

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta



**TRP iontové kanály:
molekulární detektory fyziologických a bolestivých teplot**

HABILITAČNÍ PRÁCE

RNDr. Viktorie Vlachová, DrSc.

Praha, 2022

Obsah

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Úvod..... | 5 |
| 2 | Přehled současného stavu poznání..... | 6 |
| 2.1 | Teplotně aktivované TRP (termoTRP) iontové kanály | 6 |
| 2.2 | Mechanismy teplotní aktivace TRP..... | 7 |
| 2.3 | Bimodální aktivace; „U“ charakter teplotní závislosti termoTRP..... | 8 |
| 2.4 | Evoluční souvislosti jako nástroj ke studiu struktury a funkce | 9 |
| 3 | Cíle | 11 |
| 4 | Metody..... | 11 |
| 4.1 | Elektrofyzilogické techniky..... | 11 |
| 4.2 | Metody cílené mutagenese | 12 |
| 4.3 | Heterologní exprese TRP kanálů | 12 |
| 4.4 | Molekulární modelování | 12 |
| 4.5 | Analýza dat a statistické metody vyhodnocení..... | 13 |
| 5 | Výsledky a diskuse | 14 |
| 5.1 | Strukturní determinanty teplotní aktivace TRPV1 | 14 |
| 5.2 | Určení molekulární podstaty regulace TRPV3 teplem | 17 |
| 5.3 | Mechanismy polymodální aktivace TRPA1 | 19 |
| 5.3.1 | Strukturně-funkční charakterizace transmembránové oblasti TRPA1..... | 19 |
| 5.3.2 | Mutace TRPA1-N855S zodpovědná za familiální epizodický bolestivý syndrom u lidí | 22 |
| 5.3.3 | Cytoplazmatická oblast TRPA1: potenciální místo fosforylace | 24 |
| 5.3.4 | Distální C-konec jako možné místo interakce TRPA1 s vápenatými ionty | 26 |
| 5.3.5 | Regulace TRPA1 fosfolipidy | 27 |
| 5.3.6 | Teplotní regulace TRPA1 | 30 |
| 5.4 | Modulační mechanismy chladové a chemické aktivace TRPM8..... | 31 |
| 5.5 | Aktivace TRPC5 chladem..... | 32 |
| 6 | Shrnutí a závěr | 35 |
| 7 | Literární odkazy..... | 36 |
| 8 | Použité zkratky..... | 44 |
| 9 | Seznam vybraných publikací autorky s IF | 45 |
| 10 | Přílohy | 51 |

1 Úvod

Schopnost detekovat a kódovat změny vnitřní a okolní teploty je nezbytná pro přežití všech živých organismů. U vyšších živočišných druhů tato schopnost závisí na aktivaci iontových kanálů, které při překročení určitého fyziologického teplotního prahu zvyšují pravděpodobnost otevření, čímž umožní depolarizaci buněčné membrány a vznik nervového signálu, jenž je veden do centrální nervové soustavy a následován obrannou reakcí. Významnou skupinou teplotně aktivovaných kanálů je specifická podskupina tranzientních receptorových potenciálových (TRP) kanálů známých jako termoTRP (Latorre et al., 2007; Garcia-Avila and Islas, 2019). Tyto membránové proteiny slouží jako molekulární teplotní senzory, které jsou kromě změn teploty aktivovány také různými fyzikálními a chemickými podněty. Z hlediska vyhledávání účinných látek s potenciálním analgetickým účinkem jsou intenzivně studovány farmakologické, funkční a strukturální vlastnosti termoTRP receptorů, které se v hojné míře nacházejí na periferních zakončeních primárních aferentních sensorických neuronů, kde zprostředkovávají odpověď na akutní bolestivé, dráždivé a pálivé podněty (Moran, 2018). Prototypickým zástupcem této skupiny receptorů je vaniloidní, také zvaný kapsaicinový receptor TRPV1, iontový kanál aktivovaný dráždivým alkaloidem obsaženým v pálivých paprikách, jehož molekulární identifikace patří mezi hlavní historické mezníky ve výzkumu vlastností polymodálních nociceptivních neuronů a mechanismů bolesti (Caterina et al., 1997).

