



UPPSALA  
UNIVERSITET

# TRP-kanaler

Therese Gustafsson

---

Independent Project in Biology  
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, höstterminen 2009  
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

# TRP-kanaler

Therese Gustafsson

Självständigt arbete i biologi 2009

## Sammanfattning

Den första TRP-kanalen upptäcktes 1989 i *Drosophila melanogaster* som uppträdde som blinda i starkt ljus på grund av en mutation i dess gen. Fler upptäcktes under de följande åren och 1997 gjordes den intressanta upptäckten att en variant, TRPV1, aktiveras av både stark värme och capsaicin, ett ämne i chilifrukt. TRP-kanaler har en lång evolutionär historia och analyser tyder på att TRPA är det äldsta proteinet i TRP-familjen, som består av sju olika undergrupper. Vertebrater har nästan dubbelt så många varianter som evertebrater på grund av duplikationer av både enskilda gener och hela genom. De olika undergrupperna skiljer sig åt strukturellt genom sina N- och C-terminaler. Flera av dem har s.k. ankyrinrepetitioner, andra har coiled coil och några har en för kanaler ovanlig kinasdomän. TRP-kanaler är katjonkanaler som framförallt transporterar  $Ca^{2+}$  och har visat sig kunna stimuleras på tre olika sätt; via aktivering av andra receptorer, av en mängd olika ligander samt direkt av tryck och temperatur. Ankyrinrepetitioner tros fungera som en fjäder vid aktivering med tryck, och det finns indikationer på att några TRP-kanaler är viktiga för hörseln. Eftersom TRP-kanaler kan aktiveras av så många olika stimuli tror man att de kan fungera som signalintegratorer och troligen fungerar de allosteriskt. Flera exempel på djur där TRP-kanaler har en viktig roll i djurens anpassning har hittats; t ex. saknar fåglar förmågan att känna capsaicinets starka smak, vilket gör att de kan äta frukterna utan obehag och därmed kan hjälpa till sprida växtens frön. Då detta forskningsområde är ungt finns ännu många oklarheter. I framtiden kommer TRP-kanalerna dock att lära oss mycket om både proteinfunktion och sinnesfysiologi.

## Inledning

Under de senaste femton åren har kunskapen om de så kallade TRP-kanalerna (transient receptor potential) ökat enormt. Sedan den första upptäcktes i slutet av 80-talet har en hel familj av dessa proteiner hittats. Allt som allt innehåller den för närvarande ca 30 medlemmar (i vertebrater) och de förekommer i allt från jäst till maskar och flugor, till fiskar och människor (Venkatachalam och Montell 2007). De har också bjudit på många överraskningar då de har visat sig delta i många vitt skilda processer i kroppen. Till exempel aktiveras vissa av dem av ett flertal olika kemiska substanser som förekommer i växter, det mest kända exemplet är TRPV1, som aktiveras av capsaicin, den substans i chilifrukt som ger dem dess starka och "heta" smak. Denna kanal aktiveras också av höga temperaturer, vilket förklarar hettan hos chilifrukterna (Caterina *et al.* 1997). Vidare har vissa av kanalerna visat sig reagera på mekaniskt tryck, något som är mycket viktigt i många olika sammanhang, alltifrån osmotisk reglering till känsel. Det finns indikationer på att TRP-kanaler är involverade i många andra processer, t ex. guidning av tillväxtkoner i nervceller. En intressant hypotes föreslår att TRP-kanaler fungerar som integratorer för många olika sensoriska stimuli (Tominaga *et al.* 1998 Clapham 2003).

Det verkar som att TRP-kanaler är en gammal proteinfamilj, som genom evolutionen har rekryterats till en mängd olika funktioner. Ingen annan proteinfamilj har en så stor variation i aktiveringsmekanismer. Dessa olika mekanismer har i många fall också visat sig modulera varandra (Tominaga *et al.* 1998, Macpherson *et al.* 2006, Latorre *et al.* 2007). Detta tyder i sin tur på att de till struktur och mekanism för jontransport fungerar i många olika sammanhang.

## TRP-kanalernas historia

Den första TRP-kanalen beskrevs år 1989 då man lyckades karakterisera ett protein i *Drosophila melanogaster*, som när det är defekt gör att flugorna i starkt ljus uppträder som om de vore blinda, dvs. de kunde inte reagera på snabba, upprepade ljusimpulser. I svagt ljus gick de dock inte att skilja från vildtyp. Vid upprepad stimulering med starkt ljus skiljde sig mutanterna genom att de behövde längre tid för återhämtning innan de kunde reagera på en ny ljusimpuls. Det visade sig att det var ett membranbundet transportprotein som har betydelse för transduktion av ljusimpulser (Montell och Rubin 1989). Under de två kommande decennierna har en lång rad varianter av TRP-proteiner upptäckts och karakteriserats inom så gott som alla viktigare djurgrupper och i ett flertal olika celltyper.

1995 rapporterades det första TRP-proteinet hos däggdjur tillhörande TRPC-gruppen (C för classical eller canonical). Dessa studier tydde på att kanalerna sköter  $\text{Ca}^{2+}$  transport och att den kontrolleras av olika agonister eller  $\text{Ca}^{2+}$ -joners lagerstatus (Wes *et al.* 1995). 1997 kom nästa överraskning då man lyckades klonat ett protein liknande TRP-proteinet som aktiverades av capsaicin och höga temperaturer. Detta indikerade att proteinet spelade en roll i förmedlandet av smärtimpulser orsakade av värme (Caterina *et al.* 1997). Det fick namnet TRPV, som sedan har hittats i flera varianter. Fler och fler varianter har sedan visat sig stimuleras av vissa specifika temperaturintervall och andra kemiska substanser, t ex. mentol (Peier *et al.* 2002). Under senare år har det kommit mer data kring dessa proteiners struktur, något som är mycket viktigt för att förstå deras funktion. Det återstår dock många frågor då membranproteiner är svåra att lösa strukturen för, på grund av att de inte är stabila i vattenlösning.

## TRP-kanalernas betydelse

TRP-kanaler har visat sig vara en central komponent i många fysiologiska system och mutationer i några av dem har visat sig ligga bakom vissa sjukdomar i t ex. njurarna och kronisk brist på  $\text{Ca}^{2+}$  och  $\text{Mg}^{2+}$  (Mochizuki *et al.* 1996, Schlingmann *et al.* 2002). Därför är det viktigt att ta reda på hur de fungerar för att kunna behandla dessa sjukdomar. Men den kanske viktigaste anledningen till att lära sig mer om dem är att vi då kommer att öka våra kunskaper om ett flertal aspekter av vår egen och andra djurs fysiologi. Detta gäller inte minst sinnesfysiologi, då TRP-kanaler visat sig spela viktiga roller för samtliga sinnesorgan. En mycket intressant upptäckt är att TRP-kanaler har visat sig vara involverade i hörsel hos *D. melanogaster* och mus och det spekuleras om att detsamma skulle kunna gälla för oss människor också (Ramsey *et al.* 2006). I så fall skulle gåtan kring de cellulära mekanismerna för mottagande och transduktion av ljudimpulser börja lösas. Ur dessa kunskaper kan oändligt många lösningar på olika problem uppstå.

Denna artikel kommer att behandla TRP-kanaler ur fyra olika perspektiv: struktur, funktion, fysiologi samt evolution. Fokus kommer att ligga på deras funktion och fysiologi, framförallt sinnesfysiologi, dels då det är inom dessa områden där det finns mest kunskap, dels för att det är dessa områden som jag tycker är mest intressanta.

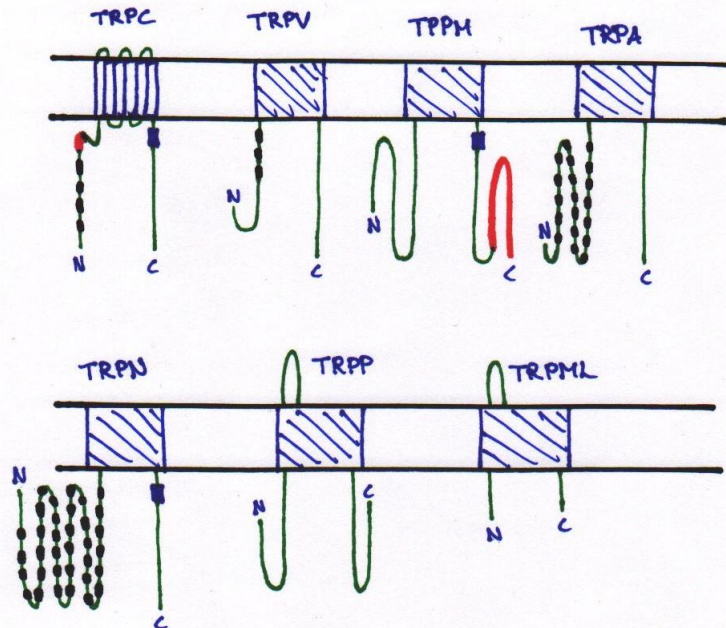
## TRP-familjen och deras evolution

Det fascinerande med TRP-kanaler är att de spelar så många olika roller i organismen, allt ifrån att reagera på olika sensoriska stimuli som tryck och ljudvågor, osmotiskt tryck, pH, värme och kyla samt en mängd olika kemiska substanser. Hur kommer det sig att denna proteinfamilj har kunnat rekryteras till så många olika användningsområden, och hur har det gått till? Dessa frågor är mycket svåra att svara på och än så länge finns det inte så mycket

kunskap på detta område, men i detta avsnitt ges ändå en kort beskrivning av vad som hittills är känt om de olika kanalerna och hur de har utvecklats.

