert. Der TRPV4 Kanal ist nahezu pH-insensitiv. Ströme gemessen in inside-out Patchen aus *Xenopus* Oozyten (n = 5).

4.3.4 pH-Abhängigkeitskurve der TRPV4 Ionenkanäle

Anhand der intrazellulären TRPV4 pH-Abhängigkeitsmessungen, welche unter konstanten Bedingungen durchgeführt wurden, konnte anschließend eine Übersicht für die TRPV4 pH-Abhängigkeit berechnet werden.

Hierzu wurde der Grad der maximalen Aktivierung als 100 Prozent definiert. 100 Prozent Aktivierung hatte der TRPV4 Kanal bei Stimulierung mit 1 μM 4 α PDD erreicht. Für jeden verwendeten pH-Wert konnte aus der Continuous Pulse Messung (+40 mV Haltepotential) die entsprechend gemessene Stromstärke ermittelt werden. Hierzu wurde in der PatchMaster Software der entsprechende Messbereich markiert und mittels der Mean-Funktion die durchschnittliche Stromstärke für den jeweiligen pH-Wert berechnet. Mittels des Dreisatzes konnte somit für jeden pH-Wert, in Relation zur maximalen Aktivierung (100 Prozent), eine relative prozentuale Aktivierung berechnet werden.

Ferner konnte für alle relativen prozentualen Aktivierungen aus den diversen Einzelmessungen eine mediane relative prozentuale Aktivierung für die pH-Werte pH 8, pH 7, pH 6, pH 5 und pH 4 mittels der Software Excel berechnet werden.

Diese Werte der medianen relativen prozentualen Aktivierung wurden in der Software Igor tabellarisch den jeweiligen pH-Werten beziehungsweise Protonenkonzentrationen zugeordnet. Aus den eingegebenen Daten kalkulierte Igor die entsprechende pH-Abhängigkeitskurve für TRPV4. Da der TRPV4 Kanal scheinbar pH-insensitiv ist und nur bei pH 4 eine leichte Aktivierung zeigt, ergibt sich hieraus keine konventionelle Dosis-Wirkungs-Kurve, sondern annähernd eine Gerade, welche ein äußerstes Maximum bei pH 4 zeigt. Auf diese durch Igor kalkulierte Gerade würde die Anwendung der Hill-Gleichung zu keinem aussagekräftigen Ergebnis führen.

Daher ist festzustellen, dass der TRPV4 Kanal weitgehend pH-insensitiv ist und bei pH 4 eine leichte Aktivierung zeigt. Hingegen lässt sich der Kanal durch seinen spezifischen Aktivator 4 α PDD sehr potent aktivieren (Abb. 4.13 und Abb. 4.14).

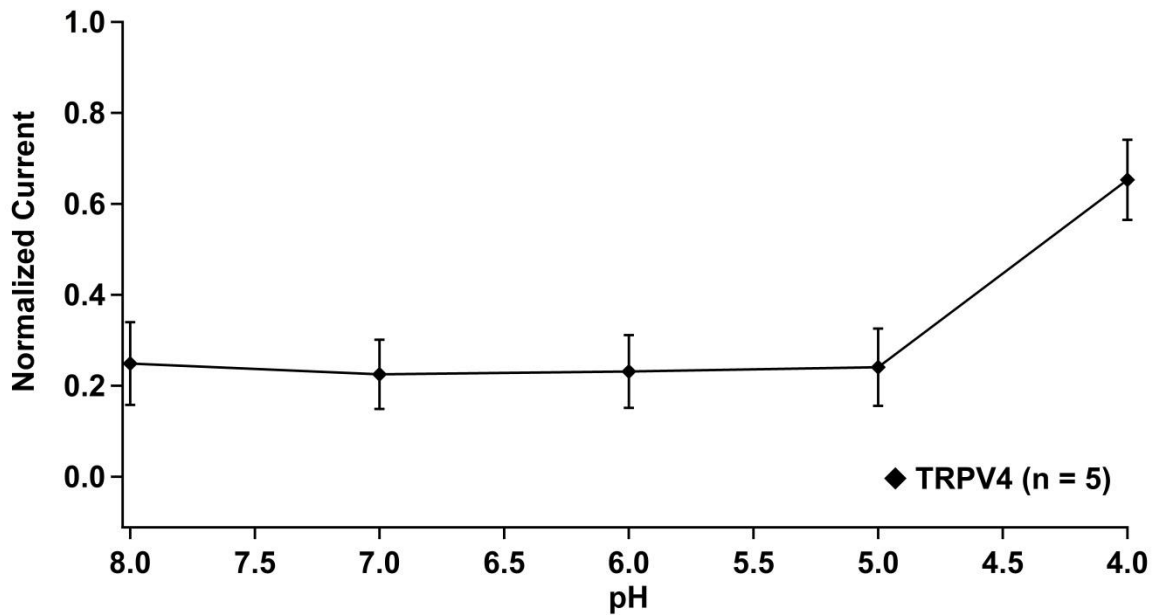


Abb. 4.13: pH-Abhängigkeitskurve des TRPV4 Kanals

pH-Abhängigkeitskurve der durch Protonen induzierten Ströme für den TRPV4 Kanal. Der Grad der maximalen Aktivierung wurde als 100% definiert. Diese hatte TRPV4 bei Stimulierung mit 1 μ M 4 α PDD erreicht. Der TRPV4 Kanal ist weitgehend pH-insensitiv. Bei pH 4 zeigt der TRPV4 Kanal eine leichte Aktivierung. Hingegen lässt sich der Kanal durch seinen spezifischen Aktivator 4 α PDD sehr potent aktivieren. Die Ströme wurden gemessen in inside-out Patchen aus *Xenopus* Oozyten (n = 5).