Během posledního čtvrtstoletí došlo ve výzkumu termoTRP receptorů k významnému pokroku, který umožnil detailní pochopení mechanismů jejich aktivace na systémové, buněčné, molekulární a dokonce i atomární úrovni. Udělení Nobelovy ceny za fyziologii a lékařství v roce 2021 průkopníkům tohoto oboru Davidu Juliusovi a Ardemu Patapoutianovi znamenalo završení mimořádně důležité etapy výzkumu, která identifikovala a potvrdila fyziologický význam této pozoruhodné skupiny proteinů při detekci bolestivých i nebolestivých teplých a chladných podnětů (Julius, 2013; Vriens et al., 2014). Z jedenácti dosud identifikovaných savčích termoTRP kanálů lze pět aktivovat teplem ($> 38^{\circ}\text{C}$, TRPV1-3, TRPM2-3), tři mírným teplem ($> 25^{\circ}\text{C}$, TRPM4-5, TRPV4) a tři chladem ($< 20^{\circ}\text{C}$, TRPM8, TRPA1 a TRPC5) (Wang and Siemens, 2015; Garcia-Avila and Islas, 2019; Buijs and McNaughton, 2020; Bamps et al., 2021).

Stále se rozšiřuje množina poznatků, které experimentálně potvrzují aktivní zapojení jednotlivých termoTRP receptorů v mechanismech převodu nociceptivních podnětů. Přibývají genetické, farmakologické a funkční studie, které odhalují a popisují překvapivé vlastnosti různých látek z hlediska účinků na termoTRP kanály, některé z těchto studií již pokročily do různých fází preklinických studií (www.clinicaltrials.gov, NCT 04044742, NCT 00804154, NCT02558439, 2022). Například účinné ligandy TRPV1 a TRPA1 receptorů jsou slibnými látkami testovanými v souvislosti léčení neuropatické a zánětlivé bolesti, včetně periferní diabetické neuropatie, bolesti vyvolané chemoterapií, dentální, osteoartritické a postoperativní bolesti, ale i chronického kašle a pruritu (Koivisto et al., 2022). Klíčovou snahou současného neurofyziologického výzkumu v této oblasti studia je proto na základě přesné funkční a strukturální charakteristiky porozumět molekulární podstatě aktivace lidských ortologů termoTRP proteinů a nalézt možnosti, jak jejich funkci farmakologicky ovlivnit. Zdokonalené moderní techniky strukturální biologie, zejména metody kryoelektronové mikroskopie včetně algoritmů jednočásticové analýzy, umožnily ve zcela nedávné době popsat struktury některých

termoTRP kanálů v atomovém rozlišení ($< 3 \text{ \AA}$), a to ve formě jak apoproteinů, tak konformací se specifickým ligandem (Diver et al., 2022). Porovnání těchto struktur je významným nástrojem pro získávání naší představy o tom, jak termoTRP receptory fungují a které jejich funkční části (domény) jsou důležité pro vazbu ligandů, aktivaci změnami teploty a převod těchto dějů na otevření iontových kanálů.

Součástí předložené habilitační práce je soubor vybraných studií, jejichž snahou bylo v průběhu let 2003 – 2022, vždy v daném znalostním kontextu, přispět k odpovědi na nesnadnou klíčovou otázku: Jaká je molekulární podstata teplotní aktivace TRP kanálů? V posledních několika letech jsme svědky významných objevů, které nás k zodpovězení této otázky nepochybně přibližují.