### TRP-familjen

Nedan följer en kort genomgång av de olika undergrupperna; deras karakteristiska egenskaper, funktioner och var de uttrycks samt i vilka djur man kan hitta dem, alternativt att de saknas. Se figur 1 för en bild av de olika varianterna. I senare avsnitt kommer mer detaljerade beskrivningar om funktion etc.



Figur 1. Förenklad bild av de olika kanalernas utseende. För TRPC syns hur de sex membranhelixarna är trädde genom membranet, för övriga visas ej detta. Svarta delar är ankyriner, blå box är TRP-domän, liten och stor röd del är coiled coil respektive kinasdomän. Modifierad efter Venkatachalam och Montell 2007.

#### TRPC

TRPC1 var den första TRP-varianten som hittades i däggdjur. Denna grupp, som har sju medlemmar, är den som är mest lik *Drosophila* TRP. Det råder ännu förvirring kring hur TRPC-kanaler fungerar; man har t ex. funnit indikationer på att TRPC1 kan aktiveras av minskning av  $Ca^{2+}$ , receptorer och DAG (diacylglycerol) eller till och med att den saknar funktion (Hofmann *et al.* 1999, Schaefer *et al.* 2000, Venkatachalam och Montell 2007). En studie fann bevis för att den kunde aktiveras av sträckningar i lipidmembranet (Maroto *et al.* 2005). Övriga kanaler aktiveras av någon av ovanstående mekanismer. TRPC-kanaler förekommer i flera fall som heteromerkomplex med andra medlemmar inom gruppen och får då delvis nya egenskaper (Plant och Schaefer 2005). Flera av TRPC-varianterna uttrycks på olika ställen i hjärnan (Strubing *et al.* 2001, 2003). Intressant att notera är att TRPC2, som uttrycks i vomeronasalorganet hos mus, är en pseudogen hos människa. Vomeronasalorganet används för att detektera feromoner, en förmåga som vi människor tycks ha förlorat (Liman *et al.* 1999, Vannier *et al.* 1999, Lucas *et al.* 2003).

#### TRPV

I denna grupp med sex medlemmar är TRPV1 kanske mest känd sedan det upptäcktes att den aktiveras både av capsaicin, och hög värme ( $>43\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (Caterina *et al.* 1997). TRPV1-4 aktiveras var för sig av olika temperaturintervall (2:  $>52\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 3:  $33\text{-}39\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 4:  $27\text{-}32\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), men

inte av capsaicin. Dock kan alla aktiveras alternativt moduleras av flera olika stimuli, och kan därmed fungera som signalintegratorer. TRPV5-6 är inte värmeaktiverade, men de är de mest  $\text{Ca}^{2+}$ -selektiva av TRP-kanalerna (Ramsey *et al.* 2006). Det finns även för denna grupp indikationer på att de kan aktiveras av tryck och har betydelse för bl. a. hörsel (Zheng *et al.* 2003).

#### *TRPM*

TRPM-gruppen består av åtta medlemmar, där TRPM2, 6 och 7 har en fungerande enzymdomän,  $\alpha$ -kinas, C-terminalt. Det är mycket ovanligt med kombinationen av enzym och jonkanal i ett och samma protein (Ramsey *et al.* 2006, Gaudet 2008). TRPM4 och 5 skiljer sig från andra TRP genom att de är selektiva för monovalenta kationer och endast har begränsad  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabilitet, däremot fungerar  $\text{Ca}^{2+}$  som en aktivator. TRPM5 är nödvändig för förmedling av smakerna sött, beskt och umami (Launay *et al.* 2002, Hofmann *et al.* 2003, Zhang *et al.* 2003). TRPM8 aktiveras av relativt låg temperatur (23-28 °C) och av ”kalla” substanser som mentol och eukalyptus. Det verkar dock som att olika domäner i proteinet är ansvariga för detektionen av temperatur respektive mentol m.fl. Mekanismen för aktivering av värme hos TRPV1 och kyla hos TRPM8 verkar dock likna varandra (Peier *et al.* 2002, Weil *et al.* 2005).

#### *TRPA*

Denna grupp består av endast en medlem hos däggdjur, medan evertebrater har fyra varianter. TRPA1, som finns hos både däggdjur och evertebrater, aktiveras av en mängd starka substanser, t ex. wasabi, vitlök och tårgas. Men mest känd blev den för att den också aktiveras av kyla (< 17 °C) och tryck. Dock är detta fortfarande kontroversiellt då man fått motstridiga resultat framförallt när det gäller köldaktivering (Jordt *et al.* 2004, Macpherson *et al.* 2005, Venkatachalam och Montell 2007). TRPA1 har 14 ankyrin-repetitioner N-terminalt som tros kunna fungera som en fjäder för transduktionen av mekaniskt tryck via cytoskelettet, och det spekuleras om att TRPA1 kan vara den kanal som har huvudansvaret för förmedlandet av ljudimpulser (Corey *et al.* 2004, Nagata *et al.* 2005, Sotomayor *et al.* 2005).

#### *TRPN*

TRPN är också den enda medlemmen i sin grupp. Den upptäcktes först i *D. melanogaster* där den uttrycks i hårceller och fick namnet NOMPC. Den finns även hos maskar och fiskar men saknas hos däggdjur. TRPN har i likhet med TRPA1 många ankyrinrepetitioner, hela 29 stycken, som tros fungera som en fjädermekanism (Walker *et al.* 2000, Venkatachalam och Montell 2007).

#### *TRPP*

Denna grupp kanske är den mest primitiva av TRP-kanalerna, då homologer har hittats i jäst. De upptäcktes som mutationer ansvariga för polycystisk njursjukdom. TRPP2 bildar en  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabel, ickeselektiv jonkanal men behöver hjälp av TRPP1 för insättning i lipidmembranet. De har liksom TRPML-gruppen (se nedan) en lång extracellulär ögla mellan transmembranhelix 1 och 2. TRPP-kanaler verkar också ha förmåga att aktiveras av tryck och kan vara inblandade i osmotisk reglering och avläsning av vätskeflöden, då de uttrycks i primära cilier i många olika celltyper. Det finns 3 typer av TRPP hos vertebrater men bara en hos evertebrater (Venkatachalam och Montell 2007).

#### *TRPML*

Denna grupp upptäcktes också som mutationer som orsakar störningar i lysosomernas lagringsförmåga och leder till svår nervdegenerering. Däggdjur har 3 varianter medan

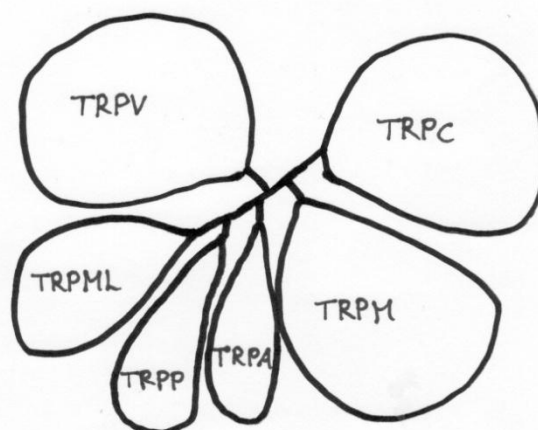
vertebrater bara har en. TRPML1 och 2 hittas i lysosommembranet medan TRPML3 finns i det endoplasmatiska retiklet (ER) och stereocilier (Venkatachalam och Montell 2007). TRPML3 verkar också spela en roll för hörsel; muterade möss är bl. a. döva (Di Palma *et al.* 2002).

I kommande avsnitt om funktion och fysiologi kommer jag att fokusera på följande varianter som får tjäna som exempel: TRPV1-4, TRPM5, 6 och 8, TRPA1, TRPN samt TRPC1-2. Dessa är några av de mer utforskade medlemmarna samt att just dessa har visat sig spela olika roller vid respons och transduktion av värme, tryck och olika intressanta ligander, framförallt från växtriket eller så har de olika unika egenskaper. TRPP och TRPML är mindre utforskade än de andra grupperna och dessa kommer därför utöver här endast nämnas i korta drag.

### TRP-gruppernas släkträd

Genom att jämföra sekvenserna för olika gener och se hur lika varandra de är kan man bestämma med ganska stor exakthet hur nära släkt de är med varandra och ungefär när de divergerade från varandra. Genom att undersöka i vilka djurgrupper som TRP-varianter har tillkommit eller försvunnit och relatera det till djurens livsmiljö och beteende samt proteiners funktion kan man också göra antaganden om olika varianters adaptiva betydelse. Därmed kan man visa på ett möjligt selektionstryck för att de har utvecklats. Eftersom dessa proteiner inte varit kända så länge har sekvenseringsstudier främst gjorts på modelldjur för de olika större djurgrupperna, t ex. sebrafisk, mus och bananfluga för att nämna några.