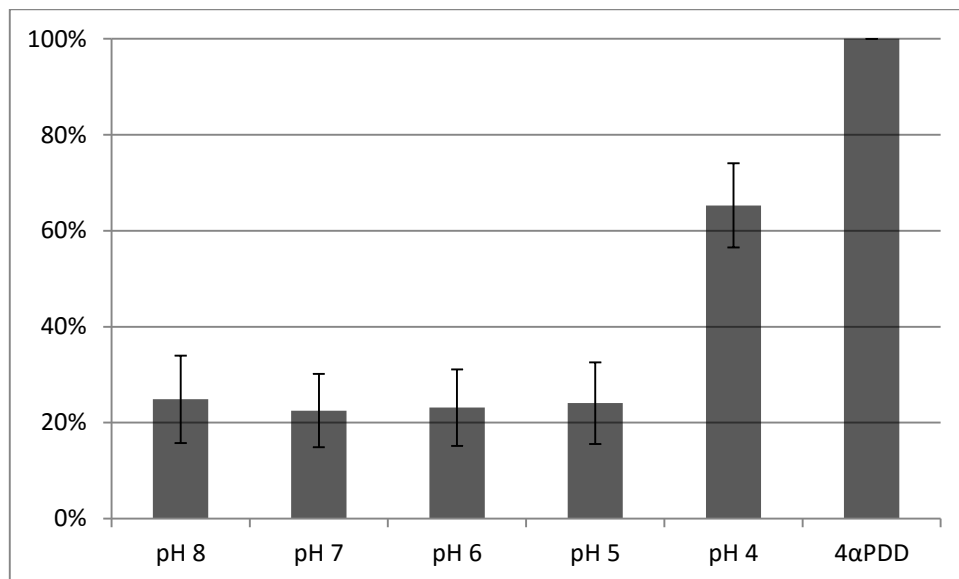


Abb. 4.14: pH-Abhängigkeit des TRPV4 Kanals

Wie in der vorherigen Abbildung gezeigt, wurden die durch Protonen induzierten Ströme für den TRPV4 Kanal bei den jeweils angegebenen pH-Werten ermittelt. Dieses erfolgte durch eine Continuous Pulse Messung bei +40 mV Haltepotential. Die maximale Aktivierung wurde bei 1 μ M 4 α PDD erreicht und als 100% definiert. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes. Die Ströme wurden gemessen in inside-out Patchen aus *Xenopus* Oozyten (n = 5).

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Ionenkanäle TRPV1, TRPV3 und TRPV4 unter Verwendung spezifischer und unspezifischer Aktivatoren elektrophysiologisch charakterisiert. Es wird die Aktivierung der Ionenkanäle TRPV3 und TRPV4 durch einen Anstieg der intrazellulären Protonenkonzentration beschrieben. Hierbei zeigt der TRPV3 Kanal eine individuelle Response auf die intrazelluläre Exposition unterschiedlicher pH-Werte. Zusätzlich wurden Messungen am TRPV1 Kanal mit unterschiedlichen physiologischen Lösungen durchgeführt. Im Rahmen dieser Experimente zeigte sich eine Herabsetzung der TRPV1 Capsaicinresponse in Anwesenheit von intrazellulärem Mg^{2+} . In der Literatur wird mehrfach über die Modulation der TRPV Kanäle durch Fettsäurederivate berichtet (Senning et al., 2014; Yu et al., 2014; Ufret-Vincenty et al., 2011; Klein et al., 2008; Rohacs et al., 2008). Anhand der durchgeführten Versuche ist es gelungen die physiologische Relevanz der phosphorylierten Fettsäurederivate als Modulator der TRPV1 Kanalaktivität weiter zu untermauern und eine Aktivierung der TRPV3 und TRPV4 Kanäle durch Anheben der intrazellulären Protonenkonzentration nachzuweisen.

5.1 Die TRPV Kanäle als Protonensensor

Vom TRPV1 Kanal ist bereits bekannt, dass er als extrazellulärer Protonensensor fungiert. Dieses wird in der Literatur häufig beschrieben und ist etabliert (Aneiros et al., 2011). Über den TRPV3 Kanal gibt es bisher eine Veröffentlichung, welche zeigt, dass dieser Kanal auch durch eine Veränderung seiner intrazellulären Protonenkonzentration in seiner Aktivität gesteuert wird (Cao et al., 2012). Für den Ionenkanal TRPV2 sind bislang keine Publikationen bekannt, die über eine intrazelluläre Regulation dieses Kanals durch Protonen berichten. In chinesischen Hamster-Eierstockzellen konnte für den TRPV4 Kanal eine leichte Aktivierbarkeit im niedrigen pH-Wertbereich festgestellt werden.

Durch die Untersuchung der intrazellulären pH-Wert abhängigen Regulation der Ionenkanäle TRPV3 und TRPV4 in dieser Arbeit wurden die Funktionalität und die Schaltmechanismen dieser Kanäle auf intrazellulärer Ebene genauer erforscht.

Speziell für die TRPV Kanalfamilie, deren bisher bekannten Hauptfunktionen Nozizeption, Thermosensation und Osmosensation darstellen, ist es von besonderer Bedeutung, ihre pH-Empfindlichkeit näher zu beschreiben.

Die in dieser Arbeit gezeigten Experimente veranschaulichen, dass der Grad der Aktivierbarkeit des TRPV3 Kanals stark von der intrazellulären Protonenkonzentration abhängt. Hingegen ist der TRPV4 Kanal nur wenig protonensensitiv.

Mittels der vorgestellten Messungen ist es sogar möglich den EC_{50} , den Hill-Koeffizienten und die Protonenkonzentration für die maximale Aktivierung des TRPV3 Kanals zu ermitteln.

Der hierbei ermittelte EC_{50} für den TRPV3 Kanal beträgt $6,3 \pm 0,1$, der Hill-Koeffizient beträgt $7,3 \pm 3,4$ und die maximale Aktivierung des TRPV3 Kanals durch Protonen ist bei pH 5,5 erreicht. Der TRPV4 Kanal zeigt lediglich bei pH 4 eine leichte Aktivierung.

Aus diesen Daten wird deutlich, dass die intrazelluläre Protonenkonzentration eine physiologisch relevante Rolle bei der Regulation des TRPV3 Ionenkanals spielt, während die zur Aktivierung notwendige intrazelluläre Protonenkonzentration für den TRPV4 Kanal außerhalb physiologischer Werte liegt.

5.2 Molekulare Determinanten der TRPV1 Kanalmodulation

Die Literatur und weitere Untersuchungen des Ionenkanals TRPV1 zeigen, dass auch die Capsaicin abhängige Aktivierung dieses Kanals weiteren Schalt- und Modulationsmechanismen auf molekularer Ebene unterliegt.

Daher ergibt sich natürlich die Frage, welche intrazellulären Schaltmechanismen auf molekularer Ebene diese Capsaicinsensitivität modulieren, oder sogar deaktivieren können. Die hierbei gefundenen Resultate könnten Ansätze zur Erklärung der Interaktion der TRPV Kanäle mit ihrer Umgebung liefern.

Ein Modulator der TRPV1 Aktivität, welcher in jüngster Zeit häufig untersucht wurde, ist das PtdIns(4,5)P₂. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ist ein Phospholipid welches natürlicherweise in zahlreichen Zelltypen vorkommt und in der Zellmembran verankert ist. In welchen Konzentrationen es in den unterschiedlichen Zelltypen vorkommt und in welche Wechselwirkungen es dort mit der Zellmembran tritt ist weitgehend unklar.

Wie die bisherige Literatur verdeutlicht ist PtdIns(4,5)P₂ essentiell für die Aktivierbarkeit des TRPV1 Kanals durch Capsaicin. Wie schon beschrieben führt eine Wechselwirkung von PtdIns(4,5)P₂, welches sich in der Membran TRPV1 exprimierender Zellen befindet, mit exogen zugegebenem Polylysin zu einer Inaktivierbarkeit der TRPV1 Kanäle (Klein et al., 2008).

Somit scheint PtdIns(4,5)P₂ eng mit der Funktionalität der TRPV Kanäle verknüpft zu sein und stellt einen etablierten physiologischen Modulationsmechanismus dar.

