

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie



Studium teplotní citlivosti lidského TRPA1 kanálu
A study of the temperature sensitivity of the human TRPA1 channel

Bakalářská práce
Kristýna Barvíková

Vedoucí práce: doc. RNDr. Miroslav Šulc, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Viktorie Vlachová, DrSc.

Praha 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele doc. RNDr. Miroslava Šulce, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne

.....

Kristýna Barvíková

Abstrakt

Fyziologická detekce vnějších podnětů na periferních zakončeních primárních aferentních sensorických neuronů je zajišťována prostřednictvím specifické skupiny tzv. tranzientních receptorových potenciálových (TRP) kanálů. Současný rozvoj kryoelektronové mikroskopie a molekulárně-biologických technik umožňuje studovat funkci těchto specializovaných proteinů ve vztahu k jejich struktuře a pochopit tak lépe jejich fyziologickou úlohu a možnosti jejich farmakologického ovlivnění. Cílem předložené bakalářské práce je zpracovat souhrnný přehled současných poznatků o funkčních a strukturních vlastnostech ankyrinového TRP receptoru podtypu 1 (TRPA1), iontového kanálu aktivovaného různými dráždivými látkami a změnami okolní teploty. Experimentální část práce se zaměřuje na prozkoumání úlohy sensorové domény v teplotní citlivosti TRPA1. Výsledky získané pomocí elektrofyziologické techniky *whole-cell patch-clamp* prokazují, že sensor je důležitou oblastí určující proces otvírání a zavírání iontového kanálu. Mutace konzervovaného tyrosinu uprostřed sensorové domény pozměnila aktivační kinetiku závislou na membránovém potenciálu a zvýšila míru senzitivace chemických odpovědí při zvýšení teploty z 25 °C na 35 °C. (In Czech)

Klíčová slova: TRP iontový kanál, ankyrinový receptor, nocicepce, struktura-funkce, karvakrol

Abstract

Transient receptor potential (TRP) ion channels play important physiological roles in the detection of environmental stimuli that occur primarily at the peripheral terminals of specialized sensory neurons. The recently resolved cryo-electron microscopy structures and molecular biological techniques have provided new tools that enable to study these channels in relation to their function, and thus to understand more deeply their pharmacology and physiology. The aim of this bachelor thesis is to give an overview of the current status of research on the ankyrin TRP channel subtype 1 (TRPA1), a channel activated by diverse irritant chemical stimuli but also by temperature changes. The experimental part is focused on the elucidation of the role of the sensor domain in thermal sensitivity of the TRPA1 channel. Using *whole-cell patch-clamp* electrophysiological technique, the presented results demonstrate that the sensor is an important determinant of voltage-dependent gating. Mutation of the conserved tyrosine in the center of the sensor resulted in channels with clearly different activation kinetics and increased chemical responses upon increasing the temperature from 25 °C to 35 °C.

Key words: TRP ion channel, ankyrin receptor, nociception, structure-function, carvacrol

Obsah

Obsah.....	5
1. Seznam zkratk.....	7
2. Úvod.....	9
2.1 Struktura TRPA1.....	9
2.1.1 N-koncová oblast.....	11
2.1.2 C-koncová oblast.....	12
2.1.3 Transmembránová oblast.....	13
2.2 Aktivátory TRPA1 kanálu.....	14
2.2.1 Aktivace TRPA1 elektrofilními činidly.....	14
2.2.2 Aktivace TRPA1 neelektrofilními činidly.....	16
2.2.3 Teplotní aktivace TRPA1.....	16
2.3 Úloha senzorové domény TRPA1.....	17
3. Cíle práce.....	20
4. Materiál a metody.....	22
4.1 Chemikálie.....	22
4.2 Biologický materiál.....	22
4.3 Přístroje.....	23
4.4 Roztoky.....	24
4.5 Postup práce.....	25
4.5.1 Příprava mutace Y726F pomocí polymerázové řetězové reakce.....	25
4.5.2 Ověření produktů PCR pomocí horizontální elektroforézy.....	26
4.5.3 Transformace XL10-Gold ultrakompetentních buněk <i>E. coli</i> teplotním šokem.....	26
4.5.4 Amplifikace a izolace připravené plazmidové DNA.....	27
4.5.5 Transfekce HEK293T buněk izolovaným plazmidem.....	28
4.5.6 Příprava proteinového produktu pro hmotnostní spektrometrii.....	28
4.5.7 Ověření proteinového produktu pomocí hmotnostní spektrometrie.....	30

4.5.8	Elektrofyzilogická technika <i>patch-clamp</i>	32
4.5.9	Napět'ová, chemická a teplotní aktivace TRPA1	34
4.5.10	Hodnocení záznamů a statistická analýza.....	35
5.	Výsledky.....	37
5.1	Příprava a ověření sekvence a exprese konstruktů Y726F-TRPA1	37
5.2	Napět'ově závislá aktivace TRPA1 WT a Y726F-TRPA1	39
5.3	Teplotní citlivost napět'ové a chemické aktivace TRPA1 WT a Y726F-TRPA1	41
5.4	Zjištění obecné úlohy Y726 v aktivaci TRP kanálů.....	43
6.	Diskuze	46
7.	Závěr.....	51
8.	Seznam použité literatury	53
9.	Přílohy	55

1. Seznam zkratek

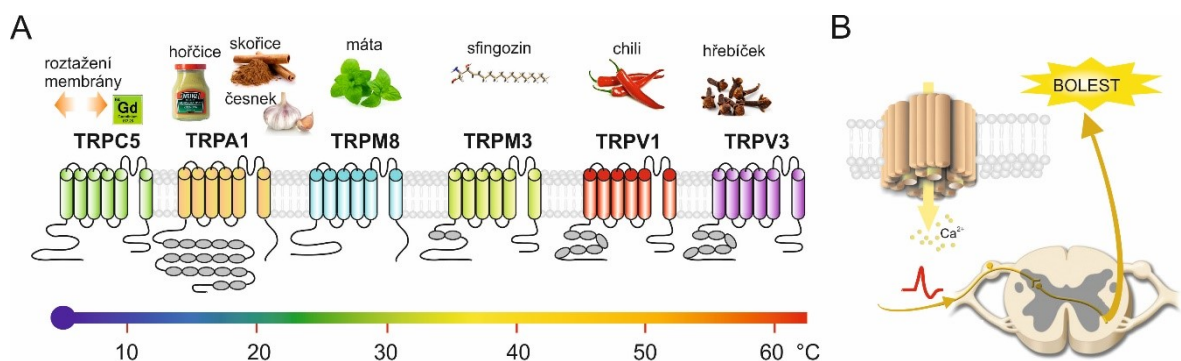
ACN	acetonitril
AITC	allylisothiokyanát
Amp	ampicilin
AR	ankyrirová repetice (angl. ankyrin repeat)
ARD	doména ankyrirových repetic (angl. ankyrin repeat domain)
BPS	Britská farmakologická společnost
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EF-hand	strukturní motiv vyskytující se v TRPA1
EtMf	ethylmorfolin
FBS	fetální bovinní sérum (angl. fetal bovine serum)
GFP	zelený fluorescenční protein (angl. green fluorescent protein)
α -HCCA	α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina
HEK293T	lidské embryonální ledvinné buňky linie 293T (angl. human embryonic kidney cells)
hTRPA1	lidský ortolog TRPA1 receptoru
IAA	jodoacetamid
Ins6P	inositolhexakisfosfát
IUPHAR	Mezinárodní unie základní a klinické farmakologie
Kv	draslíkový kanál
LB médium	kultivační médium pro bakterie (angl. lysogeny broth)
MALDI-TOF	Ionizace laserem za využití matrice (angl. matrix assisted laser desorption/ionization) spřažená s analyzátozem doby letu (angl. time of flight)
MATra	magnetické částice využité k transfekci buněk
MS	hmotnostní spektrometrie (angl. mass spectrometry)
mTRPM3	myší ortolog TRPM3 kanálu
NMM	<i>N</i> -methylmaleimid
P1 – P2	označení pórových helixů 1 až 2 TRPA1
PBS	fosfátový pufr (angl. phosphate buffered saline)
PCR	polymerázová řetězová reakce (angl. polymerase chain reaction)

PI	inhibitor fosfatáz
PIP ₂	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PS	pregnenolon sulfát
RPM	otáčky za minutu (angl. revolutions per minute)
S1 – S6	označení transmembránových helixů 1 až 6 TRPA1
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného
T75 flask	kultivační lahve pro buňky
TAE	Tris-acetát-EDTA pufr
TCEP	Tris(2-karboxyethyl)fosfin chlorid
TFA	tetrafluoroctová kyselina
tGFP	turbo zelený fluorescenční protein
Δ ⁹ -THC	delta-9-tetrahydrokanabinol
TRP	tranzientní receptorový potenciál (angl. transient receptor potential)
TRPA1	ankyrinový tranzientní receptorový potenciálový kanál, subtyp 1 (angl. transient receptor potential ankyrin 1)
TRPC1-7	kanonický tranzientní receptorový potenciálový kanál, subtyp 1-7 (angl. classical transient receptor potential subtype 1-7)
TRP-like	strukturně analogický motiv k TRP-boxu TRPV1
TRPM1-8	melastatinový tranzientní receptorový potenciálový kanál, subtyp 1-8 (angl. melastatin transient receptor potential subtype 1-8)
TRPML1-3	mukolipinový tranzientní receptorový potenciálový kanál, subtyp 1-3 (angl. mucolipin transient receptor potential subtype 1-3)
TRPP1-3	polycystinový tranzientní receptorový potenciálový kanál, subtyp 1-3 (angl. polycystin transient receptor potential subtype 1-3)
TRPV1-6	vaniloidní tranzientní receptorový potenciálový kanál, subtyp 1-6 (angl. vanilloid transient receptor potential subtype 1-6)
WT	přirozený typ (angl. wild type)
WT _{cl}	označení buněčného lyzátu přirozeného typu
Y726F _{cl}	označení buněčného lyzátu mutantu Y726F-TRPA1
V ₅₀	poloviční účinné napětí
V _{rev}	reverzní potenciál

2. Úvod

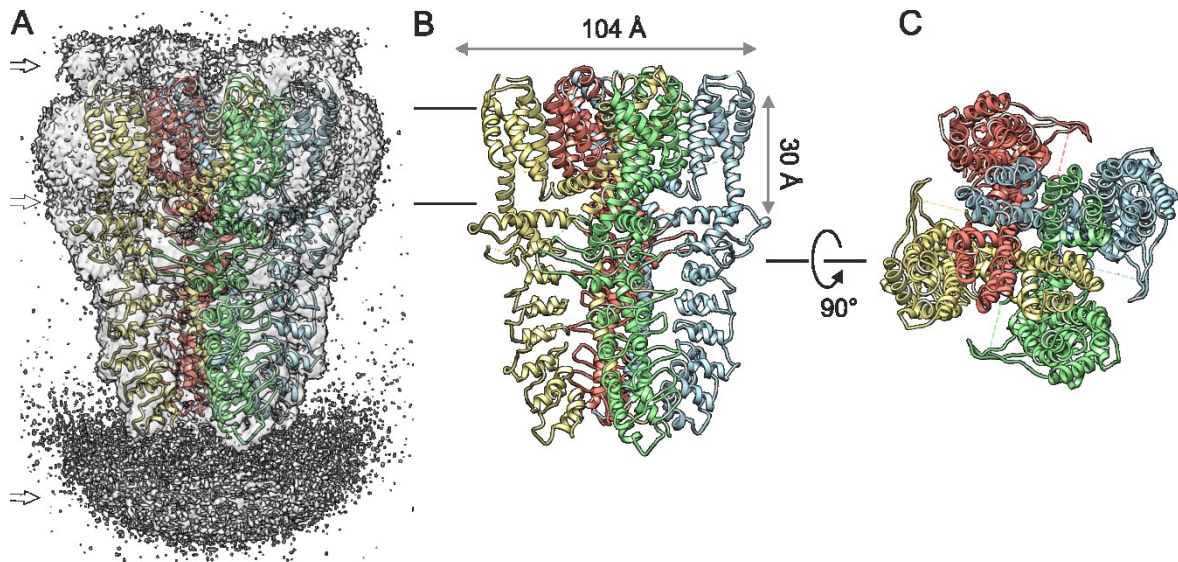
2.1 Struktura TRPA1

Savčí TRPA1 patří do nadrodiny tranzientních receptorových potenciálových kanálů (angl. transient receptor potential, TRP), která zahrnuje 28 různých proteinů dělicích se podle sekvenční homologie do šesti skupin: kanonické (TRPC1-7), ankyrinové (TRPA1), melastatinové (TRPM1-8), vaniloidní (TRPV1-6), polycystinové (TRPP1-3) a mukolipinové (TRPML1-3) ¹. Některé z těchto iontových kanálů, včetně TRPA1, jsou aktivovány při změnách okolní teploty ². Podskupina TRP kanálů uvedená na obrázku 1A (str. 9) se podílí na detekci okolní teploty od 0 °C po 60 °C a mnohé plní fyziologickou úlohu v detekci bolestivého chladu či tepla. TRP kanály jsou také aktivovány velmi pestrým spektrem chemických agonistů vyvolávajících především palčivé či dráždivé vjemy (česnek, máta, chilli a další) (obr. 1A, str. 9). Zvýšením intracelulární koncentrace vápenatých iontů při aktivaci TRP kanálů dochází k depolarizaci neuronu a prostřednictvím akčních potenciálů je informace převáděna do centrálního nervového systému (obr. 1B, str. 9). TRPA1 byl poprvé identifikován v lidských fibroblastech jako protein kódovaný 1119 trojicemi nukleotidů ³. V primárních aferentních sensorických neuronech byla fyziologická úloha TRPA1 jako excitačního iontového kanálu citlivého k teplotním podnětům a dráždivým látkám rozpoznána o čtyři roky později ⁴.

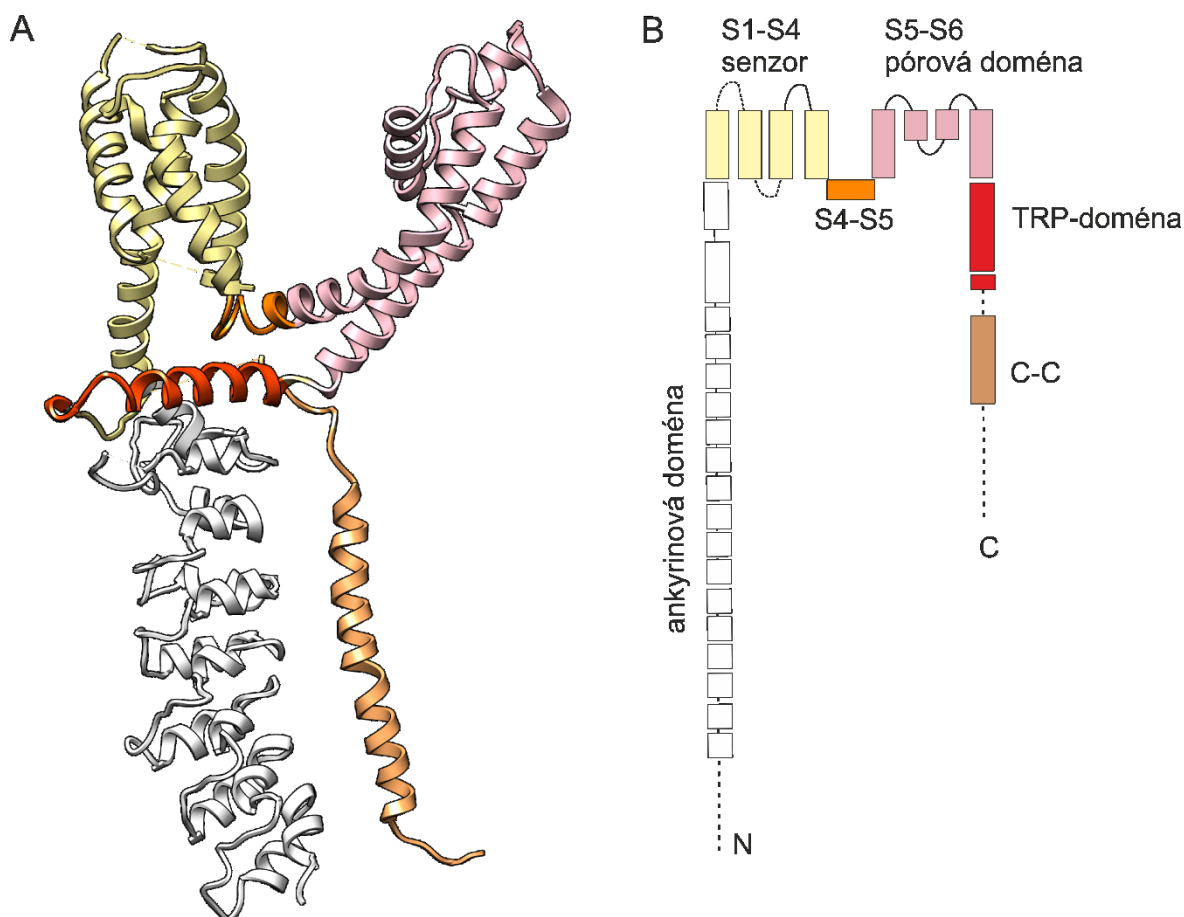


Obrázek 1: Teplotní aktivace TRP kanálů v primárních aferentních sensorických neuronech. **A)** Schematické znázornění podjednotek teplotně citlivých TRP kanálů s vyznačením teplotního rozsahu jejich aktivace spolu se zástupci chemických agonistů. **B)** Aktivace TRPA1 kanálu na periferních zakončeních.

V roce 2015 byla pomocí kryoelektronové mikroskopie určena struktura lidského TRPA1 v rozlišení až 3,92 Å⁵. Funkční iontový kanál je tetramerem, jehož každá podjednotka se skládá z transmembránové části a intracelulárního N- a C-konce, které dohromady tvoří až 80% velikosti kanálu (obr. 2A-C, str. 10). Zdánlivá molekulová hmotnost je predikována okolo 127 kDa pro jednu podjednotku⁶.



Obrázek 2: *Struktura TRPA1. A) 3D hustotní mapa TRPA1-AITC s barevně označenými podjednotkami iontového kanálu. Horizontální šipky označují oblasti s rozlišením, které není dostatečné k 3D rekonstrukci: vnější část senzoru, vnitřní oblast senzoru a distální N-konec. B) Boční pohled na model rozlišené oblasti kanálu s vyznačenými rozměry. C) Pohled shora ukazuje charakteristické podjednotkové uspořádání tetrameru vytvářející centrální pór iontového kanálu. Upraveno podle⁵.*



Obrázek 3: Schematické znázornění podjednotky TRPA1. **A)** a **B)** Podjednotka TRPA1 s vyznačenými strukturně-funkčními oblastmi receptoru: bílá, N-koncová ankyrinová doména; žlutá, senzor; oranžová, raménko mezi transmembránovými segmenty S4 a S5; růžová, pórová doména S5-S6 s dvěma pórotvornými helixy; červená, TRP doména; světle hnědá, C-koncová „coiled-coil“ doména. Části nedostatečně rozlišené v 3D hustotní mapě jsou vyznačeny čárkovaně. Upraveno podle ⁵.