En fylogenieanalys (Venkatachalam och Montell 2007) föreslår att *TRPA* är den ursprungliga gen som de andra grupperna har utvecklats ifrån. Genduplikationer har sedan gett upphov till två stora grupper som delas in i *TRPP*- och *TRPML*-grupperna å ena sidan och *TRPC*, *TRPV*, *TRPN* och *TRPM* å den andra. Till den senare gruppen räknas också *TRPA* (Venkatachalam och Montell 2007). Se figur 2 nedan. Men det finns också tecken på att *TRPP*-typen är den äldsta då homologer till denna grupp har hittats i jäst (Palmer *et al.* 2001). En åttonde grupp har hittats hos jäst, *TRPY*, som är svagt besläktad med de övriga. Detta tyder på TRP-kanaler uppstod innan flercelliga organismer dök upp på jorden (Palmer *et al.* 2005).



Figur 2. Schematisk bild av TRP-kanalernas släkträd. Detta är ett orotat träd och det råder osäkerhet kring vilken typ som är den ursprungliga, men TRPA har föreslagits som den äldsta. Modifierad efter Clapham 2003.

### *TRP-kanaler hos insekter*

Insekter och däggdjur skiljer sig på så vis att insekter är mindre och saknar förmåga att hålla sin kroppstemperatur konstant. Insekter har å andra sidan förmåga att känna temperaturgradienter i luften, något som däggdjur saknar. Detta är intressant då TRP-kanaler har visat sig stimuleras av olika temperaturer. De skulle alltså kunna ha utvecklats olika hos insekter respektive däggdjur på grund av de olika behov som deras fysiologi ger dem. Insekter har ca hälften så många TRP-varianter som däggdjur (13-14 st). Detta beror på att däggdjur, men även maskar, har utvecklat fler varianter av TRPM och TRPV, inte på att de skulle ha gått förlorade hos insekter. Insekter har å andra sidan fler TRPA-varianter än däggdjur, som bara har en. Värt att notera är att TRPA1 stimuleras av värme hos insekter medan den stimuleras av kyla hos däggdjur (Matsuura *et al.* 2009).

### *TRP-kanaler hos vertebrater (främst däggdjur)*

Vertebrater har upp till ett 30-tal TRP-varianter. Studier tyder på att helgenom-duplikationer och duplikationer av de enskilda generna är orsak till att de har blivit så många. Dock finns det flera fall där vissa djurgrupper har förlorat en eller flera varianter. T ex. har fiskar förlorat TRPV1, 2 och 3 TRPM4 och 8 samt TRPA1. Att fiskar har en tendens att förlora temperaturaktiverade TRP-kanaler kan vara för att de helt enkelt inte behövs. De kanaler de fortfarande har täcker upp ganska väl för de temperaturvariationer som vatten uppvisar. En annan möjlighet skulle dock kunna vara att andra typer av kanaler har tagit över TRP-kanalernas roll. De återstår dock att upptäcka i så fall (Saito och Shingai 2006).

Fåglar och amfibier har förlorat TRPM4 respektive TRPM5. Då dessa två varianter har liknande egenskaper kan de troligen kompensera för varandra. Amfibier har vidare fyra kopior av TRPV4 medan andra ryggradsdjur bara har en. TRPV4 är förutom värmeaktiverad också en osmosensor. En hypotes är att eftersom amfibier har en livscykel som tvingar dem att vara anpassade till både liv i vatten och på land, kan flera varianter vara en fördel för att i alla lägen exakt kunna känna av det osmotiska trycket mot huden (Saito och Shingai 2006).

## **TRP-kanalernas struktur**

TRP-familjens olika grupper skiljer sig åt främst genom strukturen. Gemensamt för dem är att de har sex transmembransegment och att både N- och C-terminalerna befinner sig på cytosolsidan. Transmembrandomänen bildar tetramerkomplex, dvs. fyra TRP-proteiner bildar tillsammans en kanal där katjoner kan passera genom. TRP-kanalerna har en struktur liknande spänningsberoende  $K^+$ -kanaler, som också bildar tetramerkomplex. Denna typ av struktur är mycket vanlig och tycks vara grundläggande för många olika typer av kanaler. Det tyder på att denna strukturtyp är mycket gammal (Gaudet 2008).

Skillnaderna mellan de olika grupperna ligger främst i N- och C-terminalerna. Här finns flera olika domäner som troligen har betydelse för kanalernas aktivering och reglering, genom att dessa interagerar med andra proteiner och/eller andra typer av ligander (Gaudet 2008). Nedan ges en genomgång av dessa domäner och strukturelement samt i vilka av de olika undergrupperna av TRP-kanaler de förekommer.

### **Viktiga domäner hos TRP-kanaler**

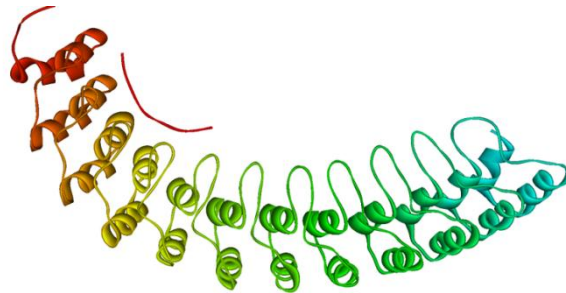
Ett protein kan delas upp i olika delar, domäner, som har stor betydelse för proteinets stabilitet och/eller aktivitet. Många domäner återfinns hos vitt skilda proteiner och således tycks de vara gamla strukturer som återanvänds gång på gång. De flesta domäner har fått sina namn efter det protein de först upptäcktes i eller den fenotyp som mutationer i proteinet gav upphov

till. Här kommer de, oftast, engelska namnen på domänerna användas då de också är vedertagna på svenska samt att det oftast inte finns något bra motsvarande ord på svenska.

#### *Ankyrin-repetitioner*

N-terminalen hos flera av TRP-grupperna (A, C, N, V) har så kallade ankyrin-repetitioner. De sitter på rad efter varandra och antalet varierar beroende på kanaltyp. Denna domän är mycket vanlig och kan delta i en rad olika funktioner; bl.a. jontransport, transkription, cellcykel-reglering och cell-cellsignalering (McCleverty *et al.* 2006, Gaudet 2008).

En ankyrin-repetition är 33 aminosyror långt och består av två antiparallella  $\alpha$ -helixar som följs av en ögla som i sin tur är länkad till en så kallad  $\beta$ -hårnål. Sedan fortsätter det med nästa helixpar osv. Helix-loop-helix-motiven lägger sig ovanpå varandra medan  $\beta$ -hårnålarna sticker ut vinkelrätt från dem. Varje ankyrin-repetition är något vridet motsols i förhållande till de föregående. Detta ger hela domänen ett utseende liknande en vänsterhand, där  $\beta$ -hårnålarna utgör fingrarna. De olika strukturerna i domänen bildar en nedsänkning, motsvarande handflatan, där olika ligander binder. Eftersom denna yta är ganska stor är det troligt att den fungerar som en bindningsyta för andra proteiner (McCleverty *et al.* 2006). Se figur 3.



Figur 3. En ankyrin-domän bestående av tolv repetitioner. [http://en.wikipedia.org/wiki/Ankyrin\\_repeat](http://en.wikipedia.org/wiki/Ankyrin_repeat)

#### *$\alpha$ -kinas-domän*

Hos några av TRPM-kanalerna finns en så kallad  $\alpha$ -kinas-domän i C-terminalen. Det är ovanligt att en jonkanal också har en kinasdomän. Dessa typer av proteiner kallas ofta chanzymer, (från channel och enzyme). Kinasdomänen bildar en dimer med en del av N-terminalen, ett fenomen som är ganska vanligt hos proteiner som bildar multimerer och kallas domain-swapping, eller domän-utbyte (Yamaguchi *et al.* 2001).

Till skillnad från klassiska proteinkinaser innehåller den C-terminala delen av proteinet en metalljon, förmodligen en zinkjon. Denna zinkjon är gömd inne i kinasstrukturen och har till uppgift att hålla ner en del av domänen som täcker dess hydrofoba kärna. Koordinationen av en zinkjon tycks vara mycket viktig för domänens stabilitet, då mutationer som omöjliggör bindande av den leder till att kinas-aktiviteten förloras helt och även att kanalens förmåga att transportera joner minskar (Yamaguchi *et al.* 2001).

#### *Transmembrandomänen*

Som nämnts ovan är transmembrandomänen den del som framförallt förenar de olika TRP-kanalerna. De liknar spänningsberoende  $K^+$ -kanaler i det att de har sex  $\alpha$ -helixar som så att säga är sydda genom lipidmembranet. De bildar dessutom tillsammans med andra membrandomäner tetramerkomplex, som utgör själva kanalen, och man har kunnat visa att transmembrandomänen är tillräcklig för att tetramerisering ska ske (Barrera *et al.* 2007).



Transmembrandomänen utgör en mindre del av proteinet, ca en fjärdedel, medan N- och C-terminalerna upptar en stor volym på cytosolsidan, ca två tredjedelar. Mellan helix fem och sex finns en så kallad por-ögla, som beskrivs längre fram, som tillsammans med tre andra öglor bildar själva jonkanalen. Det har visat sig att de andra fyra helixarna är riktade längre bort från por-öglan, vilket skiljer TRP-kanalerna från andra katjonkanaler (Mio *et al.* 2007).