Die Literatur zeigt, dass PtdIns(4,5)P₂ ein sehr potenter Modulator der TRPV1 Sensitivität ist. Nach Polylysinapplikation zeigt der TRPV1 Kanal nur noch wenig bis keine Response auf Capsaicin. In diesem Zusammenhang wird vermutet, dass Polylysin das PtdIns(4,5)P₂ bindet. Durch diese Bindung an Polylysin steht das PtdIns(4,5)P₂ nicht mehr der Interaktion mit dem TRPV1 Kanal zur Verfügung. Der Entzug des Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphats führt wiederum zu einer Konformationsänderung des TRPV1 Kanals und somit zur Inaktivierung (Ufret-Vincenty et al., 2011).

Um mögliche unvorhersehbare Interaktionen von exogen zugeführtem Polylysin oder PtdIns(4,5)P₂ mit dem TRPV1 Kanal ausschließen zu können, wäre es am elegantesten einen endogenen Anabolismus, beziehungsweise Katabolismus für das PtdIns(4,5)P₂ zu finden. Hierzu bietet die Literatur einen Lösungsweg. So wird beschrieben, dass mit Hilfe von in Membranpatches befindlichen Kinasen, unter Mg-ATP Gabe, eine PtdIns(4,5)P₂ Neogenese möglich ist (Lee et al., 2005). Dieses setzt natürlich voraus, dass sich genügend Kinasen im exidierten Patch befinden. Diese Kinasen nutzen das Mg-ATP um Phospholipide zu generieren. Daher wird davon ausgegangen, dass mittels Mg-ATP eine Phospholipidneogenese stattfindet, welche unter anderem PtdIns(4,5)P₂ zu

Verfügung stellt. Dieses PtdIns(4,5)P₂ kann sich dann wiederum an der TRPV1 Kanalmodulation, durch Induktion einer Konfirmationsänderung, beteiligen.

Ein katabolischer Weg für das PtdIns(4,5)P₂ wird ebenso in der Literatur beschrieben. So wird berichtet, dass auch Phospholipasen mit der Zellmembran assoziiert sein können. Es wird vermutet, dass diese Phospholipasen Magnesium als Cofaktor benötigen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Applikation von Mg²⁺ in höherer Konzentration bei TRPV5 Kanälen einen starken Rundown induziert. Die Theorie, welche diesen Rundown begründet, beschreibt, dass sich in den exidierten Membranpatches Phospholipasen befinden, welche unter Magnesiumzufuhr PtdIns(4,5)P₂ abbauen.

Dieses PtdIns(4,5)P₂ steht anschließend nicht mehr der Interaktion mit dem Ionenkanal zur Verfügung. Somit hat der Abbau des PtdIns(4,5)P₂ wiederum Einfluss auf die Kanalaktivität durch induzierte Konfirmationsänderung (Lee et al., 2005).

Genau dieses endogene Zusammenspiel von PtdIns(4,5)P₂ Anabolismus und Katabolismus kann auch in den gezeigten Versuchen beobachtet werden. Mittels Applikation von 5 mM MgCl₂ konnte ein Rundown des TRPV1 Kanals induziert werden, welcher unter Mg-ATP Gabe wieder rückgängig gemacht werden konnte.

Dieses zeigt die Bedeutung des PtdIns(4,5)P₂ für die Modulation des TRPV1 Kanals in Bezug auf seine Capsaicinsensitivität. Durch den endogenen PtdIns(4,5)P₂ Anabolismus, beziehungsweise Katabolismus, wird die physiologische Relevanz des Regulationsmechanismus durch PtdIns(4,5)P₂ weiter untermauert.

In diesem Kontext wurde festgestellt, dass die TRPV1 spezifische Aktivierung mittels Capsaicin in ihrem Ausmaß und ihrer Aktivierungskinetik variierte. Somit zeigt sich, dass Phosphoinositide einen etablierten Faktor in der Modulation der TRPV Kanäle darstellen, jedoch die beschriebenen Ergebnisse nicht pauschalisiert werden dürfen. Vielmehr gilt es zu untersuchen, in wie weit der Grad der Phosphorylierung der Fettsäurederivate über die Aktivierbarkeit und Aktivierungskinetik der TRPV Kanäle entscheidet. Höchstwahrscheinlich treten Interaktionen zwischen den TRPV Kanälen und den unterschiedlichen Fettsäurederivaten oder sogar deren Abbauprodukten gleichzeitig auf.

Somit scheint der Aktivator Capsaicin die direkte Ursache für die TRPV1 Aktivierung zu sein, während Phosphoinositide nur das Ausmaß seiner Wirkung modulieren. Der Grad der Phosphorylierung, als auch die Dotierung der Plasmamembran mit den unterschiedlichsten Fettsäurederivaten, ist hier jedoch höchstwahrscheinlich von zentraler Bedeutung. Es ist davon auszugehen, dass die Regulation der TRPV Kanäle multifaktoriell gesteuert wird und von zahlreichen Protein-Lipid-Interaktionen abhängt.

5.3 Stoffwechsellage der Zelle determiniert TRPV Kanalaktivität

Wie somit gezeigt wurde, stellen die phosphorylierten Fettsäurederivate einen Modulator der TRPV Kanalaktivierung durch Capsaicin dar. Basierend auf dieser grundsätzlichen Feststellung wird klar, dass die Untersuchungen zur Regulation der TRPV1 Kanäle durch Capsaicin sich, je nach Zelltyp und Stoffwechsellage der jeweiligen Zelle, als schwierig erweisen können. Es gibt keine zuverlässigen Daten über die Phosphoinositidkonzentration in Zellen, unabhängig ihrer Herkunft. Zumal ist davon auszugehen, dass je nach Stoffwechsellage und Energiehaushalt der Zelle starke Diskrepanzen in der Phosphoinositidkonzentration auftreten können. Zellen die eine hohe Stoffwechselaktivität und einen hohen Energiebedarf aufweisen, oder auch Zellen die an einer Unterversorgung leiden wie zum Beispiel unter ischämischen Bedingungen, besitzen möglicherweise daher eine niedrige Konzentration an Phosphoinositiden (Yoshida et al., 1986; Sun et al., 1996).

5.4 Klinischer Bezug und Therapieansätze unter physiologischen Aspekten

Die Versorgungslage der Zelle entscheidet somit mutmaßlich über die intrazelluläre Konzentration der phosphorylierten Fettsäurederivate. Ebenso wird beschrieben, dass das Vorkommen von phosphorylierten Fettsäurederivaten essentiell für eine TRPV1 Kanalaktivierung durch Capsaicin ist. Hiervon wird abgeleitet, dass besonders unter ischämischen Bedingungen, zum Beispiel durch Tumordinfiltration in umliegende Gefäße, es zu einer herabgesetzten TRPV Aktivität kommen kann. Möglicherweise wird dieser Effekt durch den hohen Energiebedarf von Tumorzellen verstärkt, auch wenn bisher noch kein direkter Zusammenhang zwischen Phosphoinositidkonzentration und dem Energiebedarf der Tumorzellen nachgewiesen wurde (Dörr et al., 2013).