2.1.1 N-koncová oblast

Cytoplazmatický N-konec je dominantní částí receptoru (720 z 1119 aminokyselin) obsahující rozsáhlou ankyrinovou doménu (angl. ankyrin repeat domain, ARD) tvořenou 14-18 ankyrinovými repeticemi (AR1-AR18), spojenou s prvním transmembránovým segmentem (S1) dvěma antiparalelními β skládanými listy, motivem helix-otáčka-helix (angl. helix-turn-helix) a navazujícím kratším helixem (pre-S1; obr. 3A a B, str. 11). Tato oblast obsahuje řadu funkčně důležitých interakčních míst pro elektrofilní agonisty a prostřednictvím hydrofobních kontaktů s transmembránovou doménou se podílí na integraci a převodu signálů i ze vzdálenějších cytoplazmatických částí kanálového

komplexu. TRPA1 se vyznačuje v porovnání s ostatními TRP kanály vysokým počtem ankyrinových repetic⁵. Jedná se o 33 aminokyselin dlouhý motiv s konzervovanou sekvencí .G.TPLHLAA..G...VV.LLL..GA..... vytvářející trojrozměrnou strukturu dvojic antiparalelních helixů následovaných vlásenkovou smyčkou (angl. hairpin loop)^{7,8}. N-konec obsahuje velké množství (~20) cysteinových reziduí, které mohou tvořit síť disulfidových vazeb. Konkrétně 4 disulfidové vazby byly identifikovány jako důležité pro aktivaci a desenzitizaci kanálu – C666-C622, C666-C463, C622-C609, C666-C193 (číslováno podle myšního ortologu)⁹. Také lysinové postranní řetězce se nacházejí v blízkosti reaktivních cysteinů (mezi jinými K708) a hrají důležitou úlohu při aktivaci elektrofilu (např. allylisothiokyanát, AITC)¹⁰. Do nedávné doby nebylo zřejmé, jaký je molekulární mechanismus účinné kompetice elektrofilních látek o interakční místa TRPA1 s buněčnými antioxidanty, které chrání cytosolické proteiny před jejich toxickým působením. Ukazuje se, že elektrofilní agonisté interagují s cysteiny TRPA1 mnohem (6000×) rychleji, než je běžná rychlost reaktivity typických cysteinů a antioxidačních enzymů. Vysoká reaktivita C621 je podmínkou nutnou (nikoliv však postačující) pro aktivaci TRPA1 receptoru elektrofilu, přičemž tuto výjimečnou reaktivitu významně ovlivňuje sousedící K620¹¹. Je pravděpodobné, že také další cysteinová rezidua, situovaná mimo N-konec, přispívají k aktivaci kanálu, jelikož delecí celé N-koncové domény (Δ 1-688 hTRPA1) zůstává citlivost TRPA1 vůči elektrofilům zachována¹². N-konec je místem interakce receptoru s vápenatými ionty (Ca^{2+}). V oblasti ankyrinové repetice AR12 byla podrobně analyzována funkční úloha oblasti splňující konsensuální sekvenci tzv. EF-hand domény, jež je obecně charakteristickým místem vazby Ca^{2+} ^{13,14}. Mutace v této oblasti snížily nejen modulační účinky Ca^{2+} , ale také ovlivnily samotnou expresi a funkci TRPA1 kanálu¹⁵⁻¹⁷, což vedlo autory k závěru, že tato část N-koncové domény se spíše účastní alosterického převodu aktivačních podnětů a procesů interakce s cytoskeletem.

2.1.2 C-koncová oblast

Proximální část C-konce obsahuje vysoce konzervovaný helix orientovaný paralelně se spodním listem plazmatické membrány, zajišťující bezprostřední převod signálů do oblasti dolních vrátek kanálu (angl. gate). Úloha tohoto helixu je konzervovaná u všech TRP kanálů, proto je nazýván tento helix TRP-doména (vzhledem k nižší konzervovanosti primární sekvence TRPA1 také nazývaná TRP-like doména). Prodloužená intracelulární část centrálního póru TRPA1 kanálu je vytvářena střední částí C-konce, strukturou tzv. zavinité

cívky (angl. coiled-coil). Toto místo je důležité pro vazbu inositolhexakisfosfátu (Ins6P), které v interakci s N-koncem stabilizuje cytoplazmatickou část proteinového komplexu iontového kanálu. Na C-konci se nacházejí vazebná místa pro Zn^{2+} v podobě cysteinových a histidinových reziduí¹⁸. Proximální část C-konce navazující na TRP-doménu interaguje s kalmodulinem, který je navázán již při bazální intracelulární koncentraci vápenatých iontů a v závislosti na jejich extracelulární koncentraci reguluje aktivitu receptoru¹⁹. Systematické studie, jejichž cílem bylo zjistit funkční úlohu kladně nabitých aminokyselinových reziduí v proximální části C-konce, naznačují, že tato rezidua mohou interagovat s negativně nabitými částmi membránových fosfolipidů, zejména se signalizační molekulou fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátem (PIP₂)²⁰. Distální část C-konce obsahuje negativně nabitou doménu (S¹⁰⁷⁶ETEDDD), jež může vázat vápenaté ionty a regulovat aktivitu TRPA1 z místa relativně vzdáleného od transmembránové oblasti zajišťující otevírání/zavírání (vrátkování) iontového kanálu²¹.

2.1.3 Transmembránová oblast

Transmembránová oblast TRPA1 receptoru je tvořena šesti α -helixy (S1 – S6) spojenými extracelulárními a intracelulárními kličkami. Tuto část kanálu lze rozdělit na senzorovou část (S1 – S4) a část póru (S5 – S6), přičemž obě části jsou spojeny S4-S5 raménkem⁵. Transmembránové segmenty S5 a S6 spolu s raménkem obsahujícím dva krátké helixy P1 a P2 vytvářejí pór iontového kanálu, který umožňuje tok mono- a bivalentních kationtů včetně Ca^{2+} , v závislosti na daném elektrochemickém gradientu²². Pór kanálu obsahuje dvě zužující se místa (brány, angl. gate), která určují, zda a jaké budou kanálem procházet kationty. Horní brána póru je tvořena jedním reziduem – D915 v selektivním filtru mezi S5 a S6, spodní brána je v intracelulární části těsněna dvěma hydrofobními rezidui – I957 a V961 v S6 helixu, která zabraňují protékání rehydratovaných iontů⁵. Existuje zatím jen nepřímá experimentální evidence o možné úloze první extracelulární kličky S1-S2, jejíž dvě možné konformace byly navrženy jako součást mechanismu stabilizujícího otevření iontového kanálu při napěťově závislé aktivaci²³. Jiným místem, jehož konformační stavy se bezprostředně podílejí na vrátkování kanálu, je intracelulární oblast S4-S5 raménka. Spontánní mutace jediné aminokyseliny v S4-S5 oblasti byla identifikována jako příčina genetického onemocnění u člověka, které se vyznačuje tím, že je kanál aktivovaný i za fyziologických podmínek. Syndrom familiární epizodické bolesti (angl. familial episodic pain syndrome), jehož příčinou je záměna asparaginu N855 za serin, se projevuje bolestivou

reakcí na chlad při působení fyziologického stresu ²⁴. Za použití cílené mutagenese bylo prokázáno, že kladně a záporně nabitá rezidua v oblasti S4-S5 kriticky ovlivňují rovnováhu mezi zavřeným a otevřeným stavem kanálu a jejich neutralizace vede ke zvýšené citlivosti vůči vápenatým iontům procházejícím pórem iontového kanálu ¹⁷.

2.2 Aktivátory TRPA1 kanálu

TRPA1 funguje jako chemický nocisenzor (receptor bolesti) reagující na rozsáhlé množství chemických sloučenin – od dráždivých přírodních látek k polutantům ²⁵.

Na téma chemických aktivátorů TRPA1 bylo publikováno již nespočet přehledových článků, kde se autoři snažili vyjmenovat vždy část aktivátorů, ať už podle významnosti či množství informací, které jsou o jednotlivých aktivátorech k dispozici. Není předmětem této práce zde uvést vyčerpávající výčet jednotlivých agonistů TRPA1. Existuje však přehledná farmakologická databáze iontových kanálů a jejich aktivátorů, kterou spravují dvě společnosti – Mezinárodní unie základní a klinické farmakologie (IUPHAR) a Britská farmakologická společnost (BPS) ¹. Mimo souhrn hlavních farmakologicky významných aktivátorů také obsahuje četné odkazy na přehledové články pokrývající celou oblast TRPA1 agonistů.

Hlavními přímými aktivátory TRPA1 receptoru jsou:

- teplo/chlad,
- neelektrofilní/elektrofilní činidla,
- bivalentní kationty (Ca^{2+}),
- depolarizační membránový potenciál,
- mechanické a osmotické podněty.

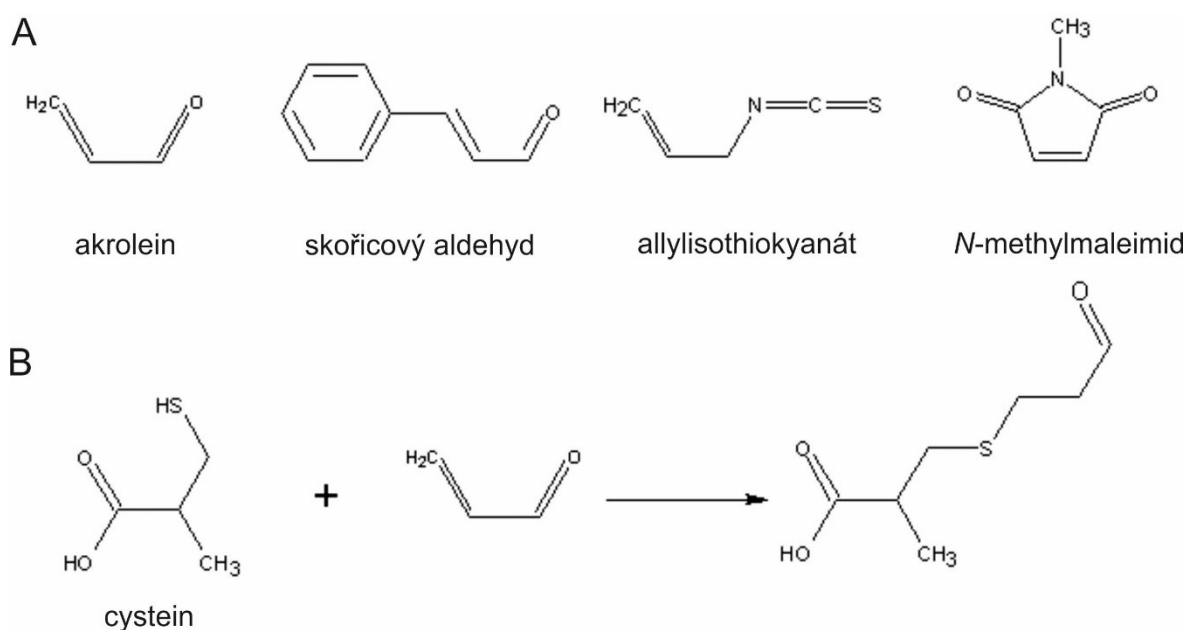
Jen menší část z těchto aktivátorů je specifická: TRPA1 kanál je aktivován látkami, které výrazně aktivují také jiné kanály TRP nadrodiny – (-)-menthol je například významným aktivátorem také TRPM8 a karvakrol účinně aktivuje TRPV3 ^{26,27}.

2.2.1 Aktivace TRPA1 elektrofilními činidly

Mnoho aktivátorů TRPA1 kanálu patří mezi elektrofilní látky. Bylo prokázáno, že mnohé z nich jsou schopné reagovat s thiolovými skupinami cysteinových reziduí, přičemž dochází ke kovalentní modifikaci. Mezi takové látky patří například skořicový aldehyd,

allylthiokyanát (AITC) vyskytující se v hořčičném oleji a wasabi, jodoacetamid či akrolein (obr.4A, str. 15) ²⁸. Cílenou mutací cysteinů za serin u myši byla identifikována tři cysteinová rezidua odpovědná za aktivaci kanálu těmito elektrofilny, a to C415, C422 a C622. Principem aktivace TRPA1 skořicovým aldehydem je tzv. Michaelova adice, tedy atakování α,β -nenasycené vazby merkapto-skupinami cysteinů (obr. 4B, str. 15) ²⁹. Adukt s thiolny vytváří také *N*-methylmaleimid (NMM). AITC reaguje kromě thiolových skupin také s aminoskupinami na N-konci (K708). Farmakologické experimenty a mutagenese určily další cysteinová rezidua zodpovědná za potenciaci TRPA1 elektrofilními činidly – C619, C639 a C663 ¹⁰.

Z hlediska fyziologické úlohy TRPA1 je důležité, že tento kanál je velmi citlivým senzorem pro kyslík, je aktivován jak nízkou, tak i vysokou hladinou kyslíku ve tkáních, přičemž vysoká hladina O₂ aktivuje TRPA1 prostřednictvím specifických cysteinových zbytků ³⁰.



Obrázek 4: Aktivace TRPA1 elektrofilními činidly. **A)** Výběr chemických agonistů aktivujících TRPA1: akrolein, skořicový aldehyd, allylthiokyanát či *N*-methylmaleimid. Jedná se často o látky vyvolávající palčivý vjem. **B)** Kovalentní modifikace cysteinu s akroleinem Michaelovou adicí. Jedná se o aktivaci TRPA1 napadnutím α,β -nenasycené vazby akroleinu merkapto-skupinou cysteinu.

2.2.2 Aktivace TRPA1 neelektrofilními činidly

Mezi neelektrofilní agonisty TRPA1 patří některé monoterpeny, například (-)-menthol, jehož vliv na TRPA1 je dvojitý – při velice nízkých koncentracích způsobuje aktivaci kanálu, naopak při vysokých koncentracích dochází k vratnému blokování³¹. Na základě funkčních studií chimér mezi myším a lidským ortologem bylo určeno 9 aminokyselinových reziduí v oblasti transmembránových domén 5 a 6, které jsou příčinou reaktivity (-)-mentholu, především pak V875 situovaný na S5²⁵. Dalším významným aktivujícím monoterpenem je karvakrol vyskytující se například v oreganu či tymiánu, který aktivuje TRPA1 a vyvolává charakteristickou palčivou chuť³².

Dvojitý efekt na aktivitu TRPA1 vykazuje také nikotin. Mutace důležitého místa pro atak elektrofilních látek C622 za serin nemá na potenciaci TRPA1 nikotinem vliv, což potvrzuje jeho neelektrofilní povahu³³.

Z farmakologického hlediska důležitým aktivátorem je Δ^9 -THC (delta-9-tetrahydrocannabinol), jenž je obsažen v konopí³⁴.

2.2.3 Teplotní aktivace TRPA1

TRPA1 receptor je teplotně aktivovaným TRP iontovým kanálem (obr. 1A, str. 9). Charakter teplotní aktivace je závislý na živočišném druhu. Zatímco u nižších živočichů je TRPA1 molekulárním detektorem teplot převyšujících fyziologický práh, u savců se TRPA1 pravděpodobně účastní detekce bolestivého chladu³⁵. Původní práce, které se jako první snažily objasnit teplotní citlivost TRPA1, dospěly ke kontroverzním nálezům. Dvě skupiny, které zkoušely chladovou citlivost na TRPA1 deficientních myších, poskytly dva odlišné výsledky. Zatímco TRPA1 deficientní myši jedné výzkumné skupiny neprokazovaly žádné změny v reakci na chlad³⁶, velmi podobně geneticky modifikované myši připravené jinou skupinou prokázaly citlivost na destičku vychlazenou na 0 °C i citlivost na aplikaci acetonu³⁷. Řada následných studií prokazovala protichůdné výsledky a možnými příčinami může být odlišnost experimentálních podmínek, různé výchozí kmeny experimentálních myší, možné sekundární působení intracelulárního Ca^{2+} , či přítomnost dalších chladově citlivých receptorů³⁵.

Úloha TRPA1 jako chladového senzoru byla jednoznačně prokázána v roce 2009, kdy byla fyziologickými technikami demonstrována přímá aktivace chladem nezávisle na koncentraci vápenatých iontů a behaviorálními přístupy prokázána úloha v detekci bolestivých chladových podnětů³⁸. Snaha lokalizovat centrum teplotní citlivosti na

molekulární úrovni taktéž vynesla rozdílná zjištění. Jedna skupina objevila 3 jednobodové mutace u myšího TRPA1, které způsobily citlivost receptoru na teplo, aniž by se ovlivnila jeho citlivost k chemickým agonistům. Všechny tři mutace jsou lokalizovány na ankyrinové repetici 6 (S250 za aspartát, M258 za leucin a D261 za glycin)³⁹. Jiná studie lokalizovala reziduum zodpovědné za chladovou odpověď v S5 transmembránovém segmentu (G878) ve vnitřní oblasti póru za využití chimér potkaního a lidského TRPA1⁴⁰. Je pozoruhodné, že chladová citlivost je zachována u TRPA1 kanálu po delecii N-konce (Δ 1-688 hTRPA1)¹².

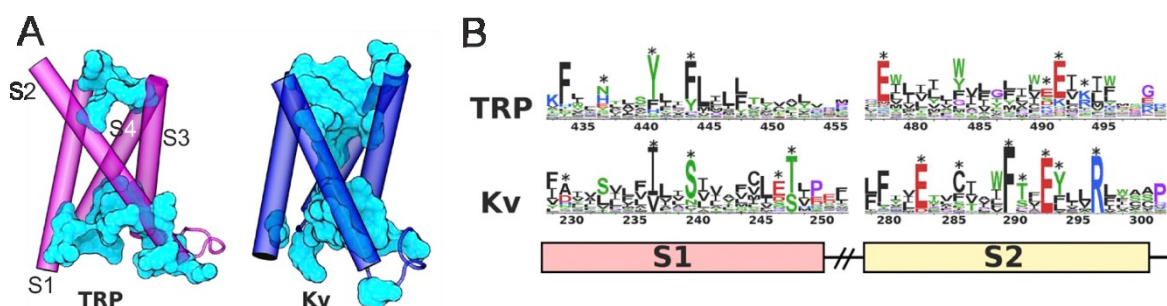
Molekulární podstata teplotní aktivace TRP receptorů i fyziologická úloha TRPA1 v detekci teplotních podnětů jsou v současné době předmětem intenzivního studia; strukturní domény, které zodpovídají za specifickou citlivost TRPA1, nejsou dosud známé a experimentální část této bakalářské práce se pokouší k jejich poznání přispět.

2.3 Úloha sensorové domény TRPA1

Porovnání primární sekvence všech TRP kanálů odhaluje značnou konzervovanost v oblasti póru (S5-P-S6). Z evolučního hlediska tak byl zřejmě optimalizován specifický, rychlý a selektivní transport iontů mezi intracelulárním a extracelulárním prostředím buněk. Naproti tomu sensorové domény S1-S4, jež obklopují centrální pórovou doménu, vykazují nižší homologii a pravděpodobně tak určují specifické a jedinečné funkční vlastnosti TRP kanálů⁴¹.