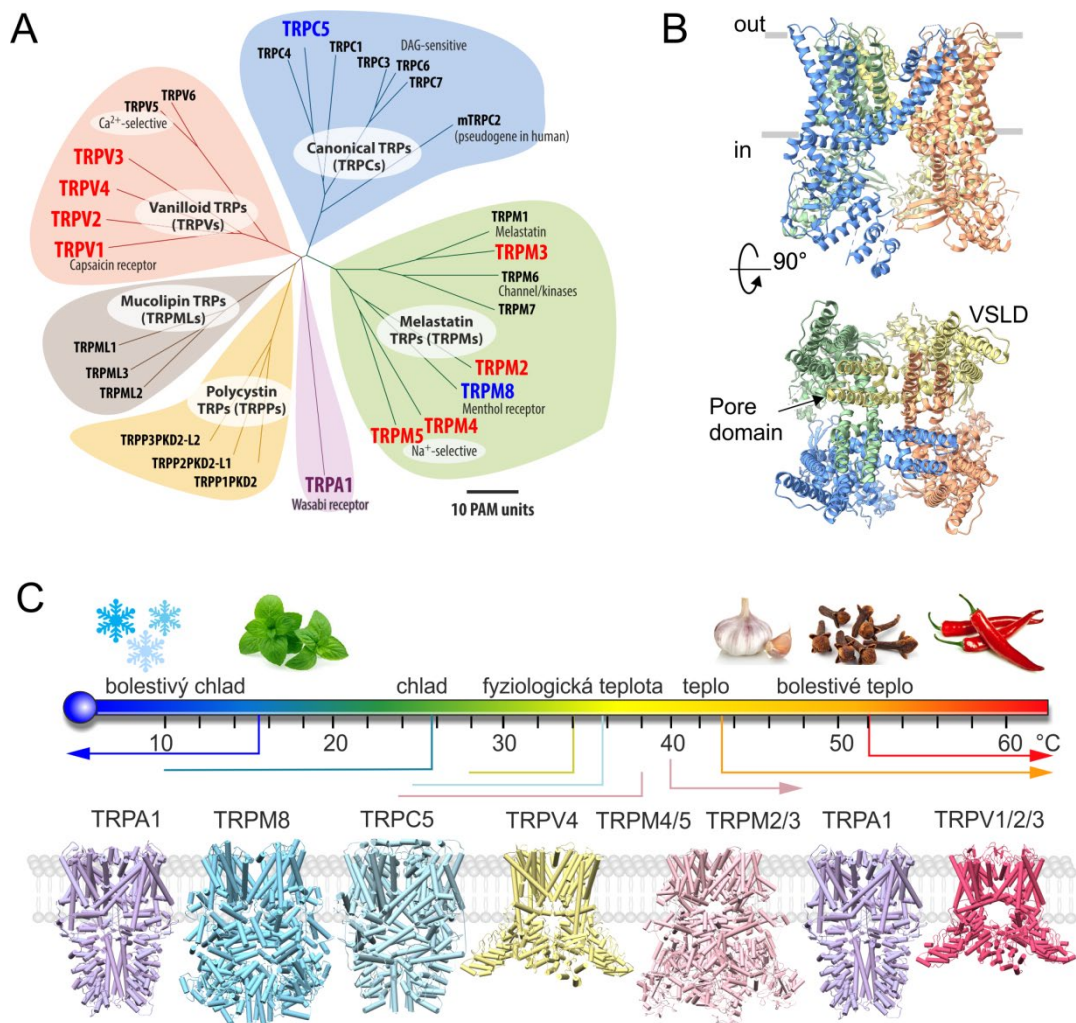
2 Přehled současného stavu poznání

2.1 Teplotně aktivované TRP (termoTRP) iontové kanály

Teplotně aktivované TRP (termoTRP) iontové kanály jsou specifickou podskupinou 11 členů rozsáhlé rodiny TRP receptorů, která u savců zahrnuje 28 proteinů rozdělených na základě sekvenční homologie do 6 podrodin: vaniloidní (TRPV), melastatinové (TRPM), kanonické (TRPC), ankyrinové (TRPA), polycystinové (TRPP) a mukolipinové (TRPML) (Venkatachalam and Montell, 2007). Základní rozdělení a topologické uspořádání jednotlivých termoTRP je shrnuto na Obr. 1. TermoTRP kanály se nacházejí v podrodinách TRPA, TRPV, TRPC a TRPM a od ostatních TRP kanálů se odlišují tím, že změna teploty nejen moduluje jejich aktivitu, ale vyvolává konformační přechod do otevřeného stavu. Teplotní závislost pravděpodobnosti otevření termoTRP kanálů je obvykle kvantifikována pomocí fyzikální veličiny entalpie (ΔH), přičemž teplem aktivované kanály jsou charakterizovány pozitivní hodnotou ΔH , zatímco chladem aktivované kanály mají hodnoty ΔH negativní. Tento parametr může být až přibližně $\pm 200 \text{ kcal/mol}$ (Voets, 2012)(Obr. 2A,B). Za termoTRP jsou považovány TRP kanály, které vykazují následující biofyzikální a funkční charakteristiky: a) strmá teplotní závislost aktivity v příslušném teplotním intervalu, vyjádřená jako teplotní koeficient Q_{10} vyšší než 5 (kanály aktivované teplem), nebo nižší než 0.2 (kanály aktivované chladem), b) funkční exprese v buněčných typech, které jsou běžně vystaveny významným teplotním změnám (typicky volná nervová zakončení, keratinocyty, oči, ústa, jícn, horní dýchací cesty), c) prokázaná *in vivo* účast TRP kanálu v teplotní závislosti fyziologických nebo patofyziologických procesů.

Přestože základní topologické uspořádání všech TRP kanálů je podobné a zahrnuje homologní strukturní domény nejen v transmembránové oblasti (např. N-konec obsahuje ankyrinové repetice, C-konec obsahuje TRP doménu s konzervovanou aminokyselinovou sekvencí EWKFAR), není zatím objasněno, které domény určují specifickou teplotní citlivost termoTRP kanálů (Obr. 2C). Existuje několik odlišných - ale vzájemně se nevylučujících - mechanismů, které mohou ke strmé