Hieraus kann sich ein Circulus vitiosus ergeben, welcher protektiv zu Gunsten der Tumorzellen wirkt. Wie die aktuelle Literatur zeigt, ist besonders die Aktivierung von TRPV1 Kanälen für die Glioblastomtherapie ein wichtiger Schlüsselfaktor geworden. Es ist bekannt, dass exogen zugeführte neuronale Stammzellen sich um Glioblastome ansiedeln und Botenstoffe wie Vanilloide ausschütten können. Diese Vanilloide führen anschließend zu einer Aktivierung des TRPV1 Kanals und induzieren somit einen stressinduzierten Zelltod der Glioblastomzellen (Stock et al., 2010).

Aus den vorgestellten Forschungsergebnissen wird postuliert, dass bei starkem, in die Gefäße infiltrierendem, Tumorwachstum und zugleich erhöhtem Energiebedarf sich eine niedrige intrazelluläre Phosphoinositidkonzentration im betroffenen Gebiet einstellen kann. Demzufolge wird eine Aktivierung des TRPV1 Kanals durch Vanilloide immer unwahrscheinlicher.

Besonders von klinischer Bedeutung ist die ungewollte lokale Azidose, wie sie besonders in entzündetem Gewebe auftritt. Dieses führt bei den Betroffenen insbesondere zu starken Schmerzen und verhindert eine suffiziente Wirkung von Lokalanästhetika. Die Lokalazidose in entzündeten Geweben entsteht vornehmlich durch Umstellung der hier befindlichen Zellen auf anaerobe Glykolyse. Die anaerobe Glykolyse wird hierbei von am Entzündungsherd statischen Zellen, als auch von mobilen Immunzellen betrieben. Eine Entzündung geht mit einer Schwellung und Ödembildung einher. Somit entsteht in dem betroffenen Gebiet ein längerer Diffusionsweg für Sauerstoff. Infolge dessen können Zellen, welche sich im Entzündungsgebiet befinden, nicht mehr suffizient mit Sauerstoff versorgt werden. Dieses zwingt die betreffenden Zellen zur Umstellung auf eine anaerobe

Energiegewinnung mit der Folge, dass sich das umliegende Gewebe durch das entstehende Laktat ansäuert. Besonders Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN), welche an der Entzündungsreaktion beteiligt sind und aus den Gefäßen in das Entzündungsgewebe ausschwärmen, weisen einen hohen Energiebedarf auf. Im Gefäßsystem, in dem sich die PMNs unter Normalbedingungen aufhalten, ist eine regelmäßige Versorgung mit energietragenden Substraten gewährleistet. Sobald die PMNs aus den Gefäßen in das entzündete Gewebe auswandern, ist die exogene Aufnahme von energietragenden Substraten nur noch bedingt möglich. PMNs benötigen einen Großteil ihrer Energie für Phagozytose, Granulaabgabe und den damit verbundenen ständigen Umbau des Cytoskelettes. Besonders die Produktion Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS = Reactive Oxygen Species), wie Wasserstoffperoxid, Hypochloritionen, Hydroxyl-Radikale und Superoxid-Anionen, ist sehr Energieintensiv. Polymorphkernige neutrophile Granulozyten realisieren dieses über den Pentosephosphat-Zyklus. Startsubstrat ist hierbei das Glucose-6-Phosphat, welches vorwiegend aus dem Abbau endogenen Glycogens gewonnen wird. Bei der Produktion Reaktiver Sauerstoffspezies kann die anaerobe Glykolyse der PMNs auf das 10 bis 20 fache der Ruhewerte ansteigen. Das hierbei entstehende Laktat wird in die Umgebung abgegeben. Besonders zu Beginn der Entzündung kommt es durch Einwanderung von Zellen der Unspezifischen Abwehr, insbesondere den PMNs, zu einem oxydativen Burst im Entzündungsgewebe. Dieses in Kombination mit dem ohnehin schon verlängerten Diffusionsweg für Sauerstoff veranlasst die im Entzündungsherd befindlichen Zellen wiederum vermehrt anaerobe Glykolyse zu betreiben. Die hierbei entstehenden sauren Abbauprodukte werden ebenfalls in die Umgebung abgegeben (Egger, 2005).

Die Lokalanästhetikose ist letztendlich auch die Ursache, dass Lokalanästhetika im entzündeten Gewebe nur bedingt wirken. Durch einen Natriumkanalblock heben Lokalanästhetika die Empfindlichkeit und Erregbarkeit von schmerzleitenden Nervenfasern auf. Somit kann der Schmerzimpuls von den Nervenzellen nicht mehr weitergeleitet werden. Dieses führt zu einer reversiblen lokalen Hemmung der Schmerzempfindung.

Die meisten der Lokalanästhetika ähneln sich in ihrer chemischen Grundstruktur. Lokalanästhetika setzen sich aus einem lipophilen aromatischen Rest und einem hydrophilen Rest zusammen, welche über eine Zwischenkette verbunden sind. Der hydrophile Rest ist nahezu immer eine sekundäre oder tertiäre Aminogruppe. Durch Aufnahme eines positiv geladenen Wasserstoffions kann die Aminogruppe an ihrem Stickstoffatom protoniert werden. Folge ist ein positiv geladenes Ammoniumion. In dieser geladenen Form können die Lokalanästhetika am Natriumkanal wirken. Jedoch erfolgt die Wirkung der Lokalanästhetika am Ionenkanal durch intrazelluläre Bindung. Um in die Nervenzelle diffundieren zu können, muss das Lokalanästhetikum jedoch in der lipophilen und damit nicht protonierten Form vorliegen.

Die gängigsten Lokalanästhetika liegen zu gleichen Anteilen in lipophiler und hydrophiler Form vor, sobald sie in wässrige Lösung gebracht werden. Der pKa-Wert eines Lokalanästhetikums gibt Auskunft darüber zu welchen Anteilen es geladen oder ungeladen bei einem jeweiligen pH-Wert vorliegt. Generell kann formuliert werden, dass der Anteil an ungeladenen Molekülen bei pH 7,4 abnimmt, wenn Lokalanästhetika mit einem hohen pKa-Wert verwendet werden. Jedoch kann nur die ungeladene Form die Nervenzellmembran passieren. Somit ist die Anschlagzeit eines Lokalanästhetikums umso geringer, je niedriger der pKa-Wert ist.

Im entzündeten Gewebe, welches einen niedrigeren pH-Wert als 7,4 aufweist, liegen große Teile des Lokalanästhetikums in der protonierten Form vor. Somit ist die Wirkung von Lokalanästhetika im entzündeten Gewebe vermindert, da eine Diffusion durch die Nervenzellmembran und damit eine Bindung an die intrazelluläre Seite der Natriumkanäle nur noch bedingt möglich ist (Kretz und Teufel, 2006).