I mitten och i den nedre delen av poren ökar storleken och bildar en ”grotta” som troligen utgör ”jonporten”. Denna grotta tycks vara ett stängt utrymme bortsett från några små hål i botten. Det har föreslagits att jonerna stannar upp eller späds ut här innan de släpps in i cellen. Denna uppbyggnad är också något som skiljer TRP-kanalerna från andra jonkanaler (Mio *et al.* 2007).

#### *Coiled coils*

TRPM- och TRPC-kanaler har ytterligare en domän i sina C-terminaler respektive N-terminaler som kallas coiled coils. Denna typ av domän är en av de mest studerade och deltar i protein-protein-interaktioner. En central del av denna domän är de så kallade heptad-repetitionerna, som består av sju aminosyror där nummer 1 och 4 är hydrofoba. Heptaderna upprepas n antal gånger i den helix-formade strukturen vilket gör att en hydrofob sträng bildas utmed varje helix. Denna hydrofoba yta är avgörande för helixarna ska kunna binda till varandra och bilda en coiled coil (Tsuruda *et al.* 2006, Venkatachalam och Montell 2007). Se figur 4.



Figur 4. Coiled coil där heptader gör att de två helixarna kan associera till varandra.  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Coiled\\_coil](http://en.wikipedia.org/wiki/Coiled_coil)

Studier har kunnat visa att denna coiled coil är viktig för att TRPM-proteinerna ska kunna interagera med varandra och bilda tetramerkomplex. En intressant aspekt är att deras coiled coils sitter just C-terminalt, till skillnad från andra spänningsberoende jon kanaler där de sitter N-terminalt. Eftersom N-terminalen är den ände som syntetiseras först blir det logiskt att coiled coils hjälper till att stabilisera bildandet av tetramerer allteftersom de syntetiseras och sätts in i membranet. Men eftersom dessa sitter C-terminalt hos TRPM-kanaler måste bildandet av tetramererna ske på ett helt annat sätt, då coiled coils kommer sist under translationsprocessen (Tsuruda *et al.* 2006).

För TRPM2, som har en specifik så kallad NUDIX-domän intill coiled coil, kan det finnas en möjlighet att coiled coil deltar i jontransporten också, då detta har kunnat visas för proteiner med liknande strukturelement i sina C-terminaler (Mei *et al.* 2006).

#### *TRP-domänen*

Denna hydrofoba domän återfinns hos TRPC-, TRPM- och TRPN-gruppen. Den sitter strax efter den sjätte transmembranhelixen och består bl.a. av två starkt konserverade boxar, där den andra innehåller flera proliner. I dessa boxar finns också basiska aminosyror som

tillsammans troligen är viktiga för att kanalen ska aktiveras av PIP<sub>2</sub> (fosfatidylinositol-4,5-bisfosfat) och andra ligander så som mentol och icilin (Phelps och Gaudet 2007, Venkatachalam och Montell 2007).

### *Por-öglan*

Mellan membranhelix fem och sex finns en extracellulär domän bestående av en helix och en ögla, som tillsammans med de båda helixarna bildar vad som tros vara jonporen och samtidigt fungerar som ett selektivitetsfilter. Detta baseras på att den har 40 % sekvenshomologi med en bakteriell K<sup>+</sup>-kanal där kristallstrukturen är känd och bland TRP-kanalerna är domänen en av de starkast konserverade. I denna por sitter en Asp som tycks vara viktig för selektiviteten då den avgör porens smalaste diameter. Det tycks alltså vara olika aminosyror sidokedjor som bestämmer selektiviteten hos TRP-kanaler. Detta skiljer dem från K<sup>+</sup>-kanalerna, där karbonylsyren från själva peptidkedjan bildar selektivitetsfiltret (Voets *et al.* 2004, Ramsey *et al.* 2006).

Eftersom pordiametern är mer än dubbelt så stor som diametern hos en Ca<sup>2+</sup>-jon samt att pordiametern varierar relativt mycket hos olika TRP-kanaler verkar det som om mekanismen för permeabilitet fungerar på ett annat sätt än genom tät koordinering av jonen. En annan möjlighet skulle dock kunna vara att poren är flexibel och kan dra ihop sig i närvaro av Ca<sup>2+</sup>. Då por-öglan är olika stor hos olika TRP-kanaler är det svårt att veta om den mekanism som beskrivs här gäller för andra TRP-kanaler också (Voets *et al.* 2004).

### **Problem med strukturbestämning av membranproteiner och rörliga domäner**

De två bästa metoderna för att bestämma tredimensionell proteinstruktur är NMR och röntgenkristallografi. Dessa båda metoder kräver att proteinet är stabilt och behåller sin nativa konformation i vattenlösning. Då membranproteiner är anpassade för vara som mest stabila i en hydrofob miljö, lipidmembranet, uppstår problem eftersom de flesta av dessa proteiner denaturerar i vattenlösning. Därmed blir det omöjligt eller åtminstone mycket svårt att bestämma deras struktur (Wütrich 1989, McPherson *et al.* 1995). Andra metoder som står till buds är bl.a. elektron-cryomikroskopi och svepspetsmikroskopi, AFM, men dessa metoder ger svag upplösning av proteinet jämfört med NMR och röntgenkristallografi (da Silva 2002, Orlova och Saibil 2004).

Lyckligtvis för strukturkemisterna är deras oftast långa N- och C-terminaler cytosoliska och har visat sig behålla sin nativa konformation även då de är separerade från transmembrandelen, så för dessa delar har strukturen lösts i flera fall. Här kan dock ett annat problem uppstå. Om en del av ett protein är mycket rörligt blir bilden av den suddig, eftersom den "fryser" i olika lägen vid kristallisering för röntgenkristallografi. Vid NMR ger rörliga proteindelar flera olika signaler beroende på att de vid olika tidpunkter befinner sig på olika platser i förhållande till andra delar av proteinet (Wütrich 1989, McPherson *et al.* 1995). Därför återstår ännu mycket arbete för att reda ut detaljerna kring hur TRP-kanalerna ser ut.

### **TRP-kanalernas funktion**

När det gäller TRP-kanalers funktion, dvs. hur de aktiveras och inhiberas samt regleras av andra substanser, har det visat sig vara en utmaning att reda ut begreppen. Enskilda TRP-kanaler har i de flesta fall visat sig stimuleras och/eller inhiberas av ett flertal olika stimuli, ofta via olika bindningsställen på en och samma moleky. Det finns också tydliga indikationer på att dessa olika stimuli, när de förekommer samtidigt, modulerar varandra positivt eller negativt. Sammantaget gör detta att olika studier ofta ger olika resultat och att det är svårt att konstruera experiment som tydligt kan stödja eller motsäga olika hypoteser. I detta avsnitt ges

en bild av TRP-kanalernas arbete på cellulär nivå, med fokus på främst deras interaktion med olika ligander, temperatur samt tryck, eftersom dessa är kopplade till sinnesfysiologi, som är fokus för nästa avsnitt.

TRP-kanaler är katjonkanaler som tillåter cellen att ta upp olika katjoner. En del är ospecifika, de tar upp både mono- och divalenta joner utan att föredra någon specifik. Andra har hög specificitet för  $\text{Ca}^{2+}$ , även om de oftast kan ta upp  $\text{Na}^+$ . När cellens koncentration av katjoner ökar depolariseras den. Detta påverkar i sin tur en mängd olika signalvägar i cellen samt signaler som cellen skickar till sina grannar, t ex. vidarebefordrandet av aktionspotentialer. Ökning av den intracellulära  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrationen är en av de mest grundläggande mekanismerna för förmedling av olika signaler i cellen, så det är ingen slump att TRP-kanalerna, som är involverade i många olika processer i kroppen, sköter transport av just dessa joner (Ramsey *et al.* 2006).

Man har kommit fram till att TRP-kanaler aktiveras via tre generella mekanismer: receptoraktivering via G-protein-kopplade receptorer eller receptor tyrosinkinaser, aktivering via ligander samt direkt aktivering via temperatur och mekaniskt tryck (Ramsey *et al.* 2006). Den förstnämnda kommer bara att beskrivas ytligt då informationen kring denna typ av aktivering är motstridig och att det ännu så länge finns många luckor inom området.

### **Aktivering via receptorer**

#### *G-proteinkopplade receptorer*

Denna receptortyp är kanske den mest kända deltar i så gott som alla processer i kroppen. När en receptor aktiveras av t ex. en ligand, kan den i sin tur aktivera G-proteinet som sitter bundet i plasmamembranet, som då delas upp i två delar där den ena frigörs och kan diffundera iväg och aktivera andra proteiner, ofta receptorer. För TRP-kanaler sker detta genom att fosfolipas C (PLC) aktiveras. Denna kan sedan påverka TRP-kanalens aktivitet via tre olika sätt. PLC:s uppgift är att hydrolysera en inositol-fosfolipid som då delas upp i två delar; diacylglycerol (DAG) och inositol 1,4,5-trifosfat ( $\text{IP}_3$ ). PLC kan också hydrolysera fosfatidylinositol 4,5-bisfosfat ( $\text{PIP}_2$ ).  $\text{PIP}_2$  och DAG binder sedan TRP-kanalen direkt och modulerar dess aktivitet, medan  $\text{IP}_3$  binder till  $\text{IP}_3$ -receptorn i ER, som sedan frigör  $\text{Ca}^{2+}$ -joner i cytosolen.  $\text{Ca}^{2+}$  påverkar sedan TRP-kanalens aktivitet tillsammans med calmodulin (Lodish *et al.* 2008).