teplotní závislosti přispívat: 1) fázový přechod lipidů v plazmatické membráně, 2) změna koncentrace ligandů kanálu, 3) ovlivnění procesů posttranslační modifikace, např. fosforylace, 4) změna konformace a lokalizace pomocné podjednotky regulující kanál a 5) teplotně vysoce závislá konformační změna samotného kanálového komplexu. Poslední uvedený mechanismus byl prokázán např. pro purifikované TRPV1 (Cao et al., 2013a), TRPV3 (Singh et al., 2019), TRPA1 (Moparthi et al., 2016) a TRPM8 (Zakharian et al.,

2010) rekonstituované v umělých lipidových membránách. Naproti tomu aktivace TRPM3 teplem vyžaduje přítomnost fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu (PIP₂) v plazmatické membráně (Uchida et al., 2016).



Obr. 1

Strukturní charakteristiky TRP kanálů. (A) Genetický strom superrodiny TRP proteinů (PAM, point accepted mutation). Vyznačeny jsou teplem aktivované (červeně) a chladem (modře) aktivované termoTRP receptory. TRPA1 (vyznačen fialově) lze aktivovat teplem i chladem. (B) Tetramerická architektura TRP kanálů s vyznačenou senzorem doménou (VSLD) a pórovou doménou. Podjednotky jsou tvořeny šesti transmembránovými helixy (S1-S6) a cytoplazmatickými C- a N-konci. Upraveno podle (Diver et al., 2022). (C) Schematické znázornění teplotních prahů pro aktivaci savčích termoTRP kanálů. Některé typické exogenní aktivátory termoTRP jsou zobrazeny v horní části obrázku. Vytvořeno autorkou na základě ilustrace připravené pro Univerzitu Karlovu u příležitosti udělení Nobelovy ceny 2021 D. Juliusovi a A. Patapoutianovi (<https://cuni.cz/UK-6311.html?news=13590&locale=cz>, 4.5.2022).

2.2 Mechanizmy teplotní aktivace TRP

Přestože v posledních několika letech byla publikována celá řada struktur TRP kanálů (Cao, 2020; Diver et al., 2022), struktura otevřené konformace přirozeného typu termoTRP kanálu aktivovaného změnou teploty byla zveřejněna teprve v polovině roku 2021 (Nadezhdin et al., 2021). Struktura myšního TRPV3 kanálu aktivovaného teplem v rozlišení až 2 Å byla získána

pomocí fyziologicky relevantního teplotního protokolu (opakované aplikace teplotních skoků z 25°C na 42-48°C) a v této souvislosti lze uvést, že tato průlomová studie je jednou ze součástí předkládané práce.