Anhand der in dieser Arbeit vorgestellten Forschungsergebnisse kann abgeleitet werden, dass die Lokalanästhetikose nicht nur die Wirksamkeit von Lokalanästhetika vermindert, sondern auch aktiv zur Schmerzentstehung durch Aktivierung der TRPV1 und wie gezeigt der TRPV3 Kanäle beiträgt. Somit verdeutlichen die Ergebnisse dieser Arbeit wie, speziell im entzündeten Gewebe, eine Aktivierung von TRPV3 Kanälen zu einer verstärkten Reizwahrnehmung führen kann.

Immunologische und molekularbiologische Verfahren ergeben ein immer deutlicheres Bild von der umfassenden Expression von TRPV Kanälen speziell auf neuronaler Ebene. Die alleinige Inhibition von TRPV1 Kanälen, mit zum Teil schweren Nebenwirkungen wie zum Beispiel Hyperämie, scheint nur einen kleinen Teil der Schmerzausschaltung zu umfassen.

Die Erforschung potenter TRPV3 Kanalblocker versprechen ebenso Erfolgsaussichten im Bereich der Reizabmilderung im entzündeten Gewebe.

Auf diesem Weg könnte speziell im entzündeten Gewebe für eine rasche Schmerzlinderung gesorgt werden, jedoch sind natürlich auch weitere Einsatzgebiete wie zum Beispiel die Migränetherapie denkbar.

Die Entdeckung der Protonenaktivierung der TRPV Kanäle und die Modulation der TRPV Kanäle durch phosphorylierte Fettsäurederivate gibt aus physiologischer Sicht Aufschluss über zahlreiche Regulationsmechanismen und bietet der klinischen und pharmakologischen Forschung neue Therapieansätze.

6. Literatur- und Quellenverzeichnis

Ahemaiti A. Effect of membrane composition on temperature activation of TRPV1. Master of Science Thesis, Department of Chemical and Biological Engineering, Chalmers University Of Technology, Göteborg, Sweden, 2010.

Aneiros E, Cao L, Papakosta M, Stevens EB, Phillips S, Grimm C. The biophysical and molecular basis of TRPV1 proton gating. *The EMBO Journal* (2011) 30, 994–1002.

Benham CD, Gunthorpe MJ, Davis JB. TRPV channels as temperature sensors. *Cell Calcium* 388 (2003) 1–9.

Bohlen CJ, Priel A, Zhou S, King D, Siemens J, Julius D. A bivalent tarantula toxin activates the capsaicin receptor, TRPV1, by targeting the outer pore domain. *Cell*. 2010 May 28;141(5):834-45.

Cao X, Yang F, Zheng J, Wang KW. Intracellular Proton-mediated Activation of TRPV3 Channels Accounts for the Exfoliation Effect of α -Hydroxyl Acids on Keratinocytes. 2012. *The Journal of Biological Chemistry*. *J. Biol. Chem.* 2012, 287:25905-25916. doi: 10.1074/jbc.M112.364869.

Chung MK, Lee H, Mizuno A, Suzuki M, Caterina MJ. 2-Aminoethoxydiphenyl Borate Activates and Sensitizes the Heat-Gated Ion Channel TRPV3. *The Journal of Neuroscience*, June 2, 2004 24(22):5177–5182 5177.

Chung S, Kim YH, Koh JY, Nam TS. Intracellular acidification evoked by moderate extracellular acidosis attenuates transient receptor potential V1 (TRPV1) channel activity in rat dorsal root ganglion neurons. 2011. *Experimental Physiology*, 96, 1270-1281. doi: 10.1113/expphysiol.2011.059444.

Clapham DE, Runnels LW, Strübing C. The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci.* 2001 Jun;2(6):387-96. Review.

Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426, 517 (2003). doi:10.1038/nature02196.

Clapham DE, Julius D, Montell C, Schultz G. International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Transient Receptor Potential Channels. *Pharmacological Reviews* December 2005 vol. 57 no. 4 427-450.

Cortright DN, Szallasi A. Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1. *Eur. J. Biochem.* 271, 1814–1819 (2004) FEBS 2004.

Cuajungco MP, Grimm C, Oshima K, D'hoedt D, Nilius B, Mensenkamp AR, Bindels RJM, Plomann M, Heller S. PACSINs Bind to the TRPV4 Cation Channel: PACSIN 3 Modulates the subcellular localization of TRPV4. *J. Biol. Chem.* 2006, 281:18753-18762. doi: 10.1074/jbc.M602452200 originally published online April 20, 2006.

Dhaka A, Uzzell V, Dubin A, Mathur J, Petrus M, Bandell M, Patapoutian A. TRPV1 senses both acidic and basic pH. 2009. *The Journal of Neuroscience* 2009 January 7; 29(1): 153–158. doi:10.1523/JNEUROSCI.4901-08.2009.

Di Marzo V, De Petrocellis L. Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand? *Phil. Trans. R. Soc. B* 2012 367, doi: 10.1098/rstb.2011.0382, published 29 October 2012.

Dörr JR, Yu Y, Milanovic M, Beuster G, Zasada C, Däbritz JH, Lisec J, Lenze D, Gerhardt A, Schleicher K, Kratzat S, Purfürst B, Walenta S, Mueller-Klieser W, Gräler M, Hummel M, Keller U, Buck AK, Dörken B, Willmitzer L, Reimann M, Kempa S, Lee S, Schmitt CA. Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature*. 2013 Aug 14. doi: 10.1038/nature12437.

Earley S, Gonzales AL, Garcia ZI. A dietary agonist of transient receptor potential cation channel V3 elicits endothelium-dependent vasodilation. *Mol Pharmacol*. 2010 Apr;77(4):612-20. doi: 10.1124/mol.109.060715. Epub 2010 Jan 19.

Egger G. Die Akute Entzündung: Grundlagen, Pathophysiologie und Klinische Erscheinungsbilder der Unspezifischen Immunität. Seite 192, Springer Vienna, 2005.

Erler I, Hirnet D, Wissenbach U, Flockerzi V, Niemeyer BA. Ca²⁺-selective transient receptor potential V channel architecture and function require a specific ankyrin repeat. *Journal of Biological Chemistry* 279, 34456-34433 (2004).

Flockerzi V, Nilius B. Transient Receptor Potential Channels. Seite 197. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2007.

Gees M, Alpizar YA, Boonen B, Sanchez A, Everaerts W, Segal A, Xue F, Janssens A, Owsianik G, Nilius B, Voets T, Talavera K. Mechanisms of transient receptor potential vanilloid 1 activation and sensitization by allyl isothiocyanate. *Mol Pharmacol*. 2013 Sep;84(3):325-34. doi: 10.1124/mol.113.085548. Epub 2013 Jun 11.

Goswami C, Kuhn J, Heppenstall PA, Hucho T. Importance of Non-Selective Cation Channel TRPV4 Interaction with Cytoskeleton and Their Reciprocal Regulations in Cultured Cells. *PLOS ONE* Published: July 19, 2010 DOI: 10.1371/journal.pone.0011654.

Hellwig N, Albrecht N, Harteneck C, Schultz G, Schaefer M. Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits. *J Cell Sci* 118, 917 (2005).

Hilgemann DW, Feng S, Nasuhoglu C. 2001. The complex and intriguing lives of PIP₂ with ion channels and transporters. *Sci STKE*, 2001 (111):Re19.

Högestätt ED, Jönsson BAG, Ermund A, Andersson DA, Björk H, Alexander JP, Cravatt BF, Basbaum AI, Zygmunt PM. Conversion of Acetaminophen to the Bioactive N-Acylphenolamine AM404 via Fatty Acid Amide Hydrolase-dependent Arachidonic Acid Conjugation in the Nervous System. September 9, 2005 *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 31405-31412.

Hoenderop JG, Voets T, Hoefs S, Weidema F, Prenen J, Nilius B, Bindels RJ. Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6. *EMBO J*. 22, 776-785 (2003).

Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T. Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *PNAS*, Vol. 99, No. 11, 7461 (2002). doi: 10.1073/pnas.102596199.

Hu HZ, Gu Q, Wang C, Colton CK, Tang J, Kinoshita-Kawada M, Lee LY, Wood JD, Zhu MX. 2-Aminoethoxydiphenyl Borate Is a Common Activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3. *J. Biol. Chem.* 2004, 279:35741-35748. doi: 10.1074/jbc.M404164200 originally published online June 11, 2004.

Huang SM, Chung MK. Targeting TRPV3 for the Development of Novel Analgesics. *The Open Pain Journal*, 2013, 6, (Suppl 1: M12) 119-126.

Islam S (Md.). Transient Receptor Potential Channels. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Seiten 56-57. Springer Science and Business Media B.V. 2011.

Jin M, James J, O'Neil RG. Regulation of Plasma Membrane Expression of TRPV4 Channel by GSK1016790A and Hypotonic Stress in HeLa and M-1 Cells. *FASEB J.* April 2010 24 (Meeting Abstract Supplement) 610.7.

Jordt SE, Tominaga M, Julius D. Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. 2000. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 8134–8139.

Kim S, Kang C, Shin CY, Hwang SW, Yang YD, Shim WS, Park MY, Kim E, Kim M, Kim BM, Cho H, Shin Y, Oh U. TRPV1 Recapitulates Native Capsaicin Receptor in Sensory Neurons in Association with Fas-Associated Factor 1. *The Journal of Neuroscience*, March 1, 2006 26(9):2403–2412 2403.

Klein RM, Ufret-Vincenty CA, Hua L, Gordon SE. Determinants of molecular specificity in phosphoinositide regulation: PI(4,5)P₂ is the endogenous lipid regulating TRPV1. *J. Biol. Chem.* published online June 23, 2008.

Kretz FJ, Teufel F. *Anästhesie und Intensivmedizin*. Seite 40, Springer Vienna, 2006.

Lee BH, Zheng J. Proton Activation of TRPV1 Channels. 2014. *Physiology & Membrane Biology*, UC Davis, Davis, CA, USA.

Lee J, Cha SK, Sun TJ, Huang CL. PIP₂ activates TRPV5 and releases its inhibition by intracellular Mg²⁺. 2005. *J. Gen. Physiol.* Volume 126 Number 5 November 2005 439–451.
<http://www.jgp.org/cgi/doi/10.1085/jgp.200509314>.

Leffler A, Linte RM, Nau C, Reeh P, Babes A. A high-threshold heat-activated channel in cultured rat dorsal root ganglion neurons resembles TRPV2 and is blocked by gadolinium. *Eur J Neurosci.* 2007 Jul;26(1):12-22. Epub 2007 Jun 26.

Lockwich TP, Liu X, Singh BB, Jadowiec J, Weiland S, Ambudkar IS. Assembly of Trp1 in a signaling complex associated with caveolin-scaffolding lipid raft domains. *Journal of Biological Chemistry* 275 (16), 11934-11942 (2000).

Lockwich TP, Singh BB, Liu X, Ambudkar IS. Stabilization of cortical actin induces internalization of transient receptor potential 3 (Trp3)-associated caveolar Ca²⁺ signaling complex and loss of Ca²⁺ influx without disruption of Trp3-inositol trisphosphate receptor association. *Journal of Biological Chemistry* 276 (45), 42401-42408 (2001).

Loukin SH, Su Z, Kung C. Hypotonic shocks activate rat TRPV4 in yeast in the absence of polyunsaturated fatty acids. *FEBS Lett.* 2009 Feb 18;583(4):754-8. doi: 10.1016/j.febslet.2009.01.027. Epub 2009 Jan 25.

Lukacs V, Rives JM, Sun X, Zakharian E, Rohacs T. Promiscuous Activation of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Channels by Negatively Charged Intracellular Lipids: the Key Role of Endogenous Phosphoinositides in Maintaining Channel Activity. *The Journal of Biological Chemistry*, October 24, 2013, doi: 10.1074/jbc.M113.520288.

Matta JA, Ahern GP. Voltage is a partial activator of rat thermosensitive TRP channels. December 1, 2007 *The Journal of Physiology*, 585, 469-482.

Mergler S, Garreis F, Sahlmüller M, Reinach PS, Paulsen F, Pleyer U. Thermosensitive transient receptor potential channels in human corneal epithelial cells. *J Cell Physiol*. 2011 Jul;226(7):1828-42. doi: 10.1002/jcp.22514.

Messeguer A, Planells-Cases R, Ferrer-Montiel A. Physiology and Pharmacology of the Vanilloid Receptor. *Current Neuropharmacology*, 2006, 4, 1-15.

Michaelis P, Bennett V. The Membrane-binding Domain of Ankyrin Contains Four Independently Folded Subdomains, Each Comprised of Six Ankyrin Repeats. *The Journal Of Biological Chemistry*, Vol. 268, No. 30, 22703 (1993).

Minke B, Wu C, Pak WL. Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant. *Nature*. 1975; 258:84-87.

Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V. The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell*. 2002;108:595-598.

Moussaieff A, Rimmerman N, Bregman T, Straiker A, Felder CC, Shoham S, Kashman Y, Huang SM, Lee H, Shohami E, Mackie K, Caterina MJ, Walker JM, Fride E, Mechoulam R. Incensole acetate, an incense component, elicits psychoactivity by activating TRPV3 channels in the brain. *FASEB J*. Aug 2008; 22(8): 3024–3034.

Nedungadi TP, Dutta M, Bathina CS, Caterina MJ, Cunningham JT. Expression and Distribution of TRPV2 in Rat Brain. *Exp Neurol*. 2012 September ; 237(1): 223–237. doi:10.1016/j.expneurol.2012.06.017.

Neelima KJ, Maharaj N, Thomas A. The TRPV3 Receptor as a Pain Target: A Therapeutic Promise or Just Some More New Biology? *The Open Drug Discovery Journal*, 2010, 2, 89-97.

Neeper MP, Liu Y, Hutchinson TL, Wang Y, Flores CM, Qin N. Activation Properties of Heterologously Expressed Mammalian TRPV2: Evidence For Species Dependence. *J. Biol. Chem*. 2007, 282:15894-15902.

O’Conora CJ, Leddy HA, Benefielda HC, Liedtke WB, Guilak F. TRPV4-mediated mechanotransduction regulates the metabolic response of chondrocytes to dynamic loading. *PNAS*, 2014. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1319569111.

Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B. TRP channels: an overview. *Cell Calcium*. 2005;38:233–252.

Phan MN, Leddy HA, Votta BJ, Kumar S, Levy DS, Lipshutz DB, Lee S, Liedtke WB, Guilak F. Functional Characterization of TRPV4 as an Osmotically Sensitive Ion Channel in Articular Chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2009 October ; 60(10): 3028–3037. doi:10.1002/art.24799.

Qin N, Neeper MP, Liu Y, Hutchinson TL, Lubin ML, Flores CM. TRPV2 is Activated by Cannabidiol and Mediates CGRP Release in Cultured Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. *The Journal of Neuroscience*, June 11, 2008 28(24):6231– 6238 6231.

Raisinghani M, Pabbidi RM, Premkumar LS. Activation of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) by resiniferatoxin. *J Physiol*. Sep 15, 2005; 567(Pt 3): 771–786. Published online Jul 21, 2005.

Rapedius M, Baukowitz T. Elektrophysiologische Untersuchungen zur Regulation rekombinanter Kaliumkanäle durch Metabolite des Fettsäure- und Phosphoinositidstoffwechsels. Deutschland, Jena, 2005.

Rohacs T, Thyagarajan B, Lukacs V. Phospholipase C mediated modulation of TRPV1 channels. 2008. *Mol Neurobiol*. 2008 ; 37(2-3): 153–163. doi:10.1007/s12035-008-8027-y.

Ross RA. Endocannabinoids and vanilloid TRPV1 receptors. Birkhäuser Verlag, Seiten 71-93, 2005.

Senning EN, Collins MD, Stratiievskia A, Ufret-Vincenty CA, Gordon SE. Regulation of TRPV1 Ion Channel by Phosphoinositide (4,5)-Bisphosphate. The Role Of Membrane Asymmetry. *The Journal of Biological Chemistry*, 2014. doi: 10.1074/jbc.M114.553180.

Sophon Bioscience A/S, Baltorpvej 154, DK-2750 Ballerup. Application Report: HEK293-TRPV1 QPatch., Danmark, 2007.

Strubing C, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE. Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain. *J. Biol. Chem*. 278, 39014-39019 (2003).

Stock K, Kumar J, Synowitz M, Petrosino S, Imperatore R, Smith ESJ, Wend P, Purfürst B, Nuber UA, Gurok U, Matyash V, Wälzlein JH, Chirasani SR, Dittmar G, Cravatt BF, Momma S, Lewin GR, Ligresti A, De Petrocellis L, Cristino L, Di Marzo V, Kettenmann H, Glass R. Neural precursor cells induce cell death of high-grade astrocytomas through stimulation of TRPV1. *Nature Medicine*, Volume 18, Number 8. Published online 22 July 2012; doi:10.1038/nm.2827.

Stokes AJ, Wakano C, Del Carmen KA, Koblan-Huberson M, Turner H. Formation of a Physiological Complex Between TRPV2 and RGA Protein Promotes Cell Surface Expression of TRPV2. *Journal of Cellular Biochemistry* 94:669–683 (2005).

Sun GY, Hsu CY. Poly-phosphoinositide-mediated messengers in focal cerebral ischemia and reperfusion. *J Lipid Mediat Cell Signal*. 1996 Sep;14(1-3):137-45.

Suzuki M, Mizuno A, Kodaira K, Imai M. Impaired pressure sensation with mice lacking TRPV4. *J. Biol. Chem*. published online April 13, 2003.

Tocris Bioscience. RN 1734: URL:
<http://www.tocris.com/dispprod.php?ItemId=243006#.U0un3k2KC71>. Abfragedatum: 14.04.2014.

Tocris Bioscience. HC 067047: URL:
<http://www.tocris.com/dispprod.php?ItemId=280334#.U0uqA02KC70>. Abfragedatum: 14.04.2014.

Ufret-Vincenty CA, Klein RM, Hua L, Angueyra J, Gordon SE. Localization of the PIP₂ sensor of TRPV1 ion channels. *J. Biol. Chem*. published online January 11, 2011. doi: 10.1074/jbc.M110.192526.

- Vriens J, Owsianik G, Voets T, Droogmans G, Nilius B. Invertebrate TRP proteins as functional models for mammalian channels. *Pflügers Archiv: European journal of physiology*, 449 (3), 213-26 (2004).
- Vriens J, Appendino G, Nilius B. Pharmacology of Vanilloid Transient Receptor Potential Cation Channels. *Molecular Pharmacology* June 2009, Vol. 75 No. 6, 1262-1279.
- Vogt-Eisele AK, Weber K, Sherkheli MA, Vielhaber G, Panten J, Gisselmann G, Hatt H. Monoterpenoid agonists of TRPV3. *British Journal of Pharmacology* (2007) 151, 530–540.
- VYKLIČKÝ L, NOVÁKOVÁ-TOUŠOVÁ K, BENEDIKT J, SAMAD A, TOUŠKA F, VLACHOVÁ V. Calcium-Dependent Desensitization of Vanilloid Receptor TRPV1: A Mechanism Possibly Involved in Analgesia Induced by Topical Application of Capsaicin. 2008. *Physiol. Res.* 57 (Suppl. 3): S59-S68, 2008.
- Watanabe H, Vriens J, Suh SH, Benham CD, Droogmans G, Nilius B. Heat-evoked Activation of TRPV4 Channels in a HEK293 Cell Expression System and in Native Mouse Aorta Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* 2002, 277:47044-47051.
- Watanabe H, Vriens J, Prenen J, Droogmans G, Voets T, Nilius B. Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature*. 2003 Jul 24;424(6947):434-8.
- Wen H, Ostman J, Bubb KJ, Panayiotou C, Priestley JV, Baker MD, Ahluwalia A. 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) is a novel activator of TRPV1. *J. Biol. Chem.* published online March 2, 2012.
- Woo DH, Jung SJ, Zhu MH, Park CK, Kim YH, Oh SB, Lee CJ. Direct activation of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) by Diacylglycerol (DAG). *Molecular Pain* 2008, 4:42 doi:10.1186/1744-8069-4-42.
- Yoshida S, Ikeda M, Busto R, Santiso M, Martinez E, Ginsberg MD. Cerebral phosphoinositide, triacylglycerol, and energy metabolism in reversible ischemia: origin and fate of free fatty acids. *J Neurochem.* 1986 Sep;47(3):744-57.
- Yu Y, Carter CRJ, Youssef N, Dyck JRB, Light PE. Intracellular Long-Chain Acyl CoAs Activate TRPV1 Channels. 2014. *PLOS ONE* 9(5): e96597. doi:10.1371/journal.pone.0096597.
- Xu H, Blair NT, Clapham DE. Camphor Activates and Strongly Desensitizes the Transient Receptor Potential Vanilloid Subtype 1 Channel in a Vanilloid-Independent Mechanism. *The Journal of Neuroscience*, September 28, 2005 25(39):8924–8937.

7. Summary

In the present work, the ion channels TRPV1, TRPV3 and TRPV4 were characterized electrophysiologically. It is reported about the Stimulation of these ion channels by specific and nonspecific activators as well as about the activation of TRPV3 and TRPV4 by intracellular protons. In addition, measurements were made at the TRPV1 channel with different physiological solutions. Here, a reduction of the TRPV1 Capsaicinresponse in the presence of intracellular Mg^{2+} was found. In this context, the regulation of the intracellular phosphoinositide concentration by Mg^{2+} , which modulates the TRPV1 Capsaicinreply, is discussed. The ion channels have been studied electrophysiologically in the inside-out configuration using the patch-clamp technique. The expression took place in *Xenopus* oocytes.

TRPV (Transient receptor potential vanilloid) channels are a subfamily of TRP ion channels. The TRPV channels can be divided again into two subgroups, TRPV1-4 and TRPV5/6. The channels TRPV1-4 are non-selective cation channels that are activated by a variety of stimuli. These include heat, vanilloids, osmotic stress and low extracellular pH. TRPV channels are expressed by several types of cells (neurons, keratinocytes, lung, spleen and kidney cells) and regulate a number of physiological processes. These include the thermal sensation and also the regulation of body temperature, pain sensation, the sensation of sharpness, osmoregulation and pathological mechanisms of oncology.

The activation of the TRPV3 and TRPV4 channels by intracellular protons, which is described in this work, provides a further contribution to the electrophysiological characterization of these channels and delivers new approaches in the treatment of pain. In particular, the regulation of the TRPV channels TRPV3 and TRPV4 by protons is so far little researched and the subject of this work. It is shown that the activation of TRPV3 and TRPV4 channels is directly dependent on the intracellular proton concentration. This mechanism is particularly pronounced for the TRPV3 channel, while TRPV4 shows only slight proton sensitivity. A detailed study of the ion channel TRPV3 on different intracellular pH values revealed a specific dose-effect relationship for this channel. The recorded dose-response curves of the TRPV3 channel have been fitted with the Hill equation and the EC_{50} and the Hill coefficient were calculated. The TRPV3 channel shows an EC_{50} of 6.3 ± 0.1 , a Hill coefficient of 7.3 ± 3.4 and a maximum activation at pH 5.5. A further reduction of the pH, lower than pH 5.5, leads to a reduction in conductivity of the TRPV3 channel. The TRPV4 channel shows a light activation, in relation to the specific activator 4α -phorbol, at an intracellular pH of 4.

For measurements with physiological solutions, it was found that the intracellular Mg^{2+} application leads to a significant decrease in TRPV1 activity. The TRPV1 activity could be restored by intracellular Mg-ATP application. Recent publications show that especially the TRPV1 channel is subject to regulation by phosphorylated lipids. In this context, especially the phosphoinositides, such as phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, are mentioned. The phosphoinositides are a natural component of the cell membrane and are involved in various signal transduction cascades. For the phospholipids it is suspected that they interact with the cell membrane and the TRPV channels and thus a conformational change is induced which modulates the TRPV channel activity. Also the activation of the TRPV1 channel by capsaicin is subject to this modulation mechanism. Thus, activation of the TRPV1 channels is only possible when phosphorylated fatty acid derivatives are present in the plasma membrane in a sufficient amount.

On the basis of the research it is postulated that by the intracellular Mg^{2+} application, which is a cofactor for certain phospholipases, the cytosolic phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate concentration is reduced. Mg-ATP, which serves as a substrate of the phosphoinositide synthesis, increases the intracellular concentration of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate by PtdIns(4,5)P₂ neogenesis. The molecular mechanisms of these modulated channel activity by phosphorylated fatty acid derivatives probably base on structural changes of the TRPV channels which are induced by the lipid binding. The described regulatory mechanism implies a link of TRPV channels with the cellular fatty acid metabolism. The results of this study indicate that TRPV1 channels are subject to these evolutionarily conserved modulation mechanisms by phospholipids.

8. Anhang

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich in meiner Arbeit unterstützt und weitergebracht haben.

Ich danke den Mitarbeitern des Elektroniklabors Ingo Klein und Bernd Müller für ihre Unterstützung bei der Anfertigung elektrotechnischer Individuallösungen.

Ebenso danke ich den Mitarbeitern der Feinmechanische Werkstatt Martin Müller, Holger Voigt und Oliver Briedis für ihre Unterstützung bei der Anfertigung feinmechanischer Individuallösungen.

Ich danke Herrn Dr. Harald Wiese für die Unterstützung des Computerlabors.

Ich möchte mich auch herzlich bei den technischen Mitarbeiterinnen Ria Neumann und Michaela Unmack für die hervorragenden Oozytenpräparationen und die Herstellung meiner Messlösungen bedanken.

Weiterhin bedanke ich mich bei meinen Kollegen Marcus Schewe und Ehsan Nematian für ihre Unterstützung und das Bereitstellen von Messlösungen und Aktivatoren.

Ich bedanke mich bei unserer Institutsreferentin Frau Sabine Seeger für die Unterstützung bei Verwaltungsangelegenheiten.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Hariolf Fritzenschaft für die Herstellung der RNA, als auch für viele interessante Gespräche und Diskussionen im Labor.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Markus Rapedius und Herrn Dr. Sönke Cordeiro, welche mich besonders in meiner Anfangszeit unterstützt und beraten haben.

Besonders herzlicher Dank gilt meiner Kollegin Friederike Schulz und meinem Kollegen Jie Song, welche mich beim Erlernen der Patch-Clamp-Technik und der Zwei-Elektroden Voltage-Clamp Methode unterstützt haben. Außerdem möchte ich mich für die zahlreichen lustigen Stunden und Abende, welche wir in unserem Gemeinschaftslabor verbracht haben, bedanken.

Mein größter Dank gilt jedoch meinem Doktorvater, Betreuer und wissenschaftlichen Mentor Herrn Professor Dr. Thomas Baukrowitz für seine Unterstützung, die vielen interessanten wissenschaftlichen Gespräche und das Zustandekommen dieser Arbeit. Durch ihn wurde mein Bestreben wissenschaftlich zu Arbeiten noch bestärkt. Dieses Interesse wird sicher auch Bestandteil meines weiteren Lebens sein. Danke Thomas!

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie für die ständige Unterstützung im Hintergrund.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Erstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. T Baukrowitz, Dr. M. Rapedius, Dr. H. Fritzenschaft, Dr. S. Cordeiro, E. Nematian und M. Schewe,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Kiel, 18. Dezember 2014

Nils Hering