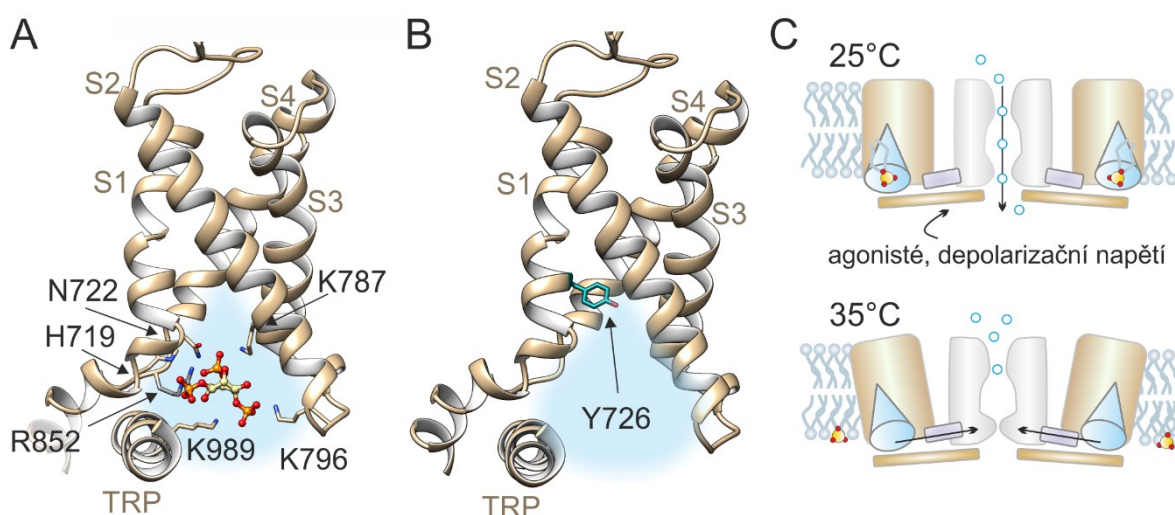
TRP kanály mají podobné topologické uspořádání jako napětově řízené draslíkové kanály (Kv), liší se však především v oblasti senzoru (obr. 5A a B, str. 18). Charakteristická napětěová citlivost Kv kanálů je určena čtyřmi konzervovanými argininovými rezidui pravidelně umístěnými na každé třetí pozici 4. transmembránového segmentu S4. Změny membránového potenciálu způsobí pohyb této domény v elektrickém poli a následné konformační změny v oblasti póru. Pohyb S4 v sensorové doméně Kv kanálů je zajištěn dalšími polárními rezidui, která vytvářejí dvě hydratované štěrbinu, sensor je hydratován na extracelulární i intracelulární straně a napomáhá tak účinnému převodu změn membránového napětí. Naproti tomu S4 segment TRP kanálů neobsahuje kladně nabitě postranní řetězce, sensor na intracelulární straně vytváří větší hydratovanou štěrbinu a na vnější straně membrány obsahuje hydrofobní aromatická rezidua⁴¹. Tato „hydratační nesymetrie“ je zřejmě jednou z příčin jen slabé napětěové citlivosti TRP kanálů.

Intracelulární oblast TRPA1 senzoru je hlavním regulačním místem kanálu, kde jsou integrovány aktivační podněty z celého proteinového komplexu ²³. S přibývajícím množstvím rozlišených struktur TRP kanálů existuje stále více důkazů podporujících hypotézu, že tato část senzoru je také místem regulace membránovými fosfolipidy. Kavita senzoru je z intracelulární části ohraničena tzv. pre-S1 oblastí, která zajišťuje spojení ARD a transmembránové domény a obsahuje interakční místa pro elektrofilní agonisty. Tato oblast je vytvářena pre-S1 helixem a raménkem, které se nachází mezi dalšími funkčně důležitými oblastmi tohoto kanálu – TRP-like doménou a třemi β -skládanými listy (dva jsou poskytovány raménkem z pre-S1 oblasti a jeden β -skládaný list oblastí za TRP-like doménou). Všechny tyto části jsou propojeny četnými hydrofobními interakcemi. Třetí β -skládaný list je propojen také se strukturně špatně rozeznávaným α -helixem, který může spojit TRP-like doménu a část C-konce. TRP-like doména navíc interaguje také s S4-S5 raménkem. Je zjevné, že tato velmi komplexní oblast hraje klíčovou roli při regulaci otevírání a zavírání kanálu, jelikož poskytuje propojení všech částí TRPA1 kanálu – tedy transmembránové domény a N- i C-koncové oblasti ⁵.



Obrázek 5: Schematické porovnání struktury senzoru TRP kanálů a napětím řízených draslíkových Kv kanálů. **A)** Průměrná polarita senzoru TRP a Kv kanálů vypočtena na základě biologické škály hydrofobicity aminokyselin statisticky očekávaných na dané pozici. Pozice s průměrnou polaritou >1.0 kcal/mol (o něco více polární, než serin) jsou vyznačeny modrým povrchem. Patrná je asymetrie solvatace senzoru TRP kanálů, která je omezena na jeho vnitřní část a shora ohraničena hydrofobními rezidui. **B)** Sekvenční logo vyjadřující míru konzervovanosti 1. a 2. transmembránových segmentů v rámci dané skupiny kanálů. Hvězdička označuje rezidua s vysokou relativní entropií, tj. vysoce konzervovaná. Číslováno podle potkaního TRPV1 a Shaker Kv. Homologní pozice tyrosinu 441 (isoleucinu 237 u Kv) odpovídá tyrosinu 726 u lidského TRPA1. Upraveno podle ⁴¹.

V laboratoři, kde vznikla tato bakalářská práce, bylo v nedávné době experimentálně prokázáno, že vnitřní oblast senzoru může interagovat s fosfátovou skupinou fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu a alostericky ovlivňovat pravděpodobnost otevření kanálu při aktivaci chemickými, napět'ovými a teplotními podněty²³ (obr. 6A, str. 19). Jako jedno z možných míst důležitých pro interakci byl charakterizován konzervovaný tyrosin uvnitř senzoru (obr. 6A a B, str. 19). Úloha sensorové domény v teplotní citlivosti TRPA1 nebyla dosud prozkoumána. Vzhledem k tomu, že interakce s membránovými fosfolipidy může představovat jeden z možných mechanismů specifické teplotní citlivosti TRP kanálů⁴² (obr. 6C, str. 19), předložená práce se zaměřuje na otázku, do jaké míry může specifická mutace v senzoru ovlivnit teplotní citlivost TRPA1 při aktivaci napět'ovými a chemických podněty.



Obrázek 6: *A) Vnitřní oblast senzoru TRPA1 může interagovat s fosfátovou skupinou fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu a alostericky ovlivňovat pravděpodobnost otevření kanálu při aktivaci chemickými a napět'ovými podněty²³. B) Funkční úloha konzervovaného tyrosinu v teplotní aktivaci TRP receptorů není zatím známa. C) Schematicky znázorněná hypotéza o úloze fosfolipidů v teplotní aktivaci TRP kanálů. Upraveno podle⁴². Zvýšení teploty urychluje disociaci fosfolipidu a mění aktivační energii kanálu.*

3. Cíle práce

Předložená bakalářská práce si klade za cíl přispět k objasnění některých mechanismů, které se uplatňují při aktivaci a modulaci ankyrinového receptoru TRPA1 chemickými a teplotními podněty. Práce má za cíl uvést nové výsledky týkající se souvislosti aktivace TRPA1 receptoru zvýšením okolní teploty s předpokládanou modulací membránovými fosfolipidy a pokusit se interpretovat tyto nálezy v kontextu současných představ o molekulární podstatě těchto dějů.

Bakalářská práce se zabývá řešením ústřední experimentální otázky:

- Pomocí bodové mutace a elektrofyziologických technik určit funkční/strukturní úlohu konzervovaného aminokyselinového zbytku Y726 ve vnitřní kavitě sensorové domény TRPA1 receptoru, která podle současných poznatků tvoří jedno z možných interakčních míst pro membránové fosfolipidy. Pomocí biochemických technik určit, do jaké míry mohou být pozorované funkční důsledky mutace důsledkem změněné exprese receptoru.

Pro zodpovězení této otázky je nezbytné řešení následujících dílčích experimentálních úkolů:

- Pomocí elektrofyziologických technik charakterizovat časový průběh aktivace lidského rekombinantního TRPA1 receptoru exprimovaného v HEK293T buňkách ve vztahu ke změnám membránového potenciálu.
- Určit, do jaké míry se uplatňuje vliv modulace TRPA1 napětím při aktivaci chemickými a teplotními podněty. Stanovit protokol a hlavní parametry těchto dějů, na které se zaměří další strukturně-funkční analýza.
 - Stanovit účinek zvýšení teploty o 10 °C na membránové proudy vyvolané aktivací TRPA1 neelektrofilním agonistou (karvakolem) na kladných a negativních membránových potenciálech.
- Stanovit, do jaké míry může být funkční/strukturní úloha vysoce konzervovaného tyrosinu Y726 v regulaci vrátkování a napěťové citlivosti sdílena jinými teplotně aktivovanými receptory (např. TRPM3). Navrhnout

možný strukturně-funkční převod teplotního podnětu na molekulární úrovni do vrátkovací oblasti.

4. Materiál a metody

4.1 Chemikálie

- **Sigma-Aldrich, USA:** NaCl, KCl, MgCl₂, CsOH, NaOH, β-merkapt ethanol, glukóza, kanamycin sulfát, ampicilin, poly-L-lysin, kolagen, kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová (HEPES), kyselina ethylenglykoltetraoctová (EGTA), kyselina ethylendiaminoctová (EDTA), agarosa, Trizma base, triton X-100, karvakrol, pregnenolon sulfát, jodoacetamid, ethylmorfolin, Tris(2-karboxyethyl)fosfin chlorid (TCEP)
- **Life Technologies, USA:** barvivo SYBR®Safe DNA Gel stain, OPTI-MEM I médium
- **Agilent Technologies, USA:** QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit, polymerasa PfuUltra
- **Geneaid Biotech, USA:** High Speed Plasmid Mini Kit, 10kB DNA Ladder, Loading Dye
- **Macherey-Nagel, SRN:** NucleoBond® Xtra Maxi Plus
- **IBA GmbH, SRN:** transfekční činidlo „Magnet-assisted Transfection (MATra)“
- **Invitrogen, USA:** SDS Loading Buffer
- **SERVA Electrophoresis GmbH, SRN:** pepton z kaseinu, extrakt z kvasinek
- **Thermo Fisher Scientific, USA:** Protein A/G UltraLink® Resin, Pierce™ Protease and Phosphatase Inhibitor mini tablets, EDTA-free, lipofektamin 2000, PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder
- **Merck, SRN:** H₂O, acetonitril
- **Applied Biosystems, USA:** chromatografický nosič Oligo R3
- **Bruker Daltonics, USA:** α-kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (α-HCCA), Pepmix II
- **Biolife, IT:** Živný agar N°2
- **Penta, CZ:** isopropanol, ethanol

4.2 Biologický materiál

- lidské embryonální ledvinné buňky linie 293T (HEK293T) (LGC Standards, VB)
- kompetentní bakteriální buňky XL10-Gold kmene *E. coli* (Agilent Technologies, USA)
- cDNA hTRPA1 ve vektoru pCMV6-XL4 (OriGene, USA)

- cDNA mTRPM3 ve vektoru pCMV6 Entry (OriGene, USA)
- cDNA hTRPA1-tGFP ve vektoru pCMV6-AC-GFP (OriGene, USA)
- plazmid pro zelený fluorescenční protein ve vektoru pQBI 25 (TaKaRa)
- fetální bovinní sérum (FBS, PAN Biotech GmbH)
- anti-tGFP monoklonální protilátka (OriGene, USA)

4.3 Přístroje

- Zesilovač *Axopatch 200B* (Axon Instruments)
- Invertovaný mikroskop *CKX41* (Olympus)
- Mikromanipulátor *MP-225* (Sutter Instrument)
- Aplikační systém *Was 02*
- Horizontální tahač elektrod *P-1000* (Sutter Instruments Co.)
- Microforge *MF-830* (Narishige)
- Laminární box *VBH C2 (Steril)* (Schoeller Instruments)
- Inkubátor *MCO-36AIC* (Sanyo)
- Autokláv *Sanyo MAC 235EX* (Sanyo)
- Osmometr *Vapro* (Wescor)
- pH metr *Orion Star A111 pH Meter* (Thermo Scientific)
- Magnetická míchačka s ohřevem *Heidolph MR Hei-Tec* (Heidolph Instruments GmbH)
- Centrifuga *Rotilas-mini centrifuge* (Carl Roth GmbH)
- Centrifuga *Mikro 120* (Hettich Zentrifugen)
- Centrifuga *Rotanta 460R* (Hettich Zentrifugen)
- Spektrofotometr *NanoDrop 1000* (NanoDrop Technologies)
- Rotační inkubátor *Shaking Incubator NB-205* (N-Biotek)
- Termocycler *Mastercycler personal* (Eppendorf)
- Rotační inkubátor *Gallenkamp IOX400.XX2.C* (Sanyo)
- Vortex *Wizard Advanced IR Vortex Mixer* (VELP Scientifica)
- Vortex *MS 2 Minishaker* (IKA)
- Automatické pipety (Wilson, Nichipet EX)
- Hmotnostní spektrometr *UltraFlexIII®* (Bruker Daltonics)
- Vysokokapacitní koncentrátor *SavantTM SpeedVacTM* (Thermo Scientific)
- Ultrazvukový čistič *Elmasonic S30H* (Elma Schmidbauer GmbH)

- Elektroforetické zařízení *SE260 Mighty Small II Deluxe Mini Vertical Protein Electrophoresis Unit* (Hofer®)
- Elektroforetické zařízení *Consort Mini Electrophoresis Power Supply E143* (Sigma-Aldrich)

4.4 Roztoky

Roztoky použité pro elektrofyziologickou techniku patch-clamp

Extracelulární roztok: 140mM NaCl, 5mM KCl, 2mM MgCl₂, 5mM EGTA, 10mM HEPES, 10mM glukóza, pH 7,4 (upraveno NaOH), osmolalita 300 mmol.kg⁻¹

Intracelulární roztok: 140mM KCl, 2mM MgCl₂, 5mM EGTA, 10mM HEPES, pH 7,4 (upraveno CsOH), osmolalita 278 mmol.kg⁻¹

Roztoky použité při kultivaci buněk

Fosfátový pufr (PBS): 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 1,47mM KH₂PO₄, 4,3mM Na₂HPO₄, pH 7,3 (upraveno NaOH)

Versenův roztok: PBS, 0,68mM EDTA a 87μM trypsin, pH 7,3

LB médium (angl. lysogeny broth medium): 1% (w/v) pepton, 0,5% (w/v) extrakt z kvasinek, 0,26M NaCl

Roztoky použité pro horizontální a SDS-PAGE elektroforézu

TAE pufr: 2M Trizma base, 1M kyselina octová, 50mM EDTA, 50× ředěn

SDS-PAGE: TrisGlycin (pH 8,1), 10% (v/v) SDS

Lyzační pufr: 50mM HEPES, 1% (v/v) Triton X-100, 50mM NaCl

Roztoky použité na barvení polyakrylamidového gelu pomocí AgNO₃ a MS analýzy

Fixační roztok: 40% (v/v) ethanol, 10% (v/v) octová kyselina

Senzitizační roztok: 30% (v/v) ethanol, 0,006% (w/v) eriochromčern T

Roztok obsahující Ag⁺: 0,25% (w/v) AgNO₃, 0,037% (v/v) formaldehyd

Vyvíjecí roztok: 2% (w/v) K₂CO₃, 0,04% (w/v) NaOH, 0,007% (w/v) Na₂S₂O₃, 0,007% (v/v) formaldehyd

Odbarvovací roztok: 30mM K₃[Fe(CN)₆], 100mM Na₂S₂O₃

Štěpící pufr: 50mM ethylmorfolin (pH 8,1), 10% (v/v) acetonitril

4.5 Postup práce

4.5.1 Příprava mutace Y726F pomocí polymerázové řetězové reakce

Pro záměnu tyrosinu za fenylalanin (mutace Y726F pro TRPA1 receptor a mutace Y882F pro TRPM3 receptor) byla použita metoda polymerázové řetězové reakce (angl. polymerase chain reaction, PCR) za použití vhodně navržených primerů.

TRPA1-Y726F

Sense: 5'-GAATTTAGGATCTTTCTGTCTTGGTC-3'

Antisense: 5'-GACCAAGACAGAAAGATCCTAAATTC-3'

TRPM3-Y882F

Sense: 5'-CTACACTCTGGCGTTTATTGGATACCTGATG-3'

Antisense: 5'-CATCAGGTATCCAATAAACGCCAGAGTGTAG-3'

Složení reakční směsi pro PCR o celkovém objemu 50 μ l je uvedeno v Tabulce 1 (str. 25).

Tabulka 1: Složení reakční směsi pro PCR

Chemikálie	Objem [μ l]
cDNA hTRPA1 (80 mg/l)	1
cDNA mTRPM3 (80 mg/l)	1
primer sense (20 μ M)	1,2
primer antisense (20 μ M)	1,25
Buffer 10x	5
Quick Solution	3
dNTPs (10 mM)	1
destilovaná voda	36,5
polymeráza PfuUltra	1

Směs byla umístěna do termocycleru (zařízení pro provedení PCR). Teplota nasednutí primerů byla zvolena na 55 °C u mutace Y726F-TRPA1 a 51 °C u mutace Y882F-TRPM3. Cyklus PCR byl opakován 25 \times (protokol viz Tabulka 2, str. 26), reakce probíhaly přes noc a po dokončení reakcí byl ke směsi přidán 1 μ l dPN1 endonukleasy pro rozštěpení mateřské DNA. Následně byla směs inkubována v termostatu na 37 °C po dobu jedné hodiny.

Tabulka 2: Protokoly použité pro PCR u hTRPA1 a mTRPM3

krok	hTRPA1		mTRPM3	
1.	95 °C	3 min	95 °C	1 min
2.-4. ×25	95 °C	30 s	95 °C	50 s
	51 °C	45 s	55 °C	50 s
	68 °C	25 min	68 °C	16 min
5.	68 °C	20 min	68 °C	10 min
6.	4 °C	nekonečno	4 °C	nekonečno

4.5.2 Ověření produktů PCR pomocí horizontální elektroforézy

Přítomnost produktů PCR v reakční směsi byla následně ověřena pomocí horizontální elektroforézy. Nejprve byl připraven 1% (w/v) agarosový gel smícháním 0,3 g agarosu s 600 μ l Tris-acetát-EDTA pufrem (TAE) a 29,4 ml destilované vody. Agarosa ve směsi byla rozpuštěna zahřátím v mikrovlnné troubě a po ochlazení k ní bylo přidáno 20 μ l 10 000 \times SYBR Safe barviva. Směs na gel byla přelita do elektroforetické vaničky, poté byl vložen hřeben pro vytvoření drah a gel byl ponechán v klidu, aby zatuhnul. Po ztuhnutí byl hřeben vyjmut, ztuhlý gel byl umístěn do elektroforetické aparatury a zalit 1 \times TAE pufrem. Do první dráhy byla pipetována nejprve směs 1 μ l standardu molekulové hmotnosti s 2 μ l barviva Gel pilot loading dye a do zbylých drah směs 5 μ l produktu PCR s 2 μ l barviva Gel pilot loading dye. Elektroforéza probíhala při 90 V asi 50 minut, než čelo elektroforézy doputovalo přibližně 1 cm od spodního okraje gelu. Výsledné rozdělení DNA na gelu bylo zviditelněno pomocí UV lampy.

4.5.3 Transformace XL10-Gold ultrakompetentních buněk *E. coli* teplotním šokem

Amplifikovanou DNA získanou pomocí PCR byly transformovány ultrakompetentní buňky *E. coli* XL10-Gold metodou teplotního šoku. Na ledu byly k 30 μ l buněk přidány 2 μ l β -merkapt ethanolu, směs se za občasného míchání inkubovala na ledu 10 minut. Následně byly k buňkám přidány 2 μ l PCR produktu, směs byla zamíchána a inkubována na ledu 30 minut. Teplotní šok byl proveden ponořením zkumavky se směsí na 45 s do vodní lázně předehřáté na 42 °C a následným navrácením zpět na led na 2 minuty. Ke směsi bylo poté přidáno 200 μ l kultivačního média (angl. lysogeny broth, LB) předehřátého na 37 °C a výsledná směs se inkubovala 1 hodinu za stálého míchání při 37 °C (230 RPM).

Celý objem reakční směsi byl nanesen na agarovou plotnu s ampicilinem (Amp) o finální koncentraci 100 mg/l (v případě TRPA1 kódujícího plazmidu) nebo kanamycinem o finální koncentraci 50 mg/l (v případě TRPM3 kódujícího plazmidu) a pomocí hokejky řádně rozetřen. Takto připravené agarové plotny byly ponechány 16 h v převrácené poloze v inkubátoru (37 °C, 5% CO₂). Po uplynutí inkubační doby a dostatečném nárůstu bakteriálních kolonií byly plotny zabezpečeny parafilmem a uchovávány v lednici.

4.5.4 Amplifikace a izolace připravené plazmidové DNA

Pro amplifikaci bakteriálních buněk s vnesenou plazmidovou DNA byla z agarové plotny vybrána jedna samostatná kolonie, která byla seškrábnuta špičkou. Do 14ml zkumavky s 6 ml LB média s ampicilinem (finální koncentrace 100mg/l) nebo kanamycinem (finální koncentrace 50 mg/l) byla inokulována jedna vybraná kolonie. Bakterie byly inkubovány na třepačce 16 h (37 °C, 230 RPM).

Izolace plazmidové DNA byla provedena za použití komerčně dodaného kitu „High Speed Plasmid Mini Kit“. Obsah zkumavky byl centrifugován (13 000× g, 25 °C), supernatant byl odstraněn a peleta byla resuspendována ve 200 µl pufru PD1, poté byl celý objem převeden do mikrozkušavky. K roztoku bylo přidáno 200 µl pufru PD2, obsah ve zkumavkách byl promíchán 10× opatrným překlopením a ponechán 2 minuty inkubovat. Ke směsi bylo přidáno 300 µl pufru PD3 a obsah byl opět 10× promíchán pomalým otáčením. Směs byla centrifugována po dobu 3 minut pro odstředění vzniklé sraženiny. Supernatant byl převeden do mikrokolony (*PD Column*) nad zkumavkou, směs byla centrifugována 60 s a retenát byl odebrán. Mikrokolona byla promyta 400 µl pufru W1 a poté 600 µl pufru Wash Buffer. Pokaždé byla směs centrifugována 60 s a retenát odebrán. Poté byla zkumavka společně s mikrokolonou centrifugována bez přídavku pufru po dobu 3 minut a retenát byl opět odstraněn. Mikrokolona byla umístěna do nové zkumavky a do jejího středu bylo aplikováno 50 µl pufru Elution Buffer. Po 2 minutách eluce byla kapalina s DNA odstředována z mikrokolony centrifugací po dobu 2 minut.

Koncentrace izolované DNA byla změřena na spektrofotometru *NanoDrop 1000* při vlnové délce 260 nm. Výsledný plazmidový produkt byl ověřen sekvenací fitmou GATC Biotech, SRN.

4.5.5 Transfekce HEK293T buněk izolovaným plazmidem

Plazmid kódující přirozený typ (angl. wild type, WT) kanálu TRPA1 nebo TRPM3, anebo pozměněný pomocí cílené mutagenese TRPA1 (Y726F) nebo TRPM3 (Y882F) byl vložen do lidských embryonálních buněk linie 293T (HEK293T), které byly kultivovány v médiu OPTI-MEM s 5% (v/v) fetálním bovinním sérem (angl. fetal bovine serum, FBS) na miskách pokrytých poly-L-lysinem. Pro transfekci byla připravena směs 400 ng DNA, 200 ng plazmidu kódující zelený fluorescenční protein (angl. green fluorescent protein, GFP) a 0,8 µl komerčních nanočástic MATra v 50 µl OPTI-MEMu. Směs byla promíchána pomocí vortexu, inkubována 20 minut a poté přidána na buňky rostoucí v jamce potažené kolagenem a poly-L-lysinem. Buňky byly poté uloženy na permanentní magnet na 20 minut do inkubačního boxu (37 °C, 5% CO₂). Po inkubaci byly buňky promyty 1 ml fosfátového pufru (angl. phosphate buffered saline, PBS) a uvolněny ze dna jamky pomocí Versenova roztoku obsahujícího trypsin. Do nových místiček se sklíčky pokrytými poly-L-lysinem a kolagenem byly napipetovány 2 ml 5% (v/v) FBS v OPTI-MEMu. Následně byly buňky resuspendovány v 0,8 ml 5% (v/v) FBS v OPTI-MEMu a 1 až 2 kapky buněčné suspenze byly převedeny na sklíčka. Pasážované buňky byly inkubovány 1-2 dny.

4.5.6 Příprava proteinového produktu pro hmotnostní spektrometrii

Pro experimenty související s přípravou proteinu pro hmotnostní spektrometrii jsme pracovali s fúzním proteinem TRPA1 receptoru a proteinem turbo GFP, připojeným na karboxylový konec (WT TRPA1-tGFP).

Pro izolaci TRPA1 bylo nutné nejprve pomocí PCR reakce připravit plazmid kódující mutantní konstrukt značeného TRPA1 receptoru (Y726F TRPA1-tGFP). Následně byly buňky *E. coli* XL10-Gold transformovány metodou teplotního šoku podobně jako v kap. 4.4.3., odchylkou od zmíněného protokolu je použití 100 ng DNA. Po teplotním šoku byly buňky převedeny do 5 ml LB média a inkubovány 1 hodinu ve 37 °C. Do 21 Erlenmeyerových baněk bylo přidáno 300 ml předehřátého LB média s Amp o finální koncentraci 100 mg/l a 5 ml buněčné suspenze po inkubaci. Směs v baňkách se poté nechala inkubovat přes noc ve třepačce (37 °C, 230 RPM). Druhý den byl obsah Erlenmeyerových baněk centrifugován v 5ml zkumavkách s plastovým víčkem (4 °C, 4700× g), supernatant byl odstraněn a z bakteriální pelety byl následně izolován plazmid metodou maxiprep. Přirozený typ značeného TRPA1 receptoru byl amplifikován a izolován stejným způsobem.

Plazmidová DNA byla izolována pomocí komerčně dodaného kitu „NucleoBond® Xtra Maxi Plus“. Nejprve byla peleta použitím vortexu resuspendována ve 12 ml pufru Resuspension Buffer RES + RNase A do úplného rozpuštění. K suspenzi pak bylo přidáno 12 ml lyzačního pufru Lysis Buffer LYS, obsah byl 5× promíchán převrácením zkumavky a inkubován 5 minut za laboratorní teploty. Dále byla ekvilibrována papírová kolona 25 ml pufru Equilibration Buffer EQU napipetováním pufru po obvodu horního okraje kolony. Suspenze ve zkumavkách byla neutralizována přidáním 12 ml Neutralization Buffer NEU a obsah byl 15× promíchán převrácením zkumavky. Ihned poté byl obsah zkumavky opatrně nanesen na kolonu pomocí gravitace. Napipetováním 15 ml pufru Equilibration Buffer EQU byl filtr nad kolonou promyt a poté vyjmut z nástavce a vyhozen. Kolona byla poté promyta 25 ml pufru Wash Buffer WASH. DNA byla eluována 25 ml Elution Buffer ELU do 50ml zkumavky. K eluátu bylo poté přidáno 17,5 ml isopropanolu o pokojové teplotě, směs byla vortexována a inkubována 2 minuty. Poté byla směs zakoncentrována za použití filtru NucleoBond® Finalizers. Směs byla pomocí stříkačky protlačena filtrem tak, aby protékala kapka za kapkou. Poté byl filtr promyt stejným způsobem 5 ml 70% (v/v) ethanolu a následně byl vysušen 6× protlačením vzduchu ze stříkačky. DNA byla velmi opatrně eluována 800 µl pufru Redissolving Buffer TRIS do 1,5ml mikrozkušavky. Poté byl eluát opět nasán do stříkačky a protlačen filtrem. Konečným protlačením vzduchu přes filtr byl do mikrozkušavky protlačen poslední zbytek eluátu.

Pro každý plazmid (WT TRPA1-tGFP, Y726F TRPA1-tGFP) byly vypěstovány HEK293T buňky ve dvou kultivačních lahvích (T75 flask). Živné médium bylo odstraněno, do každé kultivační lahve byly přidány 2 ml média OPTI-MEM předeřhřátého na 37 °C a 12 ng DNA a obsah byl promíchán jemným kroužením na desce stolu. Poté se buňky 5 minut inkubovaly (37 °C, 5% CO₂). Do každé lahve byly přidány 2 ml směsi OPTI-MEM s 30 µl lipofektaminu a směs byla řádně promíchána. Buňky se poté inkubovaly 20 minut při pokojové teplotě. Médium bylo poté opatrně odstraněno a buňky byly opatrně propláchnuty PBS. Na buňky byl přidán trypsin a 10% (v/v) FBS médium. Buňky uvolněné z každé kultivační lahve byly rozděleny rovnoměrně mezi nové dvě sterilní lahve a jejich objem byl doplněn 10% (v/v) FBS médiem do objemu 15 ml. Takto připravené buňky se inkubovaly 48 hodin.

Proteiny z buněk byly izolovány za použití myši monoklonální protilátky proti tGFP (Anti-turboGFP Monoclonal Antibody), která může být selektivně a efektivně vázána proteiny A/G imobilizovanými na polyakrylamidových kuličkách (Protein A/G UltraLink®

Resin). Všechny následující kroky probíhaly na ledu. Nejprve bylo z kultivačních lahví odstraněno FBS médium a napipetováno asi 10 ml PBS, buňky byly jemně promyty krouživým pohybem a poté byl pufr odstraněn. Poté byl do lahví přidán 1 ml lyzačního pufru s inhibítorem proteáz a fosfatáz (PI, 1 tableta na 10 ml roztoku). Buňky byly mechanicky sklizeny ze stěn lahve a buněčná suspenze byla převedena pipetou do mikrozkušavky. Obsah zkumavek byl poté inkubován v chladové místnosti (6 °C) 45 minut na třepačce (230 RPM). Poté byla suspenze odstředěna 15 minut v centrifuze (14 000× g, 4 °C) a supernatant byl převeden do nových vychlazených mikrozkušavek. Do 5ml kyvet byly převedeny směsné vzorky dvou mikrozkušavek s WT a dvou mikrozkušavek s Y726F a od obou vzniklých vzorků bylo odebráno 20 µl jako kontrolní vzorek před přidáním protilátky. Ke směsným vzorkům bylo poté přidáno 10 µl myší monoklonální protilátky proti tGFP a zkumavky byly inkubovány přes noc v chladové místnosti (6 °C) přes noc na kývačce.

Další den byly pro každý vzorek připraveny dvě mikrozkušavky s polyakrylamidovými kuličkami. Ve všech krocích mimo centrifugace byly zkumavky ponechány na ledu. Do každé zkumavky bylo přidáno 30 µl kuliček, které byly následně 4× promyty 1 ml lyzačního pufru a obsah zkumavek byl vortexován, poté odstředěn 1 minutu (2380× g) a supernatant byl odstraněn. Po promytí bylo ke kuličkám přidáno 30 µl lyzačního pufru (poměr proteinových kuliček a lyzačního pufru – 1:1) a obsah zkumavek se vzorky byl rovnoměrně přidán do mikrozkušavek s kuličkami. Vzorky byly poté inkubovány 2 hodiny v chladové místnosti (6 °C) na třepačce (230 RPM), aby se protein navázal na protilátku. Po inkubaci byl obsah zkumavek odstředěn 1 minutu (2380× g) a supernatant byl odstraněn. Vzorek byl následně 4× promyt lyzačním pufrům bez Tritonu X-100 ve směsi s PI. Ke vzorku byl přidán 1 ml směsi pufru a inhibítora, zkumavka byla promíchána překlápěním po dobu 3 minut a poté opět odstředěna za stejných podmínek uvedených výše. Pro každý vzorek byly směsi lyzátu a kuliček slity do jedné mikrozkušavky, supernatant po posledním odstředění byl opatrně odstraněn a takto připravené vzorky byly uloženy při -80 °C.

4.5.7 Ověření proteinového produktu pomocí hmotnostní spektrometrie

Pro získání co nejčistšího vzorku proteinu pro analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie (angl. mass spectrometry, MS) byly izolované proteiny separovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Nejprve byly pro elektroforézu připraveny purifikované vzorky

proteinů (WT1, Y726F1) a kontroly z buněčného lyzátu před přidáním protilátky (WT_{cl}, Y726F_{cl}). Ke 20 µl kontrolních vzorků bylo přidáno 5 µl vzorkového pufru (4× Sample Buffer + 10 µl β-merkaptoethanolu). Ke vzorkům purifikovaných proteinů s proteinovými kuličkami bylo přidáno 80 µl destilované vody a 20 µl vzorkového pufru (5× SDS Loading Buffer) a všechny vzorky spolu se samotným vzorkovým pufrem byly po dobu 5 minut inkubovány při 95 °C. Do drah 8% (v/v) polyakrylamidového gelu byly vzorky pipetovány podle následující Tabulky 3.

Tabulka 3: Pořadí a objem vzorků aplikovaných na polyakrylamidový gel

Standard	-	WT _{cl}	-	Y726F _{cl}	-	WT1	-	Y726F1
3 µl	-	20 µl	-	20 µl	-	20 µl	-	20 µl

*- redukující vzorkový pufr (25 µl) ve volných drahách

SDS elektroforéza probíhala asi 50 minut při omezujících hodnotách proudu 20 mA/gel a napětí 180 V.

Po skončení elektroforézy byly rozdělené proteiny v gelu vizualizovány metodou barvení stříbrem. Nejprve byl gel omýván 2× 60 minut ve fixačním roztoku, následně promyt 50% (v/v) ethanolem 3× 5 minut, dále 2 minuty promýván v senzitivizačním roztoku eriochromčerni T a další 2 minuty v 36% (v/v) ethanolu. Poté byl gel promyt 2× 2 minuty destilovanou vodou a obarven roztokem AgNO₃ po dobu asi 5 minut. Gel byl promyt 2× 20 vteřin destilovanou vodou a poté vybarven několik minut ve vyvíjecím roztoku. První barvení nedostatečně vizualizovalo proteiny na gelu, proto byl gel odbarven promýváním odbarvovacím roztokem do úplného vymizení zviditelněných proužků a poté promyt 5× 5 minut destilovanou vodou. Poté byl barvicí proces zopakován. Při druhém vyvíjení se gel dostatečně obarvil již po 2 minutách. Vyvíjení bylo zastaveno 1,5% (w/v) roztokem EDTA, Triplex III promýváním po dobu asi 10 minut. Poté byl gel převeden do destilované vody.

Nejprve byly z gelu vyříznuty proužky o předpokládané molekulové hmotnosti hledaného konstruktu (WT TRPA1-tGFP, Y726F TRPA1-tGFP). Z gelu WT i Y726F byly z oblasti okolo 155 kDa vyříznuty 2 proužky pro identifikaci přítomnosti stanovovaného proteinu metodou hmotnostní spektrometrie. Vyříznuté proužky byly ostrým skalpelem nakrájeny na asi 1 mm kostičky, které byly převedeny do mikrozkušavek. Ke každému vzorku bylo přidáno 60 µl výše uvedeného odbarvovacího roztoku, směs byla promíchávána do úplného odbavení. Poté se vzorky promyly 5× 100 µl destilované vody několikavteřinovou sonikací. Voda byla odstraněna a ke gelu bylo přidáno 100 µl

100mM ethylmorfolinu (EtMf, pH 8,1) a 100 μ l acetonitrilu (ACN), směs byla 5 minut sonikována a následně byl supernatant odstraněn. Ke gelu bylo přidáno 20 μ l směsi 30mM redukčního činidla TCEP a 100mM EtMf v poměru 1:9 a vzorky byly inkubovány při 70 °C po dobu 20 minut. Poté byl gel promyt postupně 100 μ l ACN, 100 μ l destilované vody a opět 100 μ l ACN. Poté bylo ke vzorkům přidáno 20 μ l směsi 30mM jodoacetamidu (IAA) a 100mM EtMf (1:9) a vzorky se inkubovaly ve tmě 60 minut při laboratorní teplotě. Poté byly vzorky gelu promyty 100 μ l ACN a následně 3 \times postupně 100 μ l destilované vody 5 minut sonikací a 100 μ l ACN také 5 minut sonikací. Vzorky byly vysušeny 5 minut pomocí vakuového rotačního koncentrátoru (37 °C, SpeedVac). Následně bylo ke vzorkům přidáno 15 μ l směsi štěpícího pufru a trypsinu o finální koncentraci 3ng/ μ l. Vzorky se inkubovaly při 37 °C přes noc.

Další den se vzorky krátce odstředily a k 15 μ l byla přidána směs ACN a trifluoroctové kyseliny (TFA) do celkové koncentrace 30 % (v/v) ACN a 0,1 % (v/v) TFA a vzorky se poté sonikovaly 20 minut. Poté byla připravena matrice pro analýzu vzorků pomocí hmotnostní spektrometrie metodou MALDI-TOF (hmotnostní spektrometr *UltraFlexIII*®). Matrice byla připravena smícháním 5 μ l α -HCCA (10 mg/ml), 5 μ l 80% (v/v) ACN a 5 μ l 0,1% (v/v) TFA (poměr 1:1:1). Smícháním 1 μ l proteinového standardu („pep mix“) a 19 μ l směsi 40% (v/v) ACN a 0,1% (v/v) TFA byl připraven kalibrační vzorek pro MS. Následně byly vzorky stočeny a spolu se standardem byly pipetovány po malých kapkách na terčíky MALDI destičky. Kapky vzorků byly po zaschnutí převrstveny matricí. Po zaschnutí bylo změřeno MS spektrum pomocí MALDI-TOF (*UltraFlexIII*®). Poté bylo provedeno zakoncentrování a odsolení vzorků za použití mikrokolonky s nosičem Oligo R3. V mikrokolonce byl vzorek zachycen z objemu 5 μ l a eluován byl 3 μ l 40% (v/v) a následně 80% (v/v) ACN s 0,1% (v/v) TFA přímo na terčíky MALDI destičky a po zaschnutí převrstven matricí a změřen na hmotnostním spektrometru s manuální analýzou výsledků pomocí programu mMass.

4.5.8 Elektrofyziologická technika *patch-clamp*

Patch-clamp (česky „terčíkový zámek“) je technika umožňující snímat membránové proudy vyvolané aktivací iontových kanálů vyskytujících se na celém povrchu buňky (uspořádání *whole-cell*) za konstantního vkládaného potenciálu, který lze také rovnoměrně či skokově měnit. Proudů jsou snímány pomocí měřicí elektrody pokryté AgCl a referenční elektrody umístěné v roztoku se sklíčkem a buňkami. Měřicí elektroda je uložena v tepelně opracované borosilikátové skleněné trubičce naplněné intracelulárním roztokem a odpor

elektrody (ideálně 3-6 M Ω) je dán jejím zúženým ústím. Při *whole-cell* uspořádání je „terčík“ buněčné membrány vytržen a cytoplasma je vyměňována s intracelulárním roztokem uvnitř skleněné trubičky.

Elektrofyzilogická aparatura se skládá z invertovaného mikroskopu se zdrojem fluorescenčního světla, který je uložen ve Faradayově kleci pro odstínění všech rušivých signálů. Další součástí aparatury je přesný mikromanipulátor s řídicí jednotkou, počítačové rozhraní včetně analogově-digitálního převodníku, zesilovač a počítač s příslušným programovým vybavením. Aplikací systém umožňuje automaticky řízenou rychlou výměnu až osmi různých experimentálních roztoků nad snímanými buňkami umístěnými v Petriho misce. Aplikace přesných teplotních změn je umožněna tzv. teplotní špičkou, která je nasazena na ústí svazku aplikačních kapilár. Centrální výtoková kapilára je v délce 7 mm hustě ovinuta tenkým (15 μm) izolovaným měděným drátkem, který je spojen se zdrojem stejnosměrného proudu. Programově řízeným napětím je prostřednictvím kapiláry protékající roztok ohříván na požadovanou teplotu a její hodnoty jsou pomocí miniaturního termočlánku umístěného v ústí kapiláry snímány současně se záznamem.

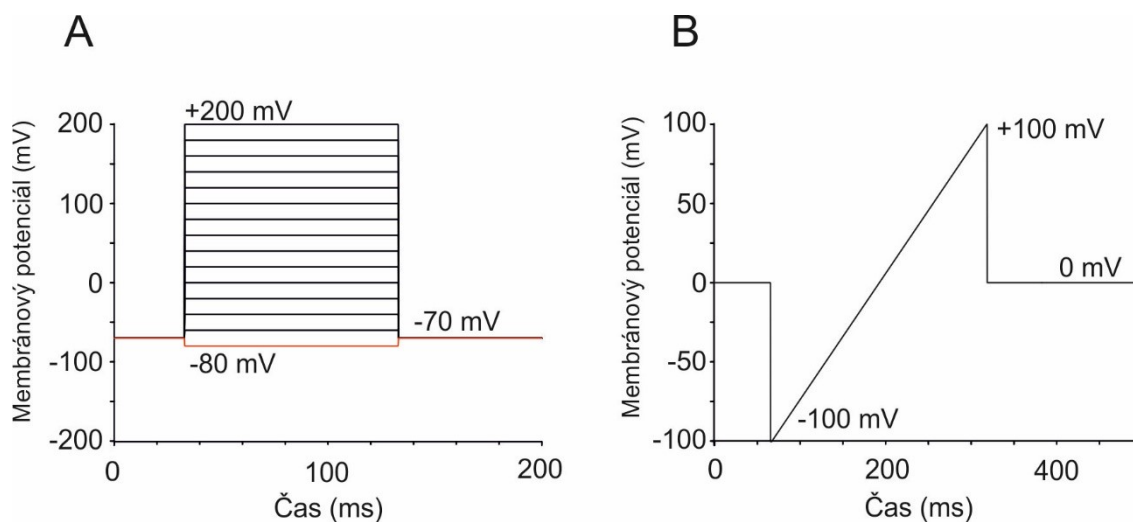
Proudové odpovědi buněk byly měřeny 24 až 48 hodin po transfekci. Z každého sklíčka byly pro měření proudově-napěťové charakteristiky testovány maximálně 4 GFP pozitivní buňky, po aplikaci tepla či agonisty bylo sklíčko vyměněno za nové. Buňky byly umístěny na sklíčku a omývány extracelulárním roztokem. Mikromanipulátorem byl hrot skleněné mikropipety přiveden nad vybranou buňku a při dotyku byl vytvořen těsný kontakt mezi membránou a mikropipetou. Aplikací podtlaku pomocí hadičky spojené se skleněnou mikrokapilárou byla buněčná membrána protrhnuta. Měřený odpor před protržením terčíku membrány se optimálně pohybuje v řádech G Ω , po protržení přibližně 300-500 M Ω . Výstupní kapilára aplikačního systému byla umístěna přibližně 100 μm od snímané buňky, aby byla zajištěna rychlá výměna roztoků se specifickými agonisty (50 μM karvakrol – TRPA1, 35 μM pregnenolon sulfát – TRPM3) a současně rychlá a vratná změna teploty těchto roztoků (z 25 $^{\circ}\text{C}$ na 35 $^{\circ}\text{C}$). Pomocí zesilovače *Axopatch 200B* a programu pCLAMP10 (Molecular Devices, USA) byly snímány proudové odpovědi současně s časovým průběhem teploty aplikovaných roztoků.

4.5.9 Napěťová, chemická a teplotní aktivace TRPA1

Charakteristika proudových odpovědí WT TRPA1, Y726F TRPA1, WT TRPM3 a Y882F byla naměřena pomocí 2 různých protokolů za použití počítačového programu Clampex 10.

Protokol 1: Pro určení proudově-napěťové charakteristiky jednotlivých měřených GFP pozitivních buněk byl aplikován napěťový protokol (dále *I/V* protokol). Potenciál vkládaný na buňku činil -70 mV a poté byl skokově měněn od -80 mV do +200 mV po 20 mV. Na buňku bylo tedy aplikováno 15 pulzů se skokově proměnným potenciálem trvajícím 100 ms, zvyšujícím se vždy po 500 ms (obr. 7A, str. 35).

Protokol 2: Charakter odpovědí na změnu teploty a na přítomnost agonisty (50 μ M karvakrol – TRPA1, 35 μ M pregnenolon sulfát – TRPM3) byl stanoven protokolem, který kombinoval napěťovou, chemickou a teplotní stimulaci (obr. 7B, str. 35). Buňky byly udržovány trvale na membránovém potenciálu 0 mV, každou vteřinu skokově hyperpolarizovány na -100 mV a poté lineárně depolarizovány na +100 mV s rychlostí 1 V/s. Pomocí aplikační kapiláry s teplotní špičkou pak byly řízeny složení a teplota roztoku omývajícího buňku. V desáté vteřině byla skokově zvýšena teplota kontrolního extracelulárního roztoku na 35 °C a ve třicáté vteřině opět snížena na 25 °C. V padesáté vteřině byl aplikován agonista, v sedmdesáté vteřině byla teplota roztoku obsahujícího agonistu zvýšena na 35 °C, v devadesáté vteřině byl tento roztok ochlazen a ve stodesáté vteřině byl roztok s agonistou zaměněn za kontrolní extracelulární roztok (viz kapitola Výsledky, obr. 12A a B, str. 43).



Obrázek 7: Protokoly aplikované na buňky při napětové, teplotní a chemické aktivaci. **A)** Napětový protokol obsahoval 15 napětově proměnných pulzů, které trvaly 100 ms a zvyšovaly se po 20 mV od -80 mV do +200 mV. Udržovací potenciál vkládaný na buňku byl -70 mV. **B)** Teplotní a chemická aktivace byla zkoumána v rámci napětových pulzů od -100 mV do +100 mV, které byly na buňku aplikovány rychlostí 1 V/s. Udržovací potenciál vkládaný na buňku byl 0 mV.

4.5.10 Hodnocení záznamů a statistická analýza

Pro vyhodnocení naměřených dat byl použit program Clampfit 10 (Molecular Devices) a tvorba grafů a statistické vyhodnocení bylo provedeno v programu SigmaPlot 10.0 (Systat Software).

Pro vyhodnocení I/V závislosti byly zprůměrovány amplitudy proudových odpovědí na konci pulzu (v rozmezí 95-99 ms), kdy se odpovědi blíží rovnovážnému stavu, a z nich byl vyhotoven graf v závislosti na vloženém napětí. Z tohoto grafu byla odhadnuta hodnota reverzního potenciálu, V_{rev} , tedy hodnota napětí, při které procházející proud přechází ze záporných hodnot do kladných. Vydělením proudových odpovědí příslušným potenciálem sníženým o hodnotu reverzního potenciálu ($V - V_{rev}$) se získala závislost G/V , tedy závislost elektrické vodivosti, G , na napětí, V . Tato závislost pak byla proložena Boltzmannovou funkcí:

$$G = \frac{G_{max} - G_{min}}{1 + e^{-\frac{zF}{RT}(V - V_{50})}} + G_{min}, \quad (1)$$

kde G_{max} představuje maximální hodnotu elektrické vodivosti, G_{min} minimální hodnotu elektrické vodivosti, z je vrátkovací náboj (angl. gating charge), F představuje Faradayovu konstantu ($F=96\,485$ C/mol), R je univerzální plynová konstanta ($R=8,314$ J.K/mol), V je

napětí a V_{50} je napětí, při kterém dosahuje vodivost, G , poloviny svého maxima. Pro porovnání byla vodivost normalizována na maximální hodnotu G_{\max} .

Z jednotlivých proudově-napěťových charakteristik TRPA1 WT a Y726F byla porovnávána deaktivací kinetika při repolarizaci proudů na -70 mV. Pomocí programu Clampfit 10 byla pro jednotlivé buňky stanovena doba, při které klesla amplituda proudů na polovinu maximální hodnoty.

Záznamy chemické a teplotní aktivace byly vyhodnoceny tak, že hodnoty membránových proudů při ± 80 mV byly vyneseny do grafu v závislosti na čase. Z těchto závislostí byly získány průměrné amplitudy v kontrolním extracelulárním roztoku a v přítomnosti agonisty při 25 °C a 35 °C. Podílem těchto amplitud, $I(35\text{ °C})/I(25\text{ °C})$, byla získána informace o relativní změně proudových odpovědí při zvýšení teploty o 10 °C.

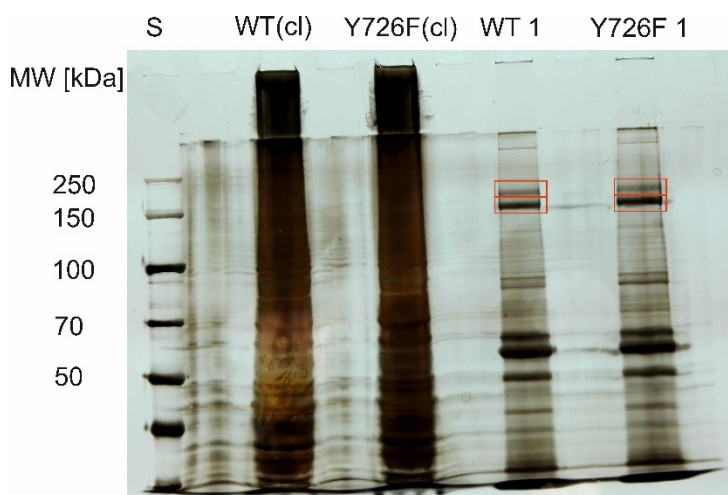
Další z charakteristik proudově-napěťové závislosti TRPA1 receptoru je poměr membránových proudů na kladných a záporných membránových potenciálech, který vyjadřuje míru zakřivení I/V závislosti, tzv. rektifikační index (angl. rectification index) a odráží celkovou napěťovou citlivost receptoru.

$$RI = -\frac{I(+80\text{ mV})}{I(-80\text{ mV})} \quad (2)$$

Vyšší hodnota RI znamená, že pravděpodobnost otevření iontových kanálů na kladných membránových potenciálech je vyšší oproti záporným potenciálům.

TRPA1 a poté byla pomocí hmotnostní spektrometrie potvrzena přítomnost TRPA1 v produktu izolace.

Na SDS gel byly aplikovány vzorky odebraných kontrol buněčného lyzátu (označeno cl, angl. cell lysate) před přidáním protilátky – WT(cl), Y726F(cl), a poté izolované proteiny WT a Y726F. Gel byl obarven velmi citlivou metodou za použití Ag^+ pro detekci velmi malých koncentrací získaných proteinů. Z porovnání drah kontrol buněčného lyzátu a izolovaných proteinů (obr. 9, str. 38) lze usoudit, že se podařilo lyzát dostatečně purifikovat a izolace proteinu byla úspěšná. V drahách izolovaných proteinů WT a Y726F byly pro MS analýzu vybrány 2 proužky o přibližné molekulové hmotnosti 155 kDa (přibližná molekulová hmotnost konstruktů TRPA1-tGFP). Ze srovnatelné intenzity těchto proužků lze také usoudit, že exprese WT a Y726F je srovnatelná a neměla by mít vliv na proudové odpovědi buněk exprimujících Y726F-TRPA1.



Obrázek 9: Polyakrylamidový gel barvený stříbrem. Do drah polyakrylamidového gelu byl pipetován standard molekulových hmotností (S), buněčný lyzát WT(cl), buněčný lyzát Y726F(cl), dále purifikovaný protein izolovaný pomocí myši monoklonální protilátky proti tGFP – WT1 a Y726F1. Mezi jednotlivými drahami byl pipetován pouze vzorkový pufr pro zabránění kontaminace vedlejších drah. Hodnoty molekulových hmotností standardu jsou vyobrazeny vertikálně nalevo od obrázku. Pro hmotnostní spektrometrii byly z drah izolovaného proteinu WT1 a Y726F1 vybrány vždy 2 proužky (označeny červeným obdélníkem) okolo předpokládané pohyblivosti konstruktů TRPA1-tGFP, která činí 155 kDa.

Z vybraných proužků na polyakrylamidovém gelu byly připraveny vzorky pro hmotnostní spektrometrii. Ve všech získaných spektrech ze čtyř analyzovaných vzorků (2 vzorky pro WT, 2 vzorky pro Y726F) byla potvrzena přítomnost TRPA1 pomocí

peptidového mapování dostupným programem MASCOT⁴³ (pokrytí sekvence pro WT – 48 %, pro Y726F – 38 %, viz Přílohy, str. 55). Lze tedy usoudit, že HEK293T buňky transfekované plazmidem kódujícím přirozený typ TRPA1 a také konstrukt Y726F-TRPA1 exprimovaly daný protein a snímané proudové odpovědi jsou charakteristické pro tento kanál.

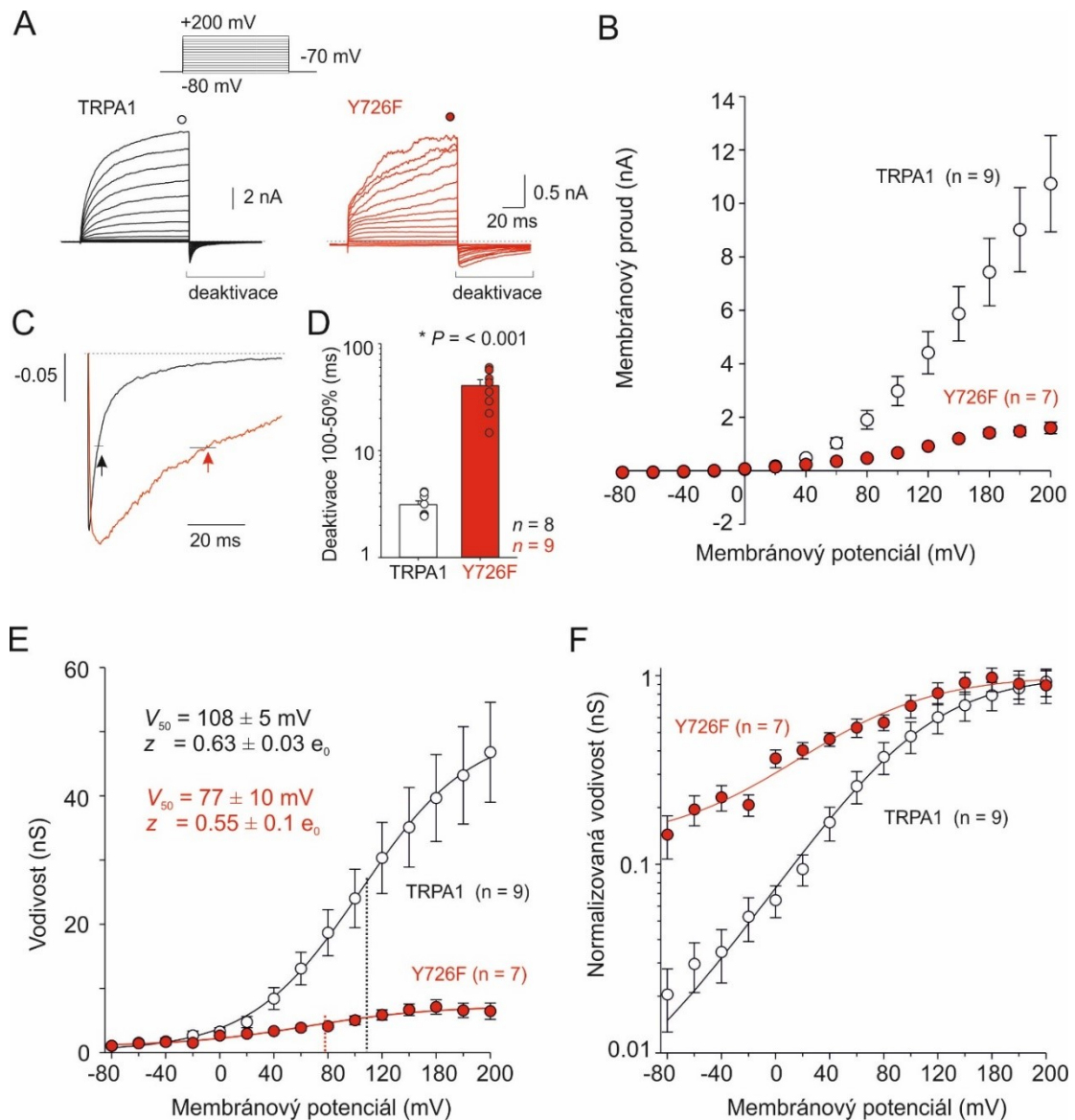
5.2 Napěťově závislá aktivace TRPA1 WT a Y726F-TRPA1

Buňky exprimující přirozený typ TRPA1 či protein se záměnou Y726F byly rozpoznány pomocí pozitivní exprese GFP. Na tyto buňky byly v konfiguraci *whole-cell* po protržení terčíku aplikovány napěťové pulzy od -80 do +200 mV podle protokolu 1 popsaného výše v Metodách (kap. 4.5.9., str. 34). Průměrné odpovědi na tento protokol jsou vyobrazeny na panelu A a proudově-napěťová (I/V) charakteristika těchto odpovědí odečítána na konci napěťových pulzů je znázorněna na panelu B (obr. 10A a B, str. 40). Je patrné, že odpovědi mutantu Y726F jsou násobně menší. Maximální proudová odpověď na +200 mV u WT ($n = 9$) byla $10,7 \pm 1,8$ nA a u Y726F ($n = 7$) jen $1,6 \pm 0,2$ nA ($P < 0,001$).

Další vyhodnocenou charakteristikou je průměrná deaktivací rychlost, která odráží kinetickou rychlostní konstantu zavírání iontových kanálů aktivovaných depolarizací na +200 mV (obr. 10C a D, str. 40). Vzhledem k tomu, že membránové proudy v deaktivací fázi nebylo možné jednoznačně numericky aproximovat exponenciální funkcí, byla porovnávána doba, kdy proudová odpověď po ukončení depolarizačního pulzu dosáhla poloviční hodnoty maxima. Deaktivací rychlost proteinu s bodovou mutací Y726F byla v porovnání s WT-TRPA1 statisticky významně zpomalena (z $3,1 \pm 0,3$ ms na $40,5 \pm 5,4$ ms; $P < 0,001$).

Z průměrné napěťově-proudové charakteristiky byla následně vypočítána závislost vodivosti na membránovém potenciálu (G/V), ze které byly odhadnuty hodnoty polovičního účinného napětí. Tato hodnota byla oproti WT ($V_{50} = 108 \pm 5$ mV) statisticky významně posunuta doleva u konstruktu Y726F ($P = 0,011$) na průměrnou hodnotu $V_{50} = 77 \pm 10$ mV. Průměrné hodnoty jednotkového náboje vypočtené pro WT byly $z = 0,63 \pm 0,03$ e_0 a pro Y726F jen o něco nižší: $z = 0,55 \pm 0,1$ e_0 (obr. 10E, str. 40). G/V závislost byla poté normalizována na maximální teoretickou vodivost pro danou buňku a je vyobrazena na panelu F v logaritmicím měřítku, které umožňuje lépe porovnat změny na

hyperpolarizačních membránových potenciálech, kdy je předpokládán napěťový senzor v klidovém stavu (obr. 10F, str. 40). Relativní zvýšení vodivosti v tomto rozsahu potenciálů patrné u Y726F konstruktů naznačuje změny v rovnováze vrátkování, které je nezávislé na membránovém potenciálu.



Obrázek 10: Aktivace přirozeného typu TRPA1 receptoru a mutantu Y726F depolarizačním napětím. **A)** Vyvolané proudové odpovědi zprostředkované iontovými kanály exprimovanými v HEK293T buňkách, snímanými technikou patch-clamp. Na konci pulzů je odečtena maximální amplituda proudu při příslušném membránovém potenciálu (označeno kolečkem nad záznamy). Napěťový protokol ke stimulaci je znázorněn nad záznamy a popsán v Metodách (kap. 4.5.9., str. 34). **B)** Průměrná I/V charakteristika TRPA1 a Y726F (n, počet buněk, ze kterých byl vypočten průměr pro daný konstrukt, je vyznačen v grafu). **C)** a **D)** Průměrná deaktivací kinetika membránových proudů při repolarizaci na -70 mV (časový

úsek vyznačen pod záznamem šedou čarou). Proudové byly normalizovány vzhledem k maximální odpovědi na +200 mV. Šipky označují průměrnou dobu, za kterou se snížila proudová odpověď na polovinu maximální odpovědi. Patrné je výrazné zpomalení deaktivace Y726F. **E)** Porovnání průměrné G/V charakteristiky pro TRPA1 a konstrukt Y726F. Křivky spojující body jsou generovány Boltzmannovou funkcí s průměrnými parametry, které byly získány aproximací jednotlivých záznamů. Vertikální tečkované čáry vyznačují hodnoty průměrného polovičního účinné napětí V_{50} . **F)** Elektrická vodivost získaná v E, normalizovaná vzhledem k maximální teoretické vodivosti pro danou buňku, získané z aproximace Boltzmannovou funkcí (viz Metody, str. 35).

5.3 Teplotní citlivost napěťové a chemické aktivace TRPA1 WT a Y726F-TRPA1

Pro testování chemické citlivosti byl na GFP pozitivní HEK293T buňky aplikován nejdříve kontrolní extracelulární roztok o teplotě 25 °C, poté byla teplota roztoku po dobu 20 s zvýšena na 35 °C. Buňky byly následně omývány 20 s extracelulárním roztokem o teplotě 25 °C a poté byl aplikován roztok s agonistou (50 μ M karvakrol). Po ustálení odpovědi (po 20 s) byla v přítomnosti agonisty zvýšena teplota roztoku na 35 °C a po 20 s opět snížena na 25 °C. Membránový potenciál byl udržován na 0 mV a každou sekundu byla napěťová citlivost buněk testována lineárním napěťovým stimulem od -100 mV do +100 mV (viz Metody, str. 34, protokol 2). Tento kombinovaný protokol umožnil určit změny při teplotní i chemické aktivaci na pozitivních i negativních membránových potenciálech.

Při zvýšení teploty o 10 °C se relativní zvýšení proudových odpovědí WT a Y726F lišilo na kladných membránových potenciálech, kde u mutantu byl tento rozdíl statisticky významně vyšší (obr. 11A a B, str. 42). Podobný výsledek byl patrný na proudových odpovědích vyvolaných v přítomnosti 50 μ M karvakrolu (obr. 11C a D, str. 42). Zatímco proudové odpovědi u WT na kladných potenciálech byly zvýšeny $1,7 \pm 0,1$ -krát v kontrolním roztoku a $1,2 \pm 0,03$ -krát v přítomnosti karvakrolu, u Y726F se odpovědi zvýšily $2,7 \pm 0,2$ -krát a $1,7 \pm 0,08$ -krát (obr. 12C a D, str. 43).

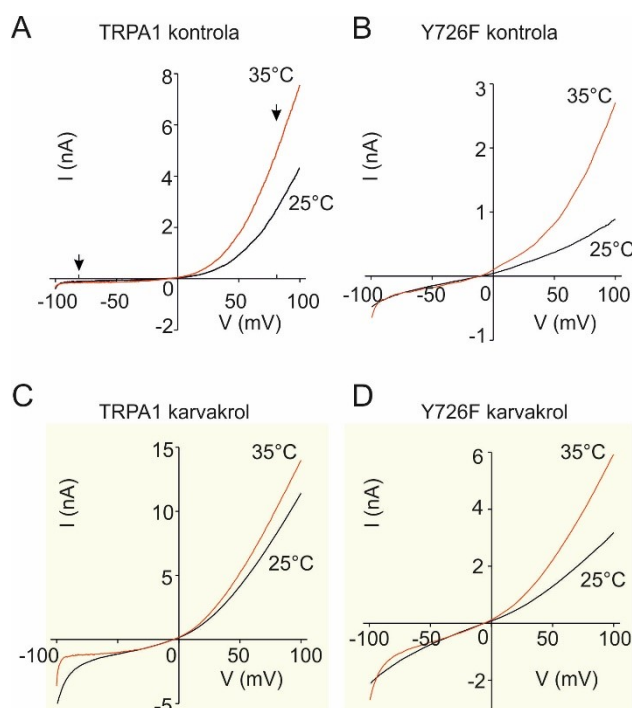
Na panelu A a B (obr. 12, str. 43) je vyobrazen časový průběh průměrných proudových odpovědí s vyznačeným stimulačním protokolem. Teplota aplikovaného roztoku byla automaticky řízena (od 25 °C do 35 °C) a zaznamenána současně s membránovými proudy.

Karvakrol (50 μM) byl aplikován na 60 s. Hodnoty membránových proudů byly odečítány při ± 80 mV. Vedle sebe jsou znázorněny odpovědi WT TRPA1 ($n = 9$) a mutantu Y726F ($n = 5$). Stejně jako při I/V charakteristice je patrné celkové snížení odpovědí. Na +80 mV byla maximální odpověď WT na karvakrol $6,3 \pm 0,8$ nA a u Y726F jen $2,2 \pm 0,2$ nA ($P = 0,003$).

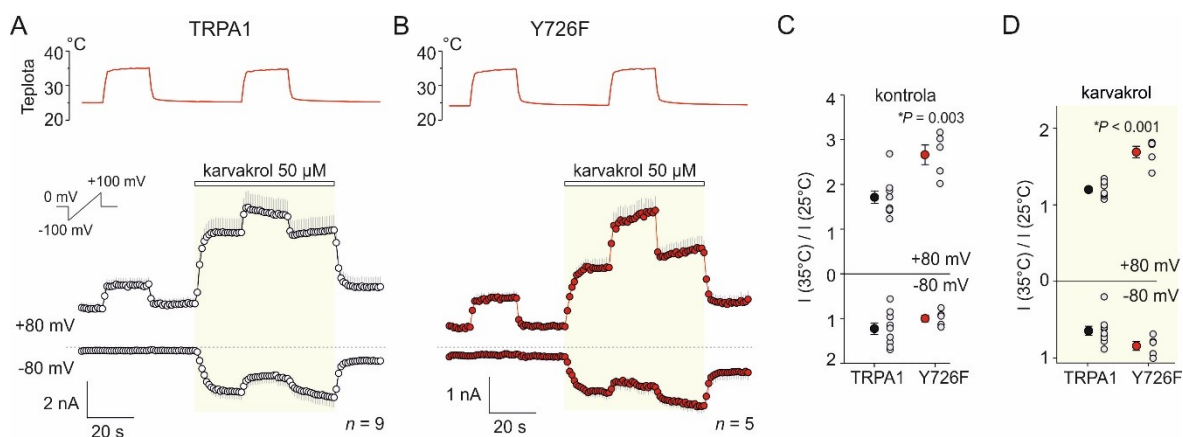
Účinek změny teploty o 10 $^{\circ}\text{C}$ na rektifikační index u WT a Y726F je shrnut v Tabulce 4.

Tabulka 4: Hodnoty rektifikačních indexů při 25 $^{\circ}\text{C}$ a 35 $^{\circ}\text{C}$

	<i>RI</i> (WT) – $n=9$	<i>RI</i> (Y726F) – $n=5$
25 $^{\circ}\text{C}$	$16,13 \pm 2,73$	$2,87 \pm 0,57$
35 $^{\circ}\text{C}$	$22,61 \pm 4,19$	$7,63 \pm 1,48$
25 $^{\circ}\text{C}$, karvakrol	$2,88 \pm 0,47$	$1,82 \pm 0,07$
35 $^{\circ}\text{C}$, karvakrol	$6,53 \pm 1,53$	$3,75 \pm 0,41$



Obrázek 11: Proudově-napěťová závislost TRPA1 a Y726F. **A)** a **B)** I/V závislost při teplotách 25 $^{\circ}\text{C}$ a 35 $^{\circ}\text{C}$. Amplitudy byly měřeny v bodech označených v A šípkami pro zobrazení časového průběhu a následnou analýzu. Průměrná relativní změna amplitudy na pozitivních a negativních membránových potenciálech při zvýšení teploty o 35 $^{\circ}\text{C}$. Zvýšení proudů na +80 mV je statisticky významně vyšší u Y726F mutantu. **C)** a **D)** Proudově-napěťová závislost TRPA1 a Y726F při teplotách 25 $^{\circ}\text{C}$ a 35 $^{\circ}\text{C}$ v přítomnosti karvakrolu pro stejné buňky jako v A a B.



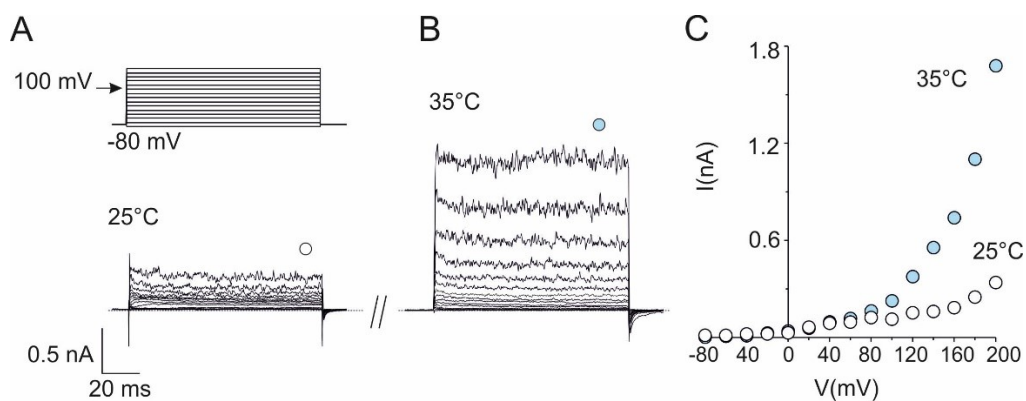
Obrázek 12: Teplotní a chemická stimulace TRPA1 a Y726F. **A)** Časový průběh průměrných odpovědí TRPA1 receptorů snímaných v kontrolním extracelulárním roztoku a poté v přítomnosti karvakrolu (vyznačeno horizontální čarou nad záznamem). Teplota roztoku byla zvyšována z 25 °C na 35 °C (červený záznam nad proudovými odpověďmi). Amplitudy byly odečteny na -80 mV a na +80 mV a zobrazeny jako průměr a střední chyba průměru (bílá kolečka a šedé vertikální čáry, $n = 9$). **B)** Časový průběh průměrných odpovědí snímaných z Y726F mutantu ($n = 5$) získaných stejným protokolem jako v A. **C)** Průměrná relativní změna amplitudy odpovědi kontroly na pozitivních a negativních membránových potenciálech při 25 °C. Zvýšení proudů na +80 mV je statisticky významně vyšší u Y726F mutantu (Studentův t -test, $P = 0,003$). **D)** Průměrná relativní změna amplitudy odpovědi vyvolaných karvakrolem na pozitivních a negativních membránových potenciálech při zvýšení teploty o 10 °C. Zvýšení proudů na +80 mV je statisticky významně vyšší u Y726F mutantu (Studentův t -test, $P < 0,001$).

5.4 Zjištění obecné úlohy Y726 v aktivaci TRP kanálů

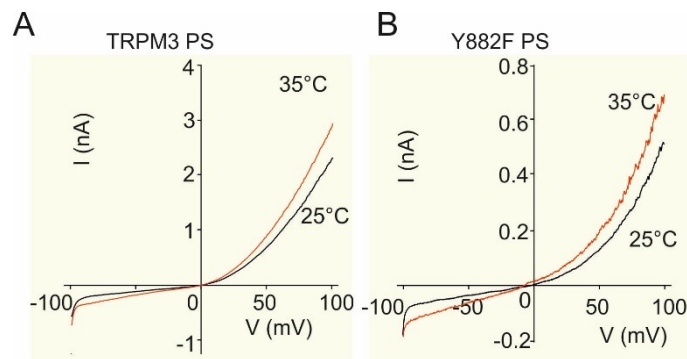
Pro zjištění, do jaké míry může být úloha tyrosinu konzervovaná v rámci rodiny teplotně citlivých TRP kanálů, jsme vybrali melastatinový kanál TRPM3. Tento iontový kanál je aktivován teplem, přičemž teplotní aktivace vyžaduje přítomnost fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu⁴⁴. Homologním reziduem u TRPM3 je tyrosin Y882, který jsme místně specifickou jednobodovou mutací zaměnili za fenylalanin (Y882F). Stejným postupem jako u TRPA1 byl plazmid transfekován do HEK293T buněk a exprimován spolu s GFP pro kontrolu pozitivní exprese. Na GFP pozitivní buňky byly aplikovány obdobné protokoly jako v případě TRPA1 (viz Metody, str. 34) a získané proudové odpovědi byly vyhodnoceny. Jako agonista byl použit 35 μ M pregnenolon sulfát (PS).

Na obrázku 13A a B (str. 44) je zobrazena proudově-napěťová charakteristika jedné z testovaných buněk. Podle stejného napěťového protokolu jako u TRPA1 byla buňka stimulována v kontrolním extracelulárním roztoku o teplotě 25 °C. Proudové odpovědi byly v porovnání s TRPA1 velmi malé a neumožnily stanovení základních G/V charakteristik. Pokud byly poté napěťové pulzy aplikovány při 35 °C, proudové odpovědi byly mnohonásobně zvýšeny, což potvrzuje specifickou teplotní citlivost TRPM3. Proudové odpovědi se zvyšovaly až při vysoce depolarizujících potenciálech, což za daných experimentálních podmínek neumožňuje porovnávat proudově-napěťovou charakteristiku TRPA1 a TRPM3.

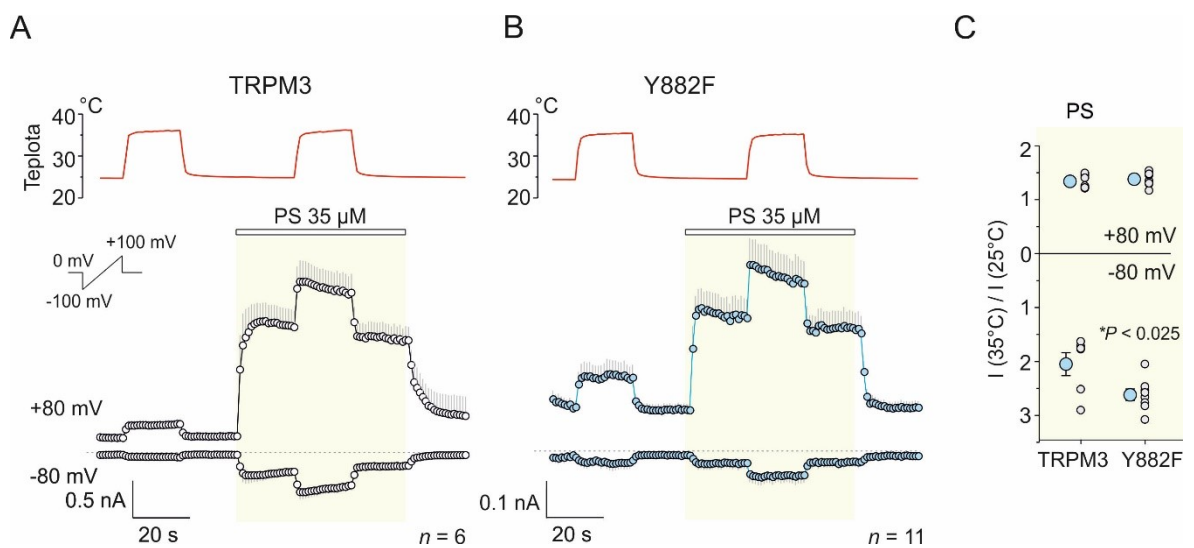
Dále byly porovnávány odpovědi na zvýšení teploty o 10 °C v přítomnosti PS protokolem 2 (obr. 14A a B, str. 45). Na rozdíl od TRPA1, signifikantní změny byly pozorovány na negativních membránových potenciálech, zatímco na pozitivních potenciálech se konstrukt nelišil od přirozeného typu. Proudové odpovědi v přítomnosti PS byly u Y882F-TRPM3 ($n = 11$) oproti přirozenému typu ($n = 6$) statisticky významně menší (obr. 15A a B, str. 45). Na +80 mV byla maximální odpověď WT $1,7 \pm 0,3$ nA a u Y882F jen $0,5 \pm 0,1$ nA ($P < 0,001$). Průměrná relativní změna amplitudy odpovědi vyvolaných PS při zvýšení teploty na 35 °C byla u Y882F mutantu statisticky významně vyšší na -80 mV (obr. 15C, str. 45).



Obrázek 13: Teplotní stimulace TRPM3 a Y882F-TRPM3. **A)** Proudově-napěťová závislost TRPM3 receptorů exprimovaných v HEK293T buňce omývané kontrolním extracelulárním roztokem při teplotě 25 °C. **B)** Na stejné buňce byla při teplotě extracelulárního roztoku 35 °C testována proudová odpověď na stejný napěťový podnět jako v A). Amplitudy byly měřeny v bodech označených kolečkem nad záznamem a zobrazeny v C).



Obrázek 14: **A)** a **B)** Proudově-napěťová závislost TRPM3 a Y882F při teplotách 25 °C a 35 °C v přítomnosti 35μM PS.



Obrázek 15: Teplotní a chemická stimulace TRPM3 a Y882F. **A)** Časový průběh průměrných odpovědí TRPM3 receptorů snímaných v kontrolním extracelulárním roztoku a poté v přítomnosti 35μM pregnenolon sulfátu (PS, vyznačeno horizontální čarou nad záznamem). Teplota roztoku byla zvyšována z 25 °C na 35 °C (červený záznam nad proudovými odpověďmi). Membránový potenciál byl udržován na 0 mV a s frekvencí 1 Hz byl aplikován lineární napěťový stimul od -100 mV do +100 mV rychlostí 1 V/s. Amplitudy byly odečteny na -80 mV a na +80 mV a zobrazeny jako průměr a střední chyba průměru (bílá kolečka a šedé vertikální čáry, $n = 6$). **B)** Časový průběh průměrných odpovědí snímaných z Y882F-TRPM3 mutantu ($n = 11$) získaných stejným protokolem jako v A). **C).** Průměrná relativní změna amplitudy odpovědi vyvolaných PS na pozitivních a negativních membránových potenciálech při zvýšení teploty o 10 °C. Zvýšení proudů na -80 mV je statisticky významně vyšší u Y882F mutantu (Studentův t -test, $P < 0,025$).

6. Diskuze

Předložená bakalářská práce shrnuje současné poznatky o struktuře a funkci lidského TRPA1 iontového kanálu. Zaměřuje se zejména na jeho biofyzikální vlastnosti, včetně napěťové a teplotní citlivosti. Předpokládaná fyziologická úloha TRPA1 kanálu jako receptoru aktivovaného chladem a pozoruhodná skutečnost, že tento receptor je také nezbytný pro detekci bolestivého horka⁴⁵, vedou k základním otázkám, na něž dosud není jednoznačná odpověď. Je lidský ortolog TRPA1 iontovým kanálem přímo aktivovaným chladem i teplem? Jaký je molekulární mechanismus teplotní aktivace? Je možné, že sensorová doména, která je v kontaktu s okolními membránovými lipidy, může přispívat ke změnám teplotní citlivosti TRPA1?

Experimentální výsledky prezentované v předložené bakalářské práci prokazují významnou strukturní a funkční úlohu vysoce konzervovaného tyrosinového rezidua v centrální části sensorové domény TRPA1 receptoru. Tento aminokyselinový zbytek vytváří s dalšími aromatickými a hydrofobními rezidui intenzivní interakce uvnitř kavity senzoru, což je charakteristická vlastnost společná pro celou rodinu TRP iontových kanálů. Vnitřní kavita je místem, kde konvergují signály z různých cytoplazmatických částí receptoru a odkud jsou dále převáděny do spodní brány póru. U některých TRP kanálů tato oblast receptoru může navíc interagovat s membránovými lipidy a alostericky ovlivňovat pravděpodobnost otevření kanálu při aktivaci jinými podněty²³. Vnitřní kavita senzoru je tedy rozhodujícím místem určujícím kinetickou rovnováhu vrátkování kanálu.

Naše výsledky ukazují, že konzervovaná záměna Y726F-TRPA1 výrazně ovlivnila charakteristiku napěťově závislé aktivace a více než o řád zpomalila rychlost deaktivace kanálů. Je tedy zřejmé, že Y726 je funkčně důležitým reziduem účastnícím se převodu depolarizačního membránového potenciálu na otvírání iontového kanálu. Ve srovnání se vzdáleně příbuznými draslíkovými iontovými kanály ($z \sim 12 e_0$), jejichž napěťovým senzorem je 4. transmembránový helix obsahující 3-4 argininová rezidua, jsou TRP kanály všeobecně jen slabě napěťově závislé ($z \sim 0,6 - 0,8 e_0$). V současné době není známo, zda existuje u TRPA1 napěťový senzor a která oblast receptoru je zodpovědná za jeho napěťovou citlivost. Převod napěťově indukovaných konformačních změn mohou zajišťovat nejen nabitě aminokyseliny, ale také aromatická rezidua, která mají vnitřní dipól a mohou být reorientována změnami elektrického pole. Jednotkový náboj stanovený v našich

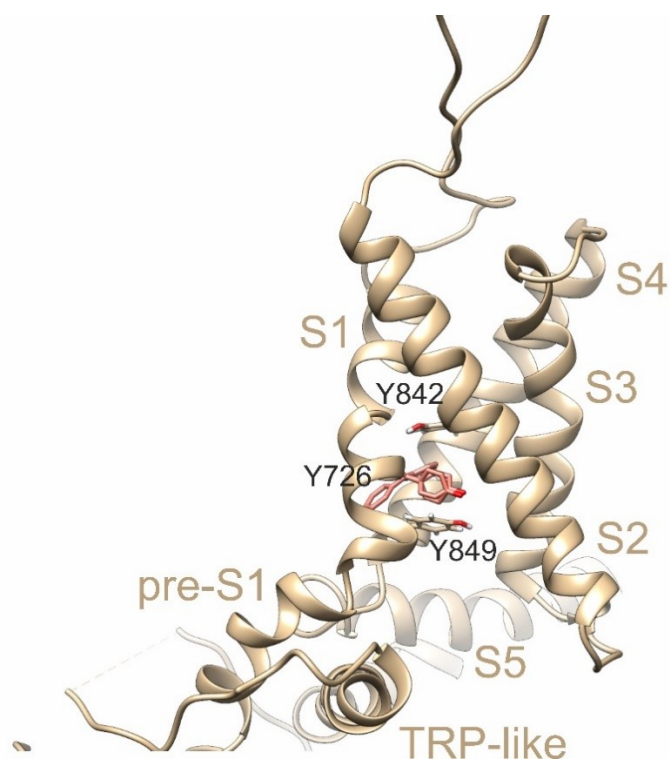
experimentech pro přirozený typ TRPA1 ($0,63 e_0$) se statisticky významně nelišil od hodnoty stanovené pro Y726F-TRPA1 mutant ($0,55 e_0$). Není tedy pravděpodobné, že právě konzervované tyrosinové reziduum Y726 je samo o sobě napěťovým senzorem. Naproti tomu důsledkem mutace byl statisticky významný posun polovičního účinného napětí o téměř -30 mV, což svědčí o přímé účasti tohoto rezidua v převodu změn membránového potenciálu.

Zdá se, že poškození napěťové citlivosti Y726F-TRPA1 ovlivňuje na kladných potenciálech také proudové odpovědi kanálu vyvolané v přítomnosti agonisty (karvakrol), napěťová závislost je však obnovena aplikací teploty a lze říci, že synergickým působením napětí a tepla se funkce kanálu navrácí zpět a napěťová citlivost je obnovena. Naopak u Y882F-TRPM3 byla ovlivněna teplotní citlivost kanálu v přítomnosti agonisty (pregnenolon sulfát) především na záporných potenciálech, a tudíž roli konzervovaného tyrosinového rezidua nelze zobecnit pro celou rodinu teplotně aktivovaných TRP kanálů.

Pomocí SDS elektroforézy a následně velmi citlivého barvení za použití stříbrných iontů se podařilo zobrazit purifikované proteiny WT-TRPA1 a Y726F-TRPA1 a jejich přítomnost v patřičných prouzcích na gelu byla dokázána pomocí hmotnostní spektrometrie. To, že se přirozený typ TRPA1 vyskytuje v několika posttranslačních modifikacích, bylo již dokázáno týmem, jenž mutoval dvě konsensuální místa pro glykosylaci vyskytující se na první extracelulární klíče S1-S2. Záměnou N za Q na pozicích 717 a 753 jak u mutace jednoho, či obou glykosylačních míst najednou bylo dosaženo různé míry exprese TRPA1 s danou posttranslační modifikací⁴⁶. Výskyt Y726F-TRPA1 v obou prouzcích o hmotnosti okolo 155 kDa tedy naznačuje, že se mutagenní konstrukt také nachází minimálně ve dvou posttranslačních modifikacích, a tato konkrétní mutace Y726F tedy nemá vliv na míru exprese jedné či druhé modifikace. Méně zastoupená posttranslační modifikace byla přítomna také při purifikaci TRPA1 jinými metodami v rámci naší laboratoře, avšak méně citlivá metoda barvení gelu ji nevyobrazila s takovou intenzitou a na tento fakt nebyl kladen důraz, jelikož posttranslační modifikace nebyly středem zájmu daného experimentu²³.

Porovnáním intenzity vyobrazení purifikovaného WT-TRPA1 a Y726F-TRPA1 lze říci, že tato mutace pravděpodobně neměla vliv na expresi daného proteinu, a tudíž relativně menší proudové odpovědi Y726F nejsou způsobeny změnou míry exprese kanálu. Otázkou zůstává, zdali je srovnatelná také povrchová exprese a menší proudové odpovědi nejsou důsledkem sníženého výskytu kanálů na plazmatické membráně.

U lidského TRPA1 receptoru se postranní řetězec tyrosinu Y726 na S1 segmentu nachází mezi dvěma aromatickými aminokyselinami na S4 segmentu, Y842 a Y849, se kterými utváří patrové interakce (obrázek 16, str. 48). Zároveň může hydroxylová skupina tyrosinu interagovat skrze vodíkové můstky také s asparaginem 845 a kyslíkem v peptidové vazbě rezidua Y849. Uvedený shluk postranních řetězců aminokyselin navazuje svými kontakty na další aromatická rezidua S4 segmentu (F846) a potažmo také S5 segmentu vedlejší podjednotky (F879). Lze tedy předpokládat, že se aminokyselina Y726 podílí na stabilizaci sensorové domény a částečně také intermolekulárních kontaktů s pórovou oblastí TRPA1 receptoru. Tudiž i jemné rozdíly způsobené záměnou tohoto rezidua za fenylalanin mohou vést k destabilizaci senzoru a ovlivnění převodu strukturních změn souvisejících s převodem aktivačních signálů do vrátkovací oblasti kanálu. Nepublikované výsledky naší skupiny ukazují, že záměnami Y726A a Y726W je aktivita vzniklého iontového kanálu vyvolaná napěťovými a teplotními podněty téměř potlačena, což podporuje významnost tohoto rezidua pro správnou funkci kanálu.

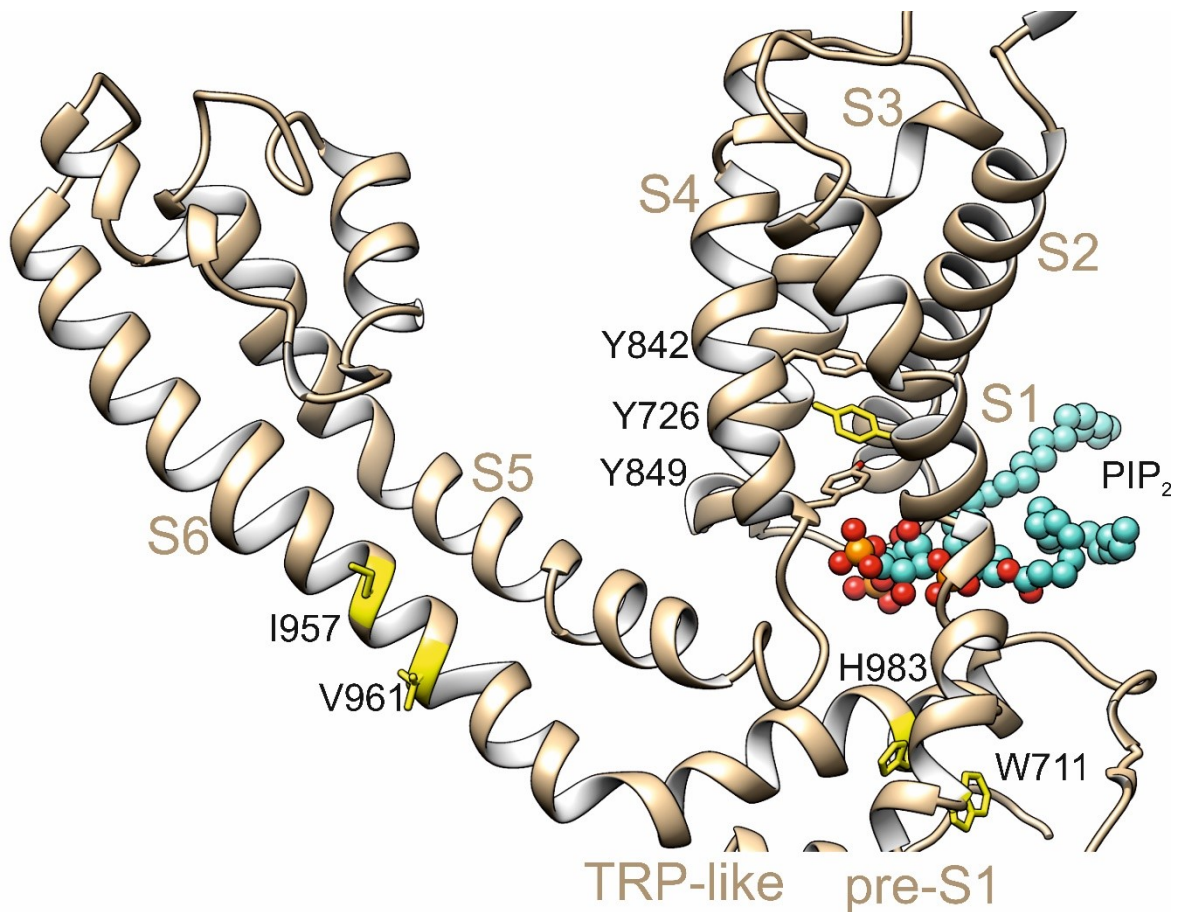


Obrázek 16: Sensorová doména TRPA1. Vysoce konzervovaný Y726 zaujímá pozici mezi dvěma aromatickými rezidui – Y842 a Y849 nacházejícími se na transmembránovém helixu S4 a vytváří s nimi patrové interakce. Tyrosin 842 může být u jiných ortologů zaměněn za serin a Y726 se tak může reorientovat a zaujímat jiné pozice (rotamery tyrosinu 726 jsou vyobrazeny růžově).

Je zajímavé, že ačkoli Y726 je napříč TRPA1 ortology vysoce konzervované reziduum, v případě aminokyseliny na pozici 842 mají některé ortology kromě tyrosinu také serin nebo leucin, což připouští možnost reorientace Y726. Vzhledem k uspořádání helikálního S1 segmentu může tyrosin 726 nabývat několika konformací (obr. 16, str. 48).

Na základě dostupné literatury, dat a strukturní analýzy *in silico* navrhujeme spekulativní mechanismus převodu signálu ze sensorové domény do vrátkovací oblasti. Porovnáním dostupných struktur TRP receptorů se ukázalo, že mezi jednotlivými zástupci TRP nadrodiny jsou v intracelulární sensorové kavitě rozdíly. V případě struktury TRPV1 obsahuje kavita fosfatidylcholin a je důsledkem posunu S1 segmentu výrazně širší než u TRPA1. Reziduum Y441 (analogické k Y726 u hTRPA1) již není v kontaktu s S4 segmentem pomocí patrových interakcí, ovšem vytváří kontakt s alifatickým řetězcem lipidu⁴². Je možné, že kavita TRPA1 receptoru by mohla obdobně pozměnit svou konformaci v přítomnosti lipidu, k čemuž mohou přispívat poměrně konzervovaná rezidua narušující helicitu v S1 segmentu nad Y726, G729 a P731. Okolí tyrosinu 726 by tak podléhalo strukturním změnám při vazbě lipidu do kavity a představovalo by významné převodní místo. U melastatinového receptoru TRPM4 je reziduum Y790 (analogické k Y726 u TRPA1 a k Y882 u TRPM3) ve spodní části shluku aromatických aminokyselin⁴⁷. Hlavní intramolekulární kontakty zpevňující senzor zde má zřejmě F793, spojující S1 segment s S4 segmentem skrze π - π interakci s F902 (analogickým k Y849 u TRPA1). Do kavity navíc zasahuje klička následující po TRP doméně, která brání vazbě lipidu do obdobné pozice jako u TRPV1. Naopak ve struktuře TRPM4 byly rozlišeny molekuly cholesterolu v oblasti S4-S5 raménka, S1 segmentu, S4 segmentu a tzv. pre-S1 ramene (TRPA1 má namísto pre-S1 ramene krátký, slabě rozlišený α -helix na karboxylovém konci). V této pre-S1 oblasti byl v případě TRPP2 identifikován vysoce konzervovaný tryptofan, jehož interakce s kladně nabitým postranním řetězcem (lysinem) z TRP-like domény zajišťuje regulaci receptoru membránovým fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátem⁴⁸. Homologní rezidua na strukturně analogických pozicích se nacházejí také na dalších TRP receptorech: TRPM4 (W680 a K914), TRPC4 (W314 a R639) a TRPA1 (W711 a H983) a jejich interakce byla navržena jako konzervovaný mechanismus regulace membránovými fosfolipidy. Mutace Y726F by tak mohla skrze změny v S1 konformaci účinně pozměnit vlastnosti pre-S1 regulačního místa, a tím i vrátkování kanálu (obr. 17, str. 50). Pokud vnitřní oblast senzoru TRPA1 interaguje s fosfátovou skupinou fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu, zvýšení teploty o 10 °C

může pozměnit tuto interakci a ovlivňovat tím pravděpodobnost otevření kanálu podobně jako bylo navrženo pro TRPV1 iontový kanál⁴² (obr. 6C, str. 19).



Obrázek 17: Možný mechanismus převodu signálu ze sensorové domény do vrátkovací oblasti póru TRPA1 receptoru. Změna intramolekulárních interakcí v oblasti konzervovaného tyrosinu 726 může vyvolat konformační změnu v oblasti S4-S5 a prostřednictvím TRP-like domény v 6. transmembránovém helixu vést ke strukturní změně v oblasti dvou reziduí představujících spodní hydrofobní těsnění póru – izoleucinu 957 a valinu 961. V případě, že membránový lipid je navázán k receptoru konzervované interakce v pre-S1 oblasti, změna ve vnitřní kavitě senzoru ovlivňuje prostřednictvím tryptofanu 711 vazbu lipidu a prostřednictvím histidinu 983 je signál bezprostředně převezen z TRP-like domény do oblasti izoleucinu 957 a valinu 961.

7. Závěr

- Pomocí bodové mutagenese jsme vytvořili konstrukt lidského TRPA1 receptoru, ve kterém byl zaměněn konzervovaný tyrosin Y726 za fenylalanin (Y726F-TRPA1).
- Pomocí hmotnostní spektrometrie byla ověřena úspěšná exprese proteinového produktu TRPA1 a Y726F-TRPA1 konstruktů v HEK293T buňkách.
- S využitím elektrofyziologické techniky *patch-clamp* byly porovnány funkční charakteristiky Y726F-TRPA1 konstruktů s přirozeným typem TRPA1. Ukázali jsme, že mutace Y726F-TRPA1 způsobí: a) signifikantní snížení odpovědi nezávislé na míře celkové exprese proteinů, b) statisticky významný posun polovičního účinného napětí o téměř -30 mV, což nasvědčuje přímé účasti tohoto rezidua v převodu změn membránového potenciálu.
- Stanovili jsme účinek zvýšení teploty o 10 °C na membránové proudy vyvolané aktivací TRPA1 v kontrolním extracelulárním roztoku a při aktivaci neelektrofilním agonistou (karvakralem) na kladných a negativních membránových potenciálech. Zjistili jsme, že membránové proudy zprostředkované Y726F-TRPA1 kanály vykazují vyšší relativní podíl vně-směřujících membránových proudů při zvýšení teploty kontrolního extracelulárního roztoku z 25 °C na 35 °C, což naznačuje vyšší účinnost alosterického účinku depolarizačního napětí a tepla.
- Pomocí bodové mutagenese jsme vytvořili konstrukt myšního TRPM3 receptoru, ve kterém byl zaměněn tyrosin Y882 na homologní pozici za fenylalanin (Y882F-TRPM3).
- Elektrofyziologickými měřeními jsme prokázali, že Y882F-TRPM3 kanály nevykazovaly změnu v relativním podílu vně-směřujících membránových proudů při zvýšení teploty kontrolního extracelulárního roztoku z 25 °C na 35 °C. Mechanismus, kterým přispívá Y726 k teplotní citlivosti TRPA1 tedy není pravděpodobně konzervován u celé skupiny teplotně aktivovaných TRP kanálů.

- Pomocí porovnání dostupných struktur různých teplotně citlivých TRP kanálů jsme navrhli možnou signální dráhu převodu signálu z oblasti sensorové domény do vrátkovací oblasti.

8. Seznam použité literatury

- (1) <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyDisplayForward?familyId=78> (přístup 20. 2. 2018).
- (2) Baez, D.; Raddatz, N.; Ferreira, G.; Gonzalez, C.; Latorre, R.: Kapitola 3 - Gating of Thermally Activated Channels. V *Current Topics in Membranes*; Islas, L. D., Qin, F., Eds.; Thermal Sensors; Academic Press, 2014; č. 74, str. 51–87.
- (3) Jaquemar, D.; Schenker, T.; Trueb, B.: *J. Biol. Chem.* **1999**, 274 (11), 7325–7333.
- (4) Story, G. M.; Peier, A. M.; Reeve, A. J.; Eid, S. R.; Mosbacher, J.; Hricik, T. R.; Earley, T. J.; Hergarden, A. C.; Andersson, D. A.; Hwang, S. W.; et al.: *Cell* **2003**, 112 (6), 819–829.
- (5) Paulsen, C. E.; Armache, J.-P.; Gao, Y.; Cheng, Y.; Julius, D.: *Biophys. J.* **2016**, 110 (3), 511–517.
- (6) Cvetkov, T. L.; Huynh, K. W.; Cohen, M. R.; Moiseenkova-Bell, V. Y.: *J. Biol. Chem.* **2011**, 286 (44), 38168–38176.
- (7) Gaudet, R.: *Mol. Biosyst.* **2008**, 4 (5), 372–379.
- (8) Lux, S. E.; John, K. M.; Bennett, V.: *Nature* **1990**, 344 (6261), 36–42.
- (9) Wang, L.; Cvetkov, T. L.; Chance, M. R.; Moiseenkova-Bell, V. Y.: *J. Biol. Chem.* **2012**, 287 (9), 6169–6176.
- (10) Hinman, A.; Chuang, H.-H.; Bautista, D. M.; Julius, D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, 103 (51), 19564–19568.
- (11) Bahia, P. K.; Parks, T. A.; Stanford, K. R.; Mitchell, D. A.; Varma, S.; Stevens, S. M.; Taylor-Clark, T. E.: *J. Gen. Physiol.* **2016**, 147 (6), 451–465.
- (12) Moparthi, L.; Survery, S.; Kreir, M.; Simonsen, C.; Kjellbom, P.; Hogestatt, E. D.; Johanson, U.; Zygmunt, P. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, 111 (47), 16901–16906.
- (13) Doerner, J. F.; Gisselmann, G.; Hatt, H.; Wetzel, C. H.: *J. Biol. Chem.* **2007**, 282 (18), 13180–13189.
- (14) Zurborg, S.; Yurgionas, B.; Jira, J. A.; Caspani, O.; Heppenstall, P. A.: *Nat. Neurosci.* **2007**, 10 (3), 277–279.
- (15) Cordero-Morales, J. F.; Gracheva, E. O.; Julius, D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, 108 (46), E1184–1191.
- (16) Nilius, B.; Prenen, J.; Owsianik, G.: *J. Physiol.* **2011**, 589 (Pt 7), 1543–1549.
- (17) Zíma, V.; Witschas, K.; Hynkova, A.; Zimová, L.; Barvík, I.; Vlachova, V.: *Neuropharmacology* **2015**, 93, 294–307.
- (18) Hu, H.; Bandell, M.; Petrus, M. J.; Zhu, M. X.; Patapoutian, A.: *Nat. Chem. Biol.* **2009**, 5 (3), 183–190.
- (19) Hasan, R.; Leeson-Payne, A. T. S.; Jaggar, J. H.; Zhang, X.: *Sci. Rep.* **2017**, 7, 45098.
- (20) Samad, A.; Sura, L.; Benedikt, J.; Ettrich, R.; Minofar, B.; Teisinger, J.; Vlachova, V.: *Biochem. J.* **2011**, 433 (1), 197–204.
- (21) Sura, L.; Zíma, V.; Marsakova, L.; Hynkova, A.; Barvík, I.; Vlachova, V.: *J. Biol. Chem.* **2012**, 287 (22), 18067–18077.
- (22) Zygmunt, P. M.; Högestätt, E. D.: *Handb. Exp. Pharmacol.* **2014**, 222, 583–630.
- (23) Marsakova, L.; Barvík, I.; Zima, V.; Zimova, L.; Vlachova, V.: *Front. Mol. Neurosci.* **2017**, 10, 16.
- (24) Kremeyer, B.; Lopera, F.; Cox, J. J.; Momin, A.; Rugiero, F.; Marsh, S.; Woods, C. G.; Jones, N. G.; Paterson, K. J.; Fricker, F. R.; et al.: *Neuron* **2010**, 66 (5), 671–680.

- (25) Xiao, B.; Dubin, A. E.; Bursulaya, B.; Viswanath, V.; Jegla, T. J.; Patapoutian, A.: *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **2008**, *28* (39), 9640–9651.
- (26) Behrendt, H.-J.; Germann, T.; Gillen, C.; Hatt, H.; Jostock, R.: *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *141* (4), 737–745.
- (27) Klein, A. H.; Carstens, M. I.; Carstens, E.: *Pain* **2013**, *154* (10), 2078–2087.
- (28) Bandell, M.; Story, G. M.; Hwang, S. W.; Viswanath, V.; Eid, S. R.; Petrus, M. J.; Earley, T. J.; Patapoutian, A.: *Neuron* **2004**, *41* (6), 849–857.
- (29) Macpherson, L. J.; Dubin, A. E.; Evans, M. J.; Marr, F.; Schultz, P. G.; Cravatt, B. F.; Patapoutian, A.: *Nature* **2007**, *445* (7127), 541–545.
- (30) Mori, Y.; Takahashi, N.; Kurokawa, T.; Kiyonaka, S.: *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **2017**, *93* (7), 464–482.
- (31) Karashima, Y.; Damann, N.; Prenen, J.; Talavera, K.; Segal, A.; Voets, T.; Nilius, B.: *J. Neurosci.* **2007**, *27* (37), 9874–9884.
- (32) Xu, H.; Delling, M.; Jun, J. C.; Clapham, D. E.: *Nat. Neurosci.* **2006**, *9* (5), 628–635.
- (33) Talavera, K.; Gees, M.; Karashima, Y.; Meseguer, V. M.; Vanoirbeek, J. A. J.; Damann, N.; Everaerts, W.; Benoit, M.; Janssens, A.; Vennekens, R.; et al.: *Nat. Neurosci.* **2009**, *12* (10), 1293–1299.
- (34) Jordt, S.-E.; Bautista, D. M.; Chuang, H.-H.; McKemy, D. D.; Zygmunt, P. M.; Högestätt, E. D.; Meng, I. D.; Julius, D.: *Nature* **2004**, *427* (6971), 260–265.
- (35) Laursen, W. J.; Bagriantsev, S. N.; Gracheva, E. O.: *Curr. Top. Membr.* **2014**, *74*, 89–112.
- (36) Bautista, D. M.; Jordt, S.-E.; Nikai, T.; Tsuruda, P. R.; Read, A. J.; Poblete, J.; Yamoah, E. N.; Basbaum, A. I.; Julius, D.: *Cell* **2006**, *124* (6), 1269–1282.
- (37) Kwan, K. Y.; Allchorne, A. J.; Vollrath, M. A.; Christensen, A. P.; Zhang, D.-S.; Woolf, C. J.; Corey, D. P.: *Neuron* **2006**, *50* (2), 277–289.
- (38) Karashima, Y.; Talavera, K.; Everaerts, W.; Janssens, A.; Kwan, K. Y.; Vennekens, R.; Nilius, B.; Voets, T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106* (4), 1273–1278.
- (39) Jabba, S.; Goyal, R.; Sosa-Pagán, J. O.; Moldenhauer, H.; Wu, J.; Kalmeta, B.; Bandell, M.; Latorre, R.; Patapoutian, A.; Grandl, J.: *Neuron* **2014**, *82* (5), 1017–1031.
- (40) Chen, J.; Kang, D.; Xu, J.; Lake, M.; Hogan, J. O.; Sun, C.; Walter, K.; Yao, B.; Kim, D.: *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2501.
- (41) Palovcak, E.; Delemotte, L.; Klein, M. L.; Carnevale, V.: *J. Gen. Physiol.* **2015**, *146* (1), 37–50.
- (42) Gao, Y.; Cao, E.; Julius, D.; Cheng, Y.: *Nature* **2016**, *534* (7607), 347–351.
- (43) http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF (přístup 22. 5. 2018).
- (44) Uchida, K.; Demirkhanyan, L.; Asuthkar, S.; Cohen, A.; Tominaga, M.; Zakharian, E.: *FASEB J.* **2016**, *30* (3), 1306–1316.
- (45) Vandewauw, I.; De Clercq, K.; Mulier, M.; Held, K.; Pinto, S.; Van Ranst, N.; Segal, A.; Voet, T.; Vennekens, R.; Zimmermann, K.; et al.: *Nature* **2018**, *555* (7698), 662–666.
- (46) Egan, T. J.; Acuña, M. A.; Zenobi-Wong, M.; Zeilhofer, H. U.; Urech, D.: *Biosci. Rep.* **2016**, *36* (5), doi: 10.1042/BSR20160149.
- (47) Autzen, H. E.; Myasnikov, A. G.; Campbell, M. G.; Asarnow, D.; Julius, D.; Cheng, Y.: *Science* **2018**, *359* (6372), 228–232.
- (48) Zheng, W.; Cai, R.; Hofmann, L.; Nesin, V.; Hu, Q.; Long, W.; Fatehi, M.; Liu, X.; Hussein, S.; Kong, T.; et al.: *Cell Rep.* **2018**, *22* (6), 1560–1573.

9. Přílohy

15. 4. 2018

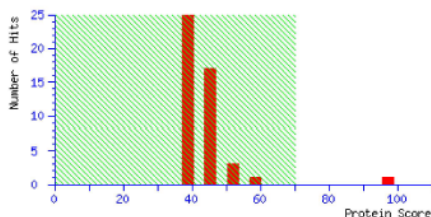
Concise Summary Report (../data/20180415/FTmolGYOt.dat)

MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

User : Tyna
Email : tynabarvikova@seznam.cz
Search title :
Database : SwissProt 2018_03 (557012 sequences; 199714119 residues)
Timestamp : 15 Apr 2018 at 08:38:15 GMT
Warning : Specifying a protein mass disables mixture mode in PMF-search
Top Score : 97 for TRPA1_HUMAN, Transient receptor potential cation channel subfamily A member 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRPA1 PE=1 SV=3

Mascot Score Histogram

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
Protein scores greater than 70 are significant ($p < 0.05$).



Concise Protein Summary Report

Format As [Help](#)
Significance threshold $p <$ Max. number of hits
Preferred taxonomy

1. [TRPA1_HUMAN](#) Mass: 129015 Score: 97 Expect: 0.0001 Matches: 34
Transient receptor potential cation channel subfamily A member 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TRPA1 PE=1 SV=3
2. [MTNE_HAMDS](#) Mass: 10984 Score: 61 Expect: 0.45 Matches: 10
Cell division topological specificity factor OS=Hamiltonella defensa subsp. Acyrthosiphon pisum (strain SAT) OX=572265 GN=mtne PE=3 SV=1

Search Parameters

Type of search : Peptide Mass Fingerprint
Enzyme : Trypsin
Fixed modifications : [Carbamidomethyl \(C\)](#)
Variable modifications : [Oxidation \(H\)](#), [Oxidation \(M\)](#)
Mass values : Monoisotopic
Protein Mass : 154 kDa
Peptide Mass Tolerance : ± 1.2 Da
Peptide Charge State : 1+
Max Missed Cleavages : 1
Number of queries : 43

Mascot: <http://www.matrixscience.com/>

Příloha 1: Výsledek identifikace proteinů na základě dat MS analýzy vzorku Y726F-TRPA1 (z proužku na gelu s větším zastoupením proteinu). Pomocí programu MASCOT byla vyhodnocena všechna spektra a ve všech byl nalezen hTRPA1 o hmotnosti 154 kDa.

1	MKRSLRK MWR	PGEKKE EPQGV	VYEDVPPDDE	DFKESLKV VVF	EGSAYGLQNF		
51	NKQ KKLKRC	DMDTFFLHYA	AAEQQIELME	KITRDSSEV	LHEMDDYGNT		
101	PLHCAVEKNQ	IESVKFLLSR	GANPNLRNFN	MMAPLHIAVQ	GMNNEVMKVL		
151	LEHR TIDVNL	EGENGNTAVI	IACTTNNSEA	LQILLKKGAK	PCKSNKWGCF		
201	PIHQAAFSGS	KECMEIILRF	GEEHGYSRQL	HINFMMNGKA	TPHLHAVQNG		
251	DLEM IKMCLD	NGAQIDPVEK	GRCTAIHFAA	TQGATEIVKL	MISSYSGSVD		
301	IVNT TDGCHE	TMLHRASLFD	HHELADY LIS	VGADINKIDS	EGRSPLILAT		
351	ASASWNIVNL	LLSK GAQVDI	KDNFGRNFLH	LTVQQPYGLK	NLRPEFMQMQ		
401	QIKEL VMD	NDGCTPLHYA	CRQGGPGSVN	NLLGFNVSIH	SKSKDKKSPL		
451	HFAAS YGRIN	TCQR LLQDIS	DTRLLNEGDL	HGMTPLHLAA	KNGHDKVVQL		
501	LLK K GAL FLS	DHNGWTALHH	ASMGGYTQTM	KVILDTNLKC	TDRLDEDGNT		
551	ALHFAA REGH	AKAVALLLSH	NADIVLNK QQ	ASFLHLALHN	KRKEVVLTI I		
601	R SKRWDECLK	IFSHNSPGNK	CPITEMIEYL	PECMK VLLDF	CMLHSTEDKS		
651	CRDYYIEYNF	KYLQCPLEFT	KKTPTQDVIY	EPLTALNAMV	QNNRIELLNH		
701	PVCKE YLLMK	WLAYGFR AHM	MNLGSYCLGL	IPMTILVVNI	KPGMAFNSTG		
751	IINETS	SDHSE	ILDTTNSYLI	KTCMILVFLS	SIFGYCKEAG	QIFQQKRNYP	
801	MDISNVLEWI	IYTTGIIFVL	PLFVEIPAHL	QWQC	GAI	AVY	FYWMNFLLYL
851	QRFENGIFI	VMLEVILKTL	LRSTVVFI	FIFL	LLAFGLSFYI	LLNLQDPFSS	
901	PLLSIIQTF	S	MMLGDINYRE	SFLEPYLRNE	LAHPVLSFAQ	LVSFTIFVPI	
951	VLMNLLIGLA	VG DIAEVQKH	ASLKR IAMQV	ELHTSLEKKL	PLWFLRKVDQ		
1001	KSTIVYP NKP	RSGGMLFHIF	CFLECTGEIR	QEIPNADKSL	EMEILKQKYR		
1051	LKDLTFLEK	QHELIKLI IQ	KMEISETED	DDSHCSFQDR	FKKEQMEQRN		
1101	SR WNTV LRAV	KAK THHLEPT	STRPLEMESD	ESGLPAMEIE	CRITGTLNGV		
1151	RFELVGGGEG	TPEQGR MTNK	MKSTKGALTF	SPYLLSHVMG	YGFYHFGTYP		
1201	SGYENPFLHA	INNGGYTNTR	IKKYEDGGVL	HVSFSYRYEA	GRVIGDFKVM		
1251	GTGFPEDSVI	FTDKIIR SNA	TVEHLHPMGD	NDLDGSEFTRT	FSLRDGGYYS		
1301	SVVD SHMHFK	SATHP SILQN	GGPMFAFRV	EEDHSNTELG	IVEYQHAFKT		
1351	PDADAGEERV						

Příloha 2: Pokrytí sekvence (červené písmo) přirozeného typu TRPA1-tGFP, které bylo detekováno metodou MS a následně vyhodnoceno v programu mMass (manuální vyhodnocení) a programem MASCOT. Ze 1119 aminokyselin sekvence TRPA1 bylo detekováno 470 aminokyselin, z 240 aminokyselin tGFP bylo pokryto 177 aminokyselin. Celkově bylo detekováno 470 z 1359 aminokyselin s celkovým pokrytím 48 %. Zelená – sekvence tGFP, žlutá – raménko, modrá – místo pro restriktázu.

1	MKRSLRK MWR	PGEKKE EPQGV	VYEDVPPDTE	DFKESLKV VVF	EGSAYGLQNF
51	NKQ KKLKRC	DMDTFFLHYA	AAEQI ELME	KITRDSSEV	LHEMDDY GNT
101	PLHCAVEK NQ	IESVKFLLSR	GANPNLR NFN	MMAPLHIAVQ	GMNNEVMK VL
151	LEHR TIDVNL	EGENGNTAVI	I ACTT NNSEA	LQILLK KGAK	PCKSNK WGCF
201	PIHQAAFSGS	KECMEI ILRF	GEEHGYSRQL	HINFMNNGKA	TPLHLAVQNG
251	DLEM IKMCLD	NGAQIDPVEK	GRCTAIHFAA	TQGATEIVKL	MISSYSGSVD
301	IVNTTDG CHE	TMLHRASLFD	HHELADY LIS	VGADINKIDS	EGRSPLILAT
351	ASASWNI VNL	LLSK GAQVDI	KDNFGRNFLH	LTVQQPYGLK	NLRPEFMQMQ
401	QIK ELVMDED	NDGCTPLHYA	CR QGGPGSVN	NLLGFNVSIH	SKSKDKKSPL
451	HFAAS YGRIN	TCQR LLQDIS	DTRLL NEGDL	HGMTPLHLAA	KNGHDKVVQL
501	LLK KGALFLS	DHNGWTALHH	AS MGGYTQTM	KVILD TNLKC	TDRLDEDGNT
551	ALHFAA REGH	AKAVALLLSH	NADIVLN KQQ	ASFLHLALHN	KRKEVVLTI
601	RSKRW DECLK	IFSHNSPGNK	CPITEMIEYL	PECMKVLLDF	CMLHSTEDKS
651	CRD YYIEYNF	KYLQCP LEFT	KKTPTQDVIY	EPLTALNAMV	QNNRIELLNH
701	PVCKEY LLMK	WLAYGFR AHM	MNLGSFCLGL	IPMTILVVNI	KPGMAFNSTG
751	IINETS DHSE	ILD TNS YLI	KTCMILVFLS	SIFGYCKEAG	QIFQQKRN YF
801	MDISNVLEWI	IYTTG IIFVL	PLFVEIP AHL	QWQCGAIAVY	FYWMN FLLYL
851	QRFENG GIFI	VMLE VILKTL	LRSTV VFIFL	LLAFGLSFYI	LLNLQDPFSS
901	PLLSIIQ TFS	MMLGDIN YRE	SFLEPYLRNE	LAHPVLSFAQ	LVSFTIFVPI
951	VLMNLLIGLA	VG DAE VQKH	ASLKR IAMQV	ELHTSLEKKL	PLWFLRKVDQ
1001	KSTIVYP NKP	RSGGMLF HIF	CFL FCT GEIR	QEIPNADKSL	EMEILKQKYR
1051	LK DLTF LLEK	QHELIK LIIQ	KMEI SETED	DDSHCSFQDR	FKKEQMEQRN
1101	SR WNTV LRAV	KAKTHLEPT	STRPLE MESD	ESGLPAMEIE	CRITGTLNGV
1151	RFELVGGGEG	TPEQGR MTNK	MKSTKGALTF	SPYLLSHVMG	YGFYHFGTYP
1201	SGYENP FLHA	INN GGY TNTR	IKKYEDGGVL	HVSFSYRYEA	GRVIGDFQVM
1251	GTGFP EDSVI	FTDKI IRSNA	TVEHLHPMGD	NDLDGSFTRT	FSLR DGGYYS
1301	SVVDSHM HPK	SATHP SILQN	GGPMFA FRV	EEDHSN TELG	IVEYQHAFKT
1351	PDADAGE ERY				

Příloha 3: Pokrytí sekvence (červené písmo) mutantu Y726F TRPA1-tGFP, které bylo detekováno metodou MS a následně vyhodnoceno v programu mMass (manuální vyhodnocení) a programem MASCOT. Ze 1119 aminokyselin sekvence TRPA1 bylo detekováno 411 aminokyselin, z 240 aminokyselin tGFP bylo pokryto 112 aminokyselin. Celkově bylo detekováno 523 z 1359 aminokyselin s celkovým pokrytím 39 %. Zelená – sekvence tGFP, žlutá – raménko, modrá – místo pro restriktázu.