#### *Receptor-tyrosinkinaser*

Denna typ av receptor består av två delar som bildar en dimer vid bindande av en signalmolekyl. Varje del har kinas-aktivitet och fosforylerar varandra på flera ställen. Dessa ställen fungerar sedan som bindningsställen för olika intracellulära signalproteiner, t ex. PLC, som sedan verkar på samma sätt som i fallet med G-proteinkopplade receptorer. När det gäller dessa signalvägars påverkan på TRP-kanaler är uppgifterna som nämnts ofta mer eller mindre motstridiga. Ännu så länge är dock bevisen starkast för aktivering/modulering via  $\text{PIP}_2$  respektive DAG. Det finns också skillnader mellan olika typer av TRP-kanaler (Lodish *et al.* 2008).

### **Regulatoriska och modulerande mekanismer**

#### *PKC, DAG, och $\text{IP}_3$ -receptorn*

DAG, som produceras av PLC, aktiverar vissa TRP-kanaler, exempelvis TRPC3, direkt men inte andra. Den verkar också genom att aktivera PKC, som inhiberar dels TRPC3 men också andra TRPC-kanaler (Venkatachalam *et al.* 2003). PLC producerar också  $\text{IP}_3$ , som diffunderar genom cytosolen och aktiverar  $\text{IP}_3$ -receptorn, som nämnts ovan. Den frigör  $\text{Ca}^{2+}$ , som dels

aktiverar TRP-kanaler direkt, men som också aktiverar PKC, som liksom i föregående fall är en inhibitor (Kanki *et al.* 2001). På det här sättet fungerar många aktivatörer också indirekt som inhibitorer och skapar feedback-loopar, precis som många andra system. Det återstår dock mycket arbete för att reda ut hur signalvägar där TRP-kanaler ingår är uppbyggda.

TRPM7, som har en  $\alpha$ -kinasdomän C-terminalt, moduleras av cAMP och PKA (proteinkinase A). cAMP och PKA är produkter i en annan variant av G-protein-kopplad receptor-stimulering. cAMP aktiverar PKA, som i sin tur aktiverar TRPM7 via interaktioner med dess  $\alpha$ -kinasdomän (Takezawa *et al.* 2004). Detta är bara ett exempel på hur varierande aktiverings- och moduleringsmekanismerna är för TRP-kanaler.

#### *Ca<sup>2+</sup> och calmodulin*

Denna typ av reglering är mycket vanlig och fungerar genom att Ca<sup>2+</sup> binder till calmodulin som då blir aktivt. Bindningen av Ca<sup>2+</sup> möjliggör en stor konformationsförändring som behövs för att calmodulinet ska kunna binda olika proteiner. Eftersom aktivering av TRP-kanaler leder till intag av extracellulärt Ca<sup>2+</sup> och utsöndring av Ca<sup>2+</sup> från ER bildar TRP-kanalen till sin egen reglering via en feedback-loop. Det bundna calmodulinet inhiberar sedan kanalen genom att inducera och hålla TRP-kanalen i sitt stängda tillstånd och alltså hindrar joner från att komma in genom TRP-kanalen (Numazaki *et al.* 2002, Rosenbaum *et al.* 2003).

#### **Aktivering via ligander**

Denna typ av aktivering är den som TRP-kanalerna kanske är mest kända för. Det klassiska exemplet som nämnts tidigare är capsaicin, som finns i chilifrukt. Liganderna kan vara av många olika typer; ofta är de små organiska molekyler men även produkter från lipidmetabolism (se ovan) och oorganiska joner. Inte alla TRP-kanaler fungerar som sensorer för yttre stimuli. Här nedan följer exempel med de fyra kanaler som har visat sig vara viktigast för denna typ av signalering. Om inget annat anges kommer informationen nedan från Vriens *et al.* (2008).

#### *TRPV1 och TRPV3*

TRPV1 blev känd för sin förmåga att aktiveras av värme och capsaicin, och har sedan visat sig stimuleras eller inhiberas av en mängd olika substanser. TRPV1 stimuleras t ex. av piperin, som finns i peppar, gingerol och zingerol från ingefära, kamfer och olika maneters gift. Alla dessa ämnen är kända för att ge upphov till en brännande känsla eller smak. Flera substanser har också visat sig inhibera TRPV1, t ex. thapsigargin från *Thapsia garganica*. Flera av dessa substanser aktiverar också andra TRP-kanaler. Kamfer t ex. aktiverar också TRPV3, som också stimuleras av värme, men i ett lägre temperaturintervall än TRPV1, därav den mer behagligt varma känslan som kamfer ger. TRPV3 aktiveras också av vanillin och carvacrol från oregano.

#### *TRPM8*

Denna kanal aktiveras främst av olika monoterpener som mentol och eukalyptol, som ger en sval känsla och smak och geraniol som bl. a. finns i rosor. Vid biokemiska studier av TRPM8 används ofta icilin, en ”superkylande” syntetisk aktivator. Det verkar dock som att icilin inte binder vid samma ställe på kanalen som exempelvis mentol. Bindningsstället för icilin motsvarar det för capsaicin hos TRPV1. Detta indikerar att mekanismen för stimulering via kemiska substanser är evolutionärt konserverad bland TRP-kanaler (Chuang *et al.* 2004). Att olika ligander binder vid olika domäner är en intressant observation med tanke på att TRP-kanaler tros fungera som signalintegratorer, som nämnts ovan. TRPM8 inhiberas av

cinnamaldehyd från kanel och etanol, som inhiberar aktivering med PIP<sub>2</sub>. TRPM8 stimuleras också av kyla, se nedan.

#### *TRPA1*

TRPA1 är avlägset besläktad med de andra grupperna men har ändå liknande funktioner i många fall. Till en början verkade det som att TRPA1 aktiveras av låga temperaturer, men detta är ännu osäkert. Säkert är att TRPA1 aktiveras av många olika naturligt förekommande kemiska föreningar. Framförallt flera isothiocyanater som förekommer i bl. a. wasabi och senap. I motsats till TRPM8 aktiveras TRPA1 av cinnamaldehyd. Andra substanser som aktiverar TRPA1 är eugenol från klöver, gingerol från ingefära och allicin från vitlök. Kamfer inhiberar TRPA1, vilket är logiskt med tanke på den svagt smärtlindrande effekt som kamfer har. Ytterligare föreningar som visat sig stimulera TRPA1 är acrolein, en substans i tårgas, och tetrahydrocannabinol som är den verksamma substansen i cannabis.

#### **Aktivering via temperatur**

Att TRP-kanaler reagerar på olika temperaturintervall förklarar de kalla och varma upplevelserna av många av de ovanstående substanserna. Men flera studier tyder på att aktivering med temperatur respektive ligander sker på olika sätt, genom att olika domäner påverkas av olika stimuli, även om slutresultatet förstås blir detsamma.

#### *Värme och kyla*

TRPV1-4 aktiveras av olika varma temperaturintervall, där 1 och 2 av smärtsamma temperaturer; >43 °C resp. >52 °C. Intressant är att TRPV2 inte aktiveras av capsaicin som man annars kunde vänta sig. 3 och 4 stimuleras av mer behagliga temperaturer; 33-39 °C resp. 27-32 °C. TRPM8 och kanske TRPA1 aktiveras av låga temperaturer; 23-28 °C resp. <17 °C. Det är dock osäkert om detta stämmer för TRPA1 då olika studier har fått olika resultat (Venkatachalam och Montell 2007). Det är slående hur de olika kanalerna har fått varsitt temperaturintervall och att de tillsammans kompletterar varandra för att kunna ge organismen förmåga att reagera på temperaturer inom hela det fysiologiska området. Exakt hur temperaturaktivering går till rent mekanistiskt är inte utrett än.

#### **Aktivering via mekaniskt tryck**

Många av kanalerna stimuleras också av tryck. Starkast indikationer har man fått från TRPA, TRPN (saknas hos däggdjur) och vissa TRPV-kanaler, men även TRPC- och TRPP- och TRPML-kanaler tycks ha denna förmåga. De fyra första har alla ankyrin-repetitioner N-terminalt, som troligen är den domän som reagerar på tryck genom att fungera som en fjäder (Venkatachalam och Montell 2007). Flera av kanalerna uttrycks i hårceller i öronsnäckan. Ankyrinerna är förmodligen kopplade till aktinfilament som utgör en del av cytoskelettet. På så sätt kan den mekaniska kraften vidarebefordras till andra delar av cellen och påverka olika signalvägar som i sin tur ger upphov till nervimpulser. Hur det går till är däremot en annan historia. Det har spekulerats i om cadheriner, en typ av transmembranproteiner som är kopplade till aktinfilament och som också finns i hårceller, är ansvariga för att vidarebefordra mekaniska signaler, men åtminstone en relativt ny studie tyder på att det är ankyrinerna som är bäst lämpade för denna uppgift (Sotomayor *et al.* 2005).

TRPP- och TRPML-kanaler måste däremot ha en annan mekanism för transduktion av tryck då de saknar ankyrin-repetitioner (Venkatachalam och Montell 2007). Förmågan att förmedla trycksignaler är grundläggande för förmågan att uppfatta ljudsignaler. Några av ovanstående kanaler är kandidater till att vara "hörselkanalen", den kanal som är först i kedjan med att ta upp ljudimpulser och sedan förmedla dem vidare för omvandling till nervsignaler (Cuajungco *et al.* 2007).

## Signalintegrering och allosteri

Då TRP-kanaler har förmåga att aktiveras och moduleras av flera olika signaler samtidigt genom sina många olika domäner i N- och C-terminalerna, fungerar de förmodligen som övergripande cellulära sensorer som integrerar olika signaler och ger cellen och organismen en helhetsbild av sin omgivning (Venkatachalam och Montell 2007). Denna hypotes stärks av att den största delen av kanalen befinner sig i cytosolen där den kan interagera med andra proteiner. Värt att notera är att många av liganderna beskrivna ovan är tillräckligt hydrofoba för att kunna ta sig igenom cellmembranet och binda till de cytosoliska delarna. Detta är också en intressant mekanism i sig; att cellen reagerar på vissa stimuli på insidan istället för på utsidan som annars vore mest logiskt.

En del studier tyder på att TRP-kanaler, med sin ovan nämnda förmåga, fungerar allosteriskt. Allosteri innebär att olika domäner i ett protein kan påverka varandra på så sätt att när en ligand binder till en domän induceras en konformationsförändring, som i sin tur skapar en konformationsförändring i en närliggande domän osv. Denna domän kan då få ökad eller minskad bindningsförmåga för en ligand. Det blir så att säga en dominoeffekt där flera konformationsförändringar drastiskt kan ändra ett proteins kemiska egenskaper (Latorre *et al.* 2007).

## TRP-kanaler och sinnesfysiologi

I detta avsnitt ges olika exempel på TRP-kanalers betydelse för olika organismer och hur de ingår i olika viktiga anpassningar. Som tidigare nämnts deltar någon typ av kanal i alla fem sinnesorganen även om de har störst betydelse för känselsinnet, och kanske, även för hörselsinnet. Därför ligger fokus på detta, och också för att dessa områden är mest utforskade.

### Värme/kyla

För många organismer är det mycket viktigt att kunna läsa av omgivningens temperatur då de flesta djur har ett optimalt temperaturintervall där de fungerar som bäst. Blir det för varmt riskerar man att bli uttorkad eller få brännskador. Blir det för kallt fungerar olika processer i kroppen sämre/långsammare och man kan få köldskador. Även i fall där temperaturen inte är så extrem så innebär nivåer utanför organismens normala intervall att den måste spendera energi på att värma upp eller kyla ner kroppen, vilket är bra om den kan undvika. Detta gäller både för växelvarma och jämnvarma djur.

TRP-kanalerna tycks ha utvecklats för att kunna ge organismen ganska exakt information om rådande temperaturförhållanden. Ett bra exempel är en nyligen gjord studie där man kunnat visa att TRPM8 hos två groddarter, *Xenopus tropicalis* och *Xenopus laevis*, har anpassats till att aktiveras vid ett lägre temperaturintervall än vad den gör hos däggdjur. Groddor har en lägre kroppstemperatur än t ex. däggdjur och deras TRPM8 har anpassats till att svara inom ett temperaturintervall som är relevant för dessa djur (Myers *et al.* 2009).

Ett annat exempel som visar på hur viktiga TRP-kanalerna är för värmereglering är krokodilers sätt att hålla temperaturen. De växlar mellan att solbada och att svalka sig i vattnet för att hålla kroppstemperaturen jämn. Om TRPV1 och TRPM8 blockeras med capsazepin slutade krokodilerna med detta beteende och spenderade den mesta tiden i vattnet, och deras kroppstemperatur sjönk till ungefär samma nivå som vattnets. Hos åtminstone krokodiler uttrycks dessa två kanaler på många ställen i kroppen och troligen används TRP-kanaler för att ge information om både yttre och inre temperatur (Seebacher och Murray 2007).

För växelvarma djur är det förmodligen viktigt att ha ett system med flera sensorer som kan se till att hela kroppen håller ungefär samma temperatur. När det gäller jämnvarma djur så finns en hypotes där det istället finns en enda temperaturregulator som läser av kroppstemperaturen, men det förutsätter att den är någorlunda homogen, vilket är troligt för jämnvarma djur men knappast för växelvarma som förlitar sig på uppvärmning utifrån (Seebacher och Murray 2007).

### *Känsel*

Känselsinnet är kanske det mest grundläggande sinnesorganet. Förmågan att kunna få information om allt man får kontakt med i omgivningen för att kunna avgöra vad det är och om det är skadligt är livsviktigt. TRP-kanaler tycks här spela en viktig roll för att organismen ska kunna uppfatta framförallt smärta men även för att överhuvudtaget kunna känna. Här tycks många TRP-kanaler från flera olika grupper delta på olika nivåer och i olika organ. TRPC1 verkar t ex. vara viktig för cellmotilitet och reglering av cellens volym. Den aktiveras av spänningar i lipidmembranet (Maroto *et al.* 2005).

TRPA1, som beskrivs mer nedan, tycks spela en viktig roll för perception av smärta då den uttrycks specifikt i de fria nervändarna på nociceptorer (Nagata *et al.* 2005). En annan kanal som är mycket lik TRPA1 är TRPN, eller NOMPC som den också kallas. Den finns hos t ex. fiskar och insekter men saknas hos däggdjur. Den verkar spela en liknande roll som TRPA1, då den i likhet med denna har en mängd ankyrinrepetitioner som skulle kunna fungera som en mekanisk fjäder (Sotomayor *et al.* 2005). Bevis finns för att TRPA1 inte fungerar som en mekanosensor utan endast som en kemosensor hos fiskar (Prober *et al.* 2008). En annan studie tyder dock på att TRPA1 bidrar till känselsinnet hos *C. elegans* (Kindt *et al.* 2007). Varför den saknas hos däggdjur är fortfarande lite oklart men troligen har TRPA1 här ensamt tagit över uppgiften som mekanosensor eller så har möjligen en annan kanal tagit över TRPN:s roll.

TRPP-gruppen har också indikerats stimuleras av tryck. Då de uttrycks i njurarna är det troligt att de spelar roll för att modulera det osmotiska trycket. De verkar också ha betydelse för avläsning av vätskeflöden då de uttrycks i primära cilier i ett flertal olika celltyper (Venkatachalam och Montell 2007).

### *Hörsel*

Flera TRP-kanaler har indikerats ha en viktig roll för hörselsinnet. Troligen är det liknande mekanismer som används för mottagande av ljudimpulser, som ju är en form av tryck, som för känsel. Hittills har man inte lyckats reda ut exakt hur detta går till på molekylär nivå, men två av de främsta kandidaterna är TRPA1 och TRPV4. Även TRPN och TRPML3 verkar ha betydelse för att hörseln ska fungera till 100 %. Alla utom TRPML3 har ankyriner N-terminalt (Cuajungco *et al.* 2007).

Då möss som har fått TRPV4 eller TRPML3 utslagna är helt döva tyder det på att de är essentiella och de uttrycks båda på flera ställen i öronsnäckan, t ex. hos hårceller. TRPA1 har trots sin ankyrinrika struktur inte entydigt kunnat visas vara avgörande för hörseln då möss där pordelen av kanalen tagits bort fortfarande kan höra, samt att blockering av kanalen leder till minskning av mekanotransduktionen men inte till fullständig eliminering av den (Cuajungco *et al.* 2007).

### *Igenkänning av kemiska substanser*

Många naturligt förekommande substanser, speciellt från växtriket, är giftiga eller är gjorda för att skapa obehag för de organismer som kommer i kontakt med dem. Detta för att kunna försvara sig och undvika att bli uppäten. Därför är det viktigt att kunna reagera på dessa substanser för att undvika förgiftning eller obehag. De substanser som tagits upp i tidigare avsnitt är visserligen sällan giftiga annat än i stora mängder, men de tjänar som ett gott försvar mot att bli uppäten. TRP-kanalernas förmåga att kunna känna igen många olika substanser innebär att en organism inte behöver utveckla flera olika receptorer för olika stimuli och är alltså ett mycket effektivt system.

Ett intressant faktum är att fåglars TRPV1 skiljer sig från däggdjurs vid bindningsstället. Fågelvarianten binder inte alls capsaicin lika starkt som däggdjurens, vilket gör att fåglar inte känner chilifrukters starka smak. Denna skillnad innebär att fåglar kan äta frukterna utan obehag medan däggdjur som gärna äter hela växten avskräcks från att göra det. På så sätt skyddas växten från herbivorer samtidigt som den får hjälp med att sprida sina frön. Skillnaden mellan de båda varianterna är betydligt större jämfört med andra typer av receptorer och kanaler och en hypotes föreslår att receptorer som tar emot olika kemiska och fysikaliska stimuli tillåts variera mer, alternativt att de står under ett mycket högre selektionstryck än andra receptorer (Jordt *et al.* 2002).

### *Övriga roller i sinnesfysiologi*

Förutom att vara starkt kopplade till olika typer av känsel och hörsel är några TRP-kanaler också viktiga för andra sinnen. TRPC2 verkar vara viktig för att detektera feromoner, luftburna signaler från andra individer som ger information om sändarens hormonstatus och påverkar densamma hos mottagaren. Detta sker i vomeronasalorganet, en del av luktsinnet där TRPC2 specifikt uttrycks. Detta organ saknas hos människor och vi tycks ha förlorat förmågan att, åtminstone medvetet, reagera på feromoner. TRPC2 är också, intressant nog, en pseudogen hos oss (Venkatachalam och Montell 2007).

TRPM5 har visat sig vara avgörande för att kunna känna smakerna sött, beskt och umami (glutamat eller ”köttsmak”). Detta trots att dessa tre smaker har olika receptorer, vilket indikerar att signalerna från dem skickas vidare via samma signalväg, där TRPM5 är en central del (Zhang *et al.* 2003).

Slutligen så har också TRP hos *D. melanogaster*, motsvarande TRPC1 hos däggdjur, en viktig roll för att deras synsinne ska fungera optimalt. Detta var den TRP-kanal som upptäcktes först, som nämndes i inledningen. Den behövs för att flugan ska kunna reagera på upprepad stimulering med strakt ljus (Montell och Rubin 1989).

## **Diskussion**

Ett av de områden där det råder störst oklarheter är strukturen på TRP-kanalernas membrandel. På grund av svårigheterna med att få fram bilder med hög upplösning av hydrofoba proteiner gör det kunskapen kring jontransporten väldigt bristfällig. Det kan visa sig att många av de antaganden som gjorts inom detta område visar sig vara fel. Det kommer i sin tur också påverka kunskapen kring olika mekanismer för aktivering och modulering.

Detta är ännu ett mycket ungt forskningsområde, endast 20 år gammalt. Därför är många saker kring TRP-kanaler fortfarande outredda eller i ett stadium där resultaten ännu inte är tillförlitliga. Till exempel så har avsnitten om evertebraters respektive däggdjurs TRP-uppsättning endast en referens var. Därför bör den informationen tas med en nypa salt. Deras



speciella egenskaper som mottagare av en mängd vitt skilda stimuli försvårar dessutom karakteriseringen av deras biokemi. En stor utmaning är att ta reda på hur tryck- respektive temperaturaktivering går till. Det kommer att kräva hjälp från fysikens område och mycket sofistikerade mätmetoder. Det återstår också att ta reda på hur TRP-kanaler interagerar med och påverkas av andra signalvägar i cellen. Här finns ännu mycket lite information, vilket också gör det svårt att dra några säkra slutsatser om vilken betydelse de egentligen har för hörsel och känsel.

På grund av sin betydelse för sinnesfysiologi och sina egenskaper som signalintegratorer kommer de att lära oss mycket både om våra sinnen och om hur proteiner kan fungera. De kunskaperna kan i sin tur hjälpa oss att komma på nya lösningar på olika tekniska problem där vi kan härma naturen, som ju oftast har de smartaste lösningarna. De många olika ligander som aktiverar TRP-kanaler ger många möjligheter att studera protein-ligandinteraktioner. Det kan med stor sannolikhet bidra till framtagande av nya och bättre läkemedel mot en lång rad sjukdomar.

## Referenser

- Barrera NP, Shaifita Y, MacFadzean E, Ward JPT, Henderson RM, Edwardson JM. 2007. AFM Imaging Reveals the Structure of the TRPC1 Channel. *Biochemical and Biophysical Communications* **358**: 1086-1090.
- Caterina M J, Schumacher M A, Tominaga M, Rosen T A, Levine J D, Julius D. 1997. The Capsaicin Receptor: A Heat-activated Ion Channel in the Pain Pathway. *Nature* **389**: 816-824.
- Chuang H, Neuhausser W, Julius D. 2004. The Super-Cooling Agent Icilin Reveals a Mechanism of Coincidence Detection by a Temperature-Sensitive TRP Channel. *Neuron* **43**: 859-869.
- Clapham D E. 2003. TRP Channels as Cellular Sensors. *Nature* **426**: 517-524.
- Corey DP, Garcia-Anoveros J, Holt JR, Kwan KY, Lin SY, Vollrath MA, Amalfitano A, Cheung EL, Derfler BH, Duggan A, Géléoc GS, Gray PA, Hofmann MP, Rehm HL, Tamasauskas D, Zhang DS. TRPA1 Is a Candidate for the Mechanosensitive Transduction Channel of Vertebrate Hair Cells. *Nature* **432**: 723-730.
- Cuajungco M P, Grimm C, Heller S. 2007. TRP channels as candidates for hearing and balance abnormalities in vertebrates. *Biochimica et Biophysica Acta* **1772**: 1022-1027.
- da Silva LP. 2002. Atomic Force Microscopy and Proteins. *Protein and Peptide Letters* **9**: 117-125.
- Di Palma F, Belyantseva IA, Kim HJ, Vogt TF, Kachar B, Noben-Trauth K. 2002. Mutations in Mcoln3 Associated with Deafness and Pigmentation Defects in Varitint-Waddler (Va) Mice. *Proceedings of the National Academy of Science* **99**: 14994-14999.
- Gaudet R. 2008. TRP Channels Entering the Structural Era. *Journal of Physiology* **586**: 3565-3575.
- Hofmann T, Chubanov V, Gudermann T, Montell C. 2003. TRPM5 Is a Voltage-modulated and Ca<sup>2+</sup>-activated Monovalent Selective Cation Channel. *Current Biology* **13**: 1153-1158.
- Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G. 1999. Direct Activation of Human TRPC6 and TRPC3 Channels by Diacylglycerol. *Nature* **397**: 259-263.
- [http://en.wikipedia.org/wiki/Ankyrin\\_repeat](http://en.wikipedia.org/wiki/Ankyrin_repeat) 2009-01-14
- [http://en.wikipedia.org/wiki/Coiled\\_coil](http://en.wikipedia.org/wiki/Coiled_coil) 2009-01-14
- Jordt S, Julius D. 2002. Molecular Basis for Species-Specific Sensitivity to Hot Chili Peppers. *Cell* **108**: 421-430.

- Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Högestätt ED, Meng ID, Julius D. 2004. Mustard Oils and Cannabinoids Excite Sensory Nerve Fibres Through the TRP Channel ANKTM1. *Nature* **427**: 260-265.
- Kanki H, Kinoshita M, Akaike A, Satoh M, Mori Y, Kaneko S. 2001. Activation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Is Essential for the Opening of Mouse TRP5 Channels. *Molecular Pharmacology* **60**: 989-998.
- Kindt S K, Viswanath V, Macpherson L, Quast K, Hu H, Patapoutian A, Schaefer W. 2006. *Caenorhabditis elegans* TRPA-1 functions in mechanosensation. *Nature Neuroscience* **10**: 568-577.
- Latorre R, Brauchi S, Orta G, Zaelzer C, Vargas G. 2007. ThermoTRP Channels as Modular Proteins with Allosteric Gating. *Cell Calcium* **42**: 427-438.
- Launay P, Fleig A, Perraud AL, Sharenberg AM, Penner R, Kinet JP. 2002. TRPM4 Is a Ca<sup>2+</sup>-activated Nonselective Cation Channel Mediating Cell Membrane Depolarization. *Cell* **109**: 397-407.
- Liman ER, Corey DP, Dulac C. 1999. TRP2: a Candidate Transduction Channel for Mammalian Pheromone Sensory Signaling. *Proceedings of the National Academy of Science* **96**: 5791-5796.
- Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Bretscher A, Ploegh H, Matsudaira P. 2008. *Molecular Cell Biology*. 6:e uppl. W.H. Freeman and Company.
- Lucas P, Ukhanov K, Leinders-Zufall T, Zufall F. 2003. A Diacylglycerol-gated Cation Channel in Vomeronasal Neuron Dendrites Is Impaired in TRPC2 Mutant Mice: Mechanism of Pheromone Transduction. *Neuron* **40**: 551-561.
- Macpherson L J, Hwang S W, Miyamoto T, Dubin A E, Patapoutian A, Story G M. 2006. More than Cool: Promiscuous Relationships of Menthol and Other Sensory Compounds. *Molecular and Cellular Neuroscience*. **32**: 335-343.
- Maroto R, Raso A, Wood TG, Kurosky A, Martinac B, Hamill OP. 2005. TRPC1 Forms the Stretch-Activated Cation Channel in Vertebrate Cells. *Nature Cell Biology* **7**: 179-185.
- Matsuura H, Sokabe T, Kohno K, Tominaga M, Kadowaki T. 2009. Evolutionary conservation and changes in insect TRP channels. *BMC Evolutionary Biology* **9**:228 doi: 10.1186/1471-2148-9-228.
- McCleverty CJ, Koesema E, Patapoutian A, Lesley, SA, Kreusch A. 2006. Crystal Structure of the Human TRPV2 Channel Ankyrin Repeat Domain. *Protein Science* **15**: 2201-2206.
- McPherson A, Malkin AJ, Kuznetsov YG. 1995. The Science of Macromolecular Crystallization. *Structure* **3**: 759-768.
- Mei ZZ, Xia R, Beech DJ, Jiang LH. 2006. Intracellular Coiled-Coil Domain Engaged in Subunit Interaction and Assembly of Melastatin-Related Transient Receptor Potential Channel 2. *The Journal of Biological Chemistry* **281**: 38748-38756.
- Mio K, Ogura T, Kiyonaka S, Hiroaki Y, Tanimura Y, Fujiyoshi Y, Mori Y, Sato C. 2007. The TRPC3 Channel Has a Large Internal Chamber Surrounded by Signal Sensing Antennas. *Journal of Molecular Biology* **367**: 373-383.
- Mochizuki T, Wu G, Hayashi T, Xenophontos SL, Veldhuisen B, Saris JJ, Reynolds DM, Cai Y, Gabow PA, Pierides A, Kimberling WJ, Breuning MH, Deltas CC, Peters DJ, Somlo S. 1996. PKD2, a Gene for Polycystic Kidney Disease that Encodes an Integral Membrane Protein. *Science* **272**: 1339-1342.
- Montell C, Rubin G M. 1989. Molecular Characterization of the *Drosophila trp* Locus: A Putative Integral Membrane Protein Required for Phototransduction. *Neuron* **2**: 1313-1323.
- Myers B R, Sigal Y M, Julius D. 2009. Evolution of Thermal Response Properties in a Cold-Activated TRP Channel. *PLoS ONE* **4**(5): e5741. doi: 10.1371

- Nagata K, Duggan A, Kumar G, Garcia-Anoveros J. 2005. Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *The Journal of Neuroscience* **25**: 4052-4061.
- Numazaki M, Tominaga T, Takeuchi K, Maruyama N, Toyooka H, Tominaga M. 2003. Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proceedings of the National Academy of Science* **100**: 8002-8006.
- Orlova EV, Saibil HR. 2004. Structure Determination of Macromolecular Assemblies by Single-particle Analysis of Cryo-electron Micrographs. *Current Opinion in Structural Biology* **14**: 584-590.
- Palmer CP, Aydar E, Djamgoz MB. 2005. A Microbial TRP-like Polycystic-kidney-disease-related Ion Channel Gene. *Biochemical Journal* **387**: 211-219.
- Palmer CP, Zhou XL, Lin J, Loukin SH, Kung C, Saimi Y. 2001. A TRP Homolog in *Saccharomyces cerevisiae* Forms an Intracellular Ca<sup>2+</sup>-permeable Channel in the Yeast Vacuolar Membrane. *Proceedings of the National Academy of Science* **98**: 7801-7805.
- Peier A M, Moqrich A, Hergarden A C, Reeve A J, Andesson D A, Story G M, Earley T J, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A. 2002. A TRP Channel That Senses Cold Stimuli and Menthol. *Cell* **108**: 705-715.
- Phelps CB, Gaudet R. 2007. The Role of the N Terminus and Transmembrane Domain of TRPM8 in Channel Localization and Tetramerization. *The Journal of Biological Chemistry* **282**: 36474-36780.
- Plant TD, Schaefer M. 2005. Receptor-operated Cation Channels Formed by TRPC4 and TRPC5. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **371**: 266-276.
- Prober D A, Zimmerman S, Myers B R, McDermott Jr B M, Kim S, Caron S, Rihel J, Solnica-Krezel L, Julius D, Hudspeth A J, Schier A F. 2008. Zebrafish TRPA1 Channels Are Required for Chemosensation But Not for Thermosensation or Mechanosensory Hair Cell Function. *The Journal of Neuroscience* **28**: 10102-10110.
- Ramsey S, Delling M, Clapham D. 2006. An Introduction to TRP Channels. *Annual Review of Physiology* **68**: 619-47.
- Rosenbaum T, Gordon-Shaag A, Munari M, Gordon S E. 2003. Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin Modulates TRPV1 Activation by Capsaicin. *Journal of Genetics and Physiology* doi: 10.1085
- Saito S, Shingai R. 2006. Evolution of thermoTRP homologs in vertebrates. *Physiological Genomics* **27**: 219-230.
- Schaefer M, Plant TD, Obukhov AG, Hofmann T, Gudermann T, Schultz G. 2000. Receptor-mediated Regulation of the Nonselective Cation Channels TRPC4 and TRPC5. *The Journal of Biological Chemistry* **275**: 17517-17526.
- Schlingmann KP, Weber S, Peters M, Niemann Nejsum L, Vitzthum H, Klingen K, Kratz M, Haddad E, Ristoff E, Dinour D, Syrrou M, Nielsen S, Sassen M, Waldegger S, Seyberth HW, Konrad M. 2002. Hypomagnesemia with Secondary Hypocalcemia is Caused by Mutations in TRPM6, a New Member of the TRPM Family. *Nature Genetics* **31**: 166-170.
- Seebacher F, Murray S A. 2007. Transient Receptor Potential Ion Channels Control Thermoregulatory Behaviour in Reptiles. *PLoS ONE* **2**(3): e281. doi: 10.1371
- Sotomayor M, Corey D P, Schulten K. 2005. In search of the hair cell gating spring: elastic properties of ankyrin and cadherin repeats. *Structure* **13**: 669-682.
- Strubing C, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE. 2001. TRPC1 and TRPC5 Form a Novel Cation Channel in Mammalian Brain. *Neuron* **29**: 645-655.
- Strubing C, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE. 2003. Formation of Novel TRPC Channels by Complex Subunit Interaction in Embryonic Brain. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 39014-39019.

- Takezawa R, Schmitz C, Demeuse P, Sharenberg A M, Penner R, Fleig A. 2004. Receptor-mediated regulation of the TRPM7 channel through its endogenous protein kinase domain. *Proceedings of the National Academy of Science* **101**: 6009-6014.
- Tominaga M, Caterina M J, Malmberg, A M, Rosen T A, Gilbert H, Skinner K, Raumann B E, Basbaum A I, Julius D. 1998. The Cloned Capsaicin Receptor Integrates Multiple Pain-producing Stimuli. *Neuron* **21**: 531-543.
- Tsuruda PR, Julius D, Minor Jr DL. 2006. Coiled Coils Direct Assembly of a Cold-Activated TRP Channel. *Neuron* **51**: 201-212.
- Walker RG, Willingham AT, Zuker CS. 2000. A Drosophila Mechanosensory Transduction Channel. *Science* **287**: 2229-2234.
- Vannier B, Peyton M, Boulay G, Brown D, Qin N, Jiang M, Zhu X, Birnbaumer L. 1999. Mouse TRP2, the Homolog of the Human TRPC2 Pseudogene, Encodes mTRP2, a Store Depelition-activated Capacitative Ca<sup>2+</sup> Entry Channel. *Proceedings of the National Academy of Science* **96**: 2060-2064.
- Weil A, Moore SE, Waite NJ, Randall A, Gunthorpe MJ. 2005. Conservation of Functional and Pharmacological Properties in the Distantly Related Temperature Sensors TRPV1 and TRPM8. *Molecular Pharmacology* **68**: 518-527.
- Venkatachalam K, Montell C. 2007. TRP Channels. *Annual Review of Biochemistry* **76**: 387-417.
- Venkatachalam K, Zheng F, Gill D L. 2003. Regulation of Canonical Transient Receptor Potential (TRPC) Channel Function by Diacylglycerol and Protein Kinase C. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 29031-29040.
- Wes P D, Chevesich J, Jeromin A, Rosenberg C, Stetten G, Montell C. 1995. TRPC1, A Human Homolog of a Drosophila Store-operated Channel. *Proceedings of the National Academy of Science* **92**: 9652-56.
- Voets T, Janssens A, Droogmans G, Nilius B. 2004. Outer Pore Architecture of a Ca<sup>2+</sup> -selective TRP Channel. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 15223-15230.
- Vriens J, Nilius B, Vennekens R. 2008. Herbal Compounds and Toxins Modulating TRP Channels. *Current Neuropharmacology* **6**: 79-96.
- Wütrich K. 1989. Protein Structure Determination in Solution by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Science* **243**: 45-50.
- Yamaguchi H, Matsushita M, Nairn AC, Kuriyan J. 2001. Crystal Structure of the Atypical Protein Kinase Domain of a TRP Channel with Phosphotransferase Activity. *Molecular Cell* **7**: 1047-1057.
- Zhang Y, Hoon M A, Chandrashekar J, Mueller K L, Cook B, Wu D, Zuker C S, Ryba N J P. 2003. Coding of sweet, bitter and umami tastes: different receptor cell sharing similar siganling pathways. *Cell* **112**: 293-301.
- Zheng J, Dai C, Steyger PS, Kim Y, Vass Z, Ren T, Nuttall AL. 2003. Vanilloid Receptors in Hearing: Altered Cochlear Sensitivity by Vanilloids and Expression of TRPV1 in the Organ of Corti. *Journal of Neurophysiology* **90**: 444-455.