

ABSTRAKT

Tato disertační práce pojednává o charakterizaci vazebných míst pro kalcium vázající protein S100A1 a fosfatidylinositol fosfáty na intracelulárních koncích transient receptor potential (TRP) kanálů, a to především z rodin kanonických (TRPC), vaniloidních (TRPV) a melastatinových (TRPM). TRP kanály reprezentují superrodinu důležitých zprostředkovatelů dějů, které se odehrávají především v oblasti senzorické physiologie: přispívají k detekci chuti, rovnováhy těla, zraku, sluchu, hmatu a k sensibilitě vůči teplotním a tlakovým vjemům vnějšího prostředí. Tyto kanály slouží jako specializované neselektivní a nociceptivní membránové receptory zodpovědné za modulaci sil, které řídí vstup kationtů do buňky. TRP kanály jsou tvořeny šesti transmembránovými doménami s N- a C- terminálními konci vyskytujícími se v intracelulární oblasti. Celkem čtyři monomerní jednotky tvoří charakteristické uspořádání funkčního kanálu. Bylo prokázáno, že většina členů této téměř třicetičlenné rodiny transportérů je aktivována různorodými stimuly působícími jako signální integrátory. Z nejvíce prozkoumaných intracelulárních modulátorů TRP kanálů jsou cytosolické kalcium vázající proteiny a fosfatidylinositol fosfáty (PIPs) ukotvené na vnější straně cytoplazmatické membrány. Tyto signální integrátory váží specifické domény v intracelulárních koncích TRP kanálů, tím mění jejich strukturu a aktivují či inhibují transportní funkci receptoru. K identifikaci zcela nových vazebných míst ligandů v oblastech intracelulárních konců TRP kanálů jsme využili především biofyzikálních metod. Nejprve jsme identifikovali rezidua pozitivně nabitých aminokyselin účastnících se interakce s S100A1 pomocí metod stacionární fluorescenční anisotropie. Toto vazebné místo bylo potvrzeno jako mnohonásobné vazebné místo pro kalcium vázající protein, vzhledem k již dříve potvrzené identifikaci vazby kalmodulinu do stejné oblasti. Další S100A1 vazebné místo bylo charakterizováno pomocí metod stacionární fluorescenční anisotropie a povrchové plasmonové resonance v C-terminální oblasti TRPV1 kanálu. Vazebná doména TRPV1 kanálu byla opět potvrzena jako mnohonásobné vazebné místo, vzhledem k tomu že vazba kalmodulinu a fosfatidylinositol-4,5 bisfosfátu byla již v minulosti v této oblasti charakterizována. U rodiny TRP melastatinových kanálů jsme se zaměřili na členy TRPM1 a TRPM4, u kterých jsme pomocí povrchové plasmonové resonance identifikovali PIPs vazebné místo v distální a proximální oblasti N- konce kanálů. Identifikovali jsme důležitá rezidua argininů či lysinů účastnících se tvorby TRPM/PIPs komplexů. Shrnuto dohromady, naše studie demonstruje identifikaci a charakterizaci nových vazebných míst pro kalcium vázající proteiny a fosfatidylinositol fosfáty u TRPC6, TRPV1, TRPM1 a TRPM4 kanálů. Zjištění uvedená v této disertační práci zlepšují informovanost o potenciální modulaci těchto receptorů, která může vést k cílenému ovlivnění transportu kationtů a tím možné léčbě chorob spojených s poruchami TRP kanálů.