První čtyři struktury TRP kanálu ve vysokém rozlišení (2.9-3.4 Å) publikované v roce 2013 prokázaly existenci několika různých konformačních stavů TRPV1 receptoru v přítomnosti kapsaicinu, resiniferatoxinu a molekuly toxinu DkTx stabilizující pór kanálu (PDB: 3j5q, 3j5r, 3j5p, 3j9j)(Liao et al., 2013). Studie publikovaná o tři roky později odhalila důležitou úlohu anulárních a integrálních regulačních lipidů v aktivaci TRPV1 kapsaicinem (Gao et al., 2016). Byla vyslovena hypotéza, že fosfatidylinosity jsou pevně vázanými kofaktory stabilizujícími zavřený stav kanálu, působícími jako negativní alosterické modulátory a kompetitivní antagonisté receptorů na vazebném místě pro vaniloidy. Současně tyto fosfolipidy působí jako pozitivní, obligátní kofaktory, jejichž vazba na zavřený stav kanálu musí předcházet následné aktivaci vaniloidy nebo jinými aktivátory, včetně tepla. Skutečnost, že otevření TRPV3 kanálu teplem prokazatelně předchází uvolnění lipidu z vazebného místa pro vaniloidy (Nadezhdin et al., 2021), podporuje uvedenou hypotézu, která je pravděpodobně součástí obecného mechanismu aktivace termoTRP kanálů změnami teplot. Zatím není publikována struktura TRP kanálu otevřeného chladem. Naše představa o možném mechanismu otvírání/zavírání (vrátkování, hradlování) kanálů se tak opírá o struktury TRPM8, TRPA1 a TRPC5 v různých konformačních stavech zachycených v přítomnosti ligandů.

2.3 Bimodální aktivace; „U“ charakter teplotní závislosti termoTRP

Zvláštním případem termoTRP kanálu je TRPA1, který lze aktivovat jak teplem, tak chladem (Moparthi et al., 2016). Možné fyzikální vysvětlení bimodálního chování teplotně aktivovaných TRP kanálů předložili v roce 2011 autoři Clapham a Miller (Clapham and Miller, 2011): Změny vyvolané teplem nebo chladem mění rovnováhu mezi dvěma různými konformacemi proteinu (zavřeným a otevřeným stavem kanálu). Přejít mezi těmito stavy je definován rozdílem standardní Gibbsovy volné energie mezi oběma konformacemi za konstantního tlaku:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ, \quad (1)$$

kde T je absolutní teplota a ΔH° and ΔS° jsou změny standardní entalpie a standardní entropie, které jsou závislé na teplotě, pokud je přechod mezi dvěma stavy doprovázen změnou molární tepelné kapacity, ΔC_p . Rovnováha mezi otevřeným a zavřeným stavem kanálu je definována rovnicí:

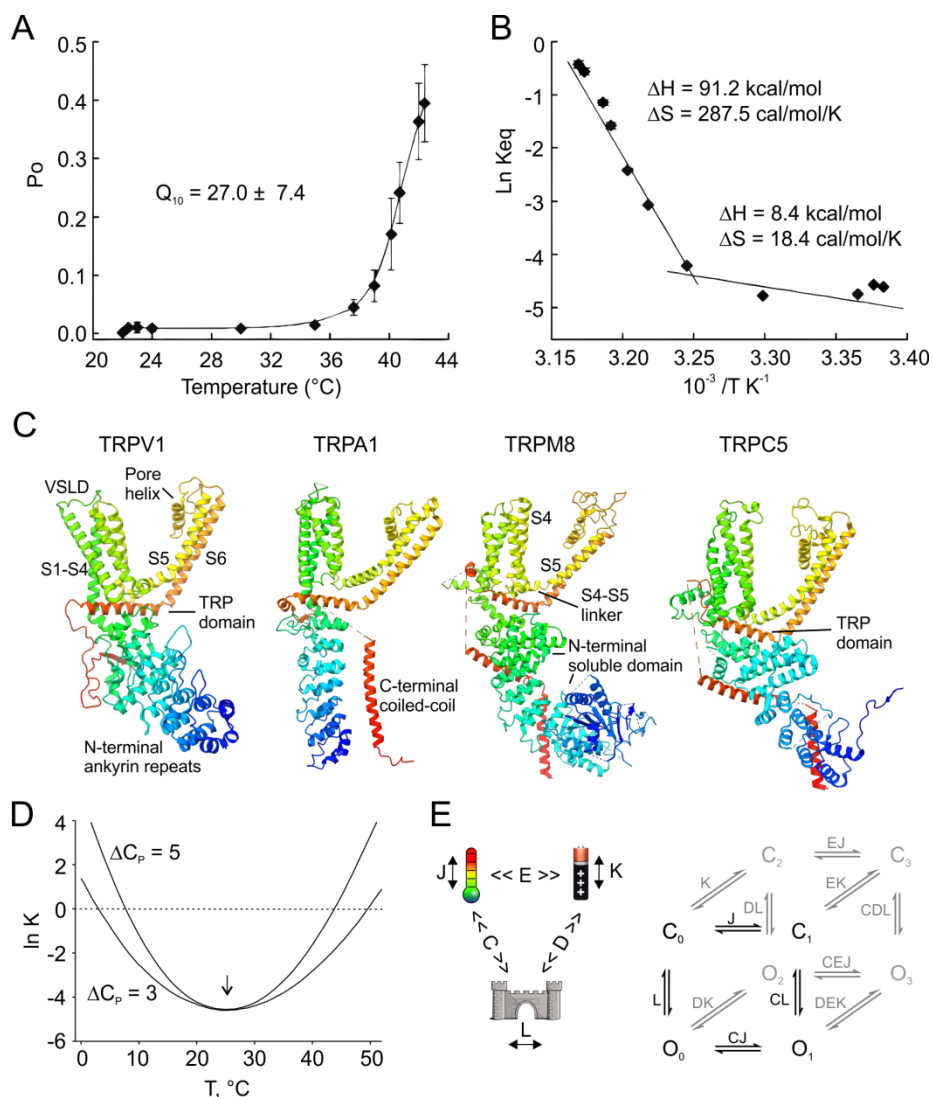
$$\ln K = \frac{\Delta S^\circ(T_0)}{R} - \frac{\Delta C_p \left[1 - \frac{T_0}{T} + \ln\left(\frac{T_0}{T}\right) \right]}{R}, \quad (2)$$

kde T_0 je teplota odpovídající bodu minimální hodnoty K , kdy $\Delta H^\circ(T_0) = 0$, R je univerzální plynová konstanta ($1.987 \text{ cal}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$). Tato závislost má tvar „U“ se dvěma body, ve kterých je $\ln K = 0$. To znamená, že existují dvě různé teploty, kdy je dosažena rovnováha mezi zavřeným a otevřeným stavem, přičemž hodnota ΔC_p určuje strmost teplotní závislosti (Obr. 2D). Z této úvahy plyne, že všechny teplotně citlivé kanály se mohou teoreticky chovat jako teplem i chladem aktivované kanály, pokud je experimentálně možné dosáhnout příslušných teplotních intervalů (Clapham and Miller, 2011). Kladná hodnota tepelné kapacity je odrazem změny prostorového uspořádání/složení částí funkčního TRP proteinu, která exponuje

hydrofobní rezidua do vodného prostředí (10 - 20 hydrofobních postranních řetězců jedné podjednotky). Tato hypotéza byla v nedávné době experimentálně podpořena studií, ve které byly u TRPV1 a TRPM8 identifikovány skupiny reziduí, které podléhají konformačním změnám při aktivaci teplotou pomocí analýzy dostupných proteinových struktur nebo hmotnostní spektroskopie s otiskem hydroxylových radikálů (HRF-MS). Pomocí systematické mutagenese bylo zjištěno, že teplotní citlivost kanálů se mění v závislosti na hydrofobicitě postranních řetězců. Změny energie spojené se změnami interakcí voda-protein byly dostatečné pro teplotní aktivaci (Xu et al., 2022). Jiný zvažovaný mechanismus, který byl navržen k vysvětlení bimodální aktivace termoTRP receptorů, je popsán alosterickým modelem, který předpokládá existenci dvou nezávislých senzorů, napěťového a teplotního, propojených s hradlem kanálu (Obr. 2E). Každý z těchto tří modulů je charakterizován rovnovážnou konstantou mezi svými dvěma stavy (neaktivní-aktivovaný, zavřený-otevřený), přičemž rovnovážné konstanty charakterizující spřažení mezi jednotlivými moduly určují, zda aktivace teplotního a napěťového senzoru usnadňuje, nebo naopak brání otevření kanálu (Jara-Oseguera and Islas, 2013). Existují experimentální důkazy částečně podporující obě hypotézy (Jara-Oseguera and Islas, 2013; Arrigoni and Minor, 2018; Sinica et al., 2019), není tedy zatím zřejmé, zda teplotní citlivost termoTRP kanálů je lokalizovanou vlastností určité domény (teplotní senzor), nebo je integrována v rámci celého proteinu. Pomocí cílené mutagenese byly identifikovány četné záměny postranních řetězců v různých doménách měnící teplotní citlivost různých termoTRP kanálů, včetně spojovací oblasti mezi ankyrinovou doménou a S1, senzorové domény S1-S4, pórové domény, TRP helixu a C-konce. Tyto oblasti v souhrnu tvoří většinu proteinového komplexu kanálu, což spíše nasvědčuje distribuovanému charakteru detekce teploty (Nadezhdin et al., 2021).

2.4 Evoluční souvislosti jako nástroj ke studiu struktury a funkce

Většina poznatků o fyziologické úloze termoTRP pochází z pokusů na myších a potkanech, zatímco ostatní obratlovci jsou prozkoumáni podstatně méně. Nedávné studie ukázaly, že některé druhy z různých řádů obratlovců využívají odlišné molekulární mechanismy k přizpůsobení se svým fyziologickým a behaviorálním potřebám. Toto zjištění bylo poněkud neočekávané vzhledem k relativně vysoké míře konzervovanosti mezi ortology známých termoTRP receptorů (Gracheva and Bagriantsev, 2015). Experimentální výsledky ukázaly, že původní klasifikace termoTRP receptorů jako teplotních senzorů specifických pro chlad, teplo nebo horko, není přesná. TermoTRP kanály jsou aktivovány v teplotních rozmezích, které se mohou velmi lišit v závislosti na živočišném druhu a interakci s konkrétním biologickým kontextem. Systematická porovnávání funkčních vlastností jednotlivých ortologů metodami cílené mutagenese významně napomohla k odhalení funkčních determinantů teplotní i chemické aktivace TRPV1 (Laursen et al., 2016), TRPM8 (Matos-Cruz et al., 2017) a TRPA1 (Gracheva and Bagriantsev, 2015). Z tohoto hlediska je nejlépe prostudovaným termoTRP kanálem TRPA1, který byl dlouho považován pouze za chladový receptor (Story et al., 2003; Bandell et al., 2004). V nedávné době bylo prokázáno, že TRPA1 je společně s TRPV1 a TRPM3 nezbytný pro detekci bolestivého tepla u myši (Vandewauw et al., 2018). Purifikovaný lidský TRPA1 protein vytváří v umělých membránách funkční kanál, který lze aktivovat teplem (>35 °C) i chladem (<15°C) (Moparthy et al., 2016). Podrobnému porovnání funkce a struktury lidského a myšičího ortologu TRPA1 je také věnována část předložené práce.



Obr. 2

Teplotní a strukturální charakteristiky termoTRP kanálů. (A) Teplotně závislé změny pravděpodobnosti otevření (P_o) TRPV3 kanálu. V intervalu 36–42°C je teplotní závislost vyjádřena teplotním koeficientem Q_{10} . (B) Z Van't Hoffova vynesení rovnovážné konstanty K_{eq} jako funkce převrácené hodnoty absolutní teploty byly odhadnuty průměrné hodnoty změny entalpie a entropie v intervalech 22–36° a 36–42°C. Převzato z publikace (Nadezhdin et al., 2021). (C) Základní architektura strukturálních domén podjednotek kanálů TRPV1 (PDB: 7L2P), TRPA1 (PDB: 6V9V), TRPM8 (PDB: 6O77) a TRPC5 (PDB: 7D4P). Barvy odpovídají vyznačeným doménám. Transmembránová oblast každé podjednotky obsahuje dva moduly: doménu podobnou napěťovému senzoru, která je tvořena prvními čtyřmi α -helixy (S1–S4; VSLD), pórovou doménu tvořenou posledními dvěma α -helixy (S5 a S6) a pórovou kličkou (P) mezi S5 a S6 obsahující krátký α -helix (dva α -helixy v případě TRPA1). Tyto dva moduly jsou spojeny linkerem S4–S5. TRP doména (u TRPA1 označovaná TRPL) je konzervovaná oblast, jež má klíčovou úlohu v alosterické aktivaci kanálů. Upraveno podle (Diver et al., 2022). (D) Graf teplotní závislosti rovnovážné konstanty pro dva konformační stavy proteinu podle rovnice (1) pro uvedené ΔC_p ($\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$) a $T_0 = 25^\circ\text{C}$ (šipka). (E) Alosterický model pro teplotní a napěťovou aktivaci termoTRP kanálů (Jara-Oseguera and Islas, 2013). Přechod mezi zavřeným a otevřeným stavem je dán rovnovážnou konstantou L , přechody mezi neaktivní a aktivní konformací teplotního a napěťového senzoru jsou popsány rovnovážnými konstantami: $J(T) = \exp[-(\Delta H^\circ - T\Delta S^\circ)/RT]$ a $K = K(0) \exp(zFV/RT)$. Spřažení napěťového senzoru s hradlem kanálu a teplotním senzorem jsou řízena alosterickými konstantami D and E , které jsou teplotně nezávislé. Spřažení teplotního senzoru a hradla je závislé na teplotě: $C(T) = \exp[-(\Delta H_c^\circ - T\Delta S_c^\circ)/RT]$. S využitím alosterického modelu je možné popsat bimodální aktivaci termoTRP kanálů.

3 Cíle

- a) Určit strukturní úlohu pórové domény, S4-S5 linkeru a cytoplazmatického C-konce v teplotní, chemické a napěťové aktivaci **TRPV1** receptoru. Popsat mechanismy desenzitizace a modulace gadolнием a oxidačními a redukčními látkami.
- b) Charakterizovat aktivační vlastnosti **TRPV3** receptoru, mechanismy jeho modulace prostřednictvím fosforylace a určit úlohu cytoplazmatického rozhraní mezi podjednotkami v teplotní aktivaci a senzitivaci
- c) Identifikovat strukturní determinanty polymodální regulace **TRPA1** kanálu, určit možný účinek fosfolipidů a porovnat myší a lidský ortolog z hlediska teplotní aktivace
- d) Popsat parametry chladové aktivace **TRPM8** a **TRPC5** receptorů a určit, zda a případně do jaké míry je teplotní práh pro aktivaci determinován fosfolipidy či signálními drahami

4 Metody

4.1 Elektrofyziologické techniky

Pro snímání membránových proudů z HEK293T (v některých případech také z F11 a HaCaT) buněk byla používána elektrofyziologická technika terčíkového zámku (angl. *patch-clamp*). Proudové odpovědi byly snímány pomocí zesilovače Axopatch (200B nebo 1D, Molecular Devices, USA) buď z celých buněk (konfigurace *whole-cell*), nebo byla měřena aktivita jednotlivých kanálů (konfigurace *cell-attached*). Proudové odpovědi byly zaznamenávány pomocí analogově-digitálního převodníku (Digidata 1300, 1400, nebo 1440B) prostřednictvím softwaru pCLAMP (verze 9, 10 nebo 11, Molecular Devices, USA) programem Clampex. Roztoky byly aplikovány na buňky pomocí gravitačního aplikačního systému, který přivádí jednotlivé experimentálními roztoky teflonovými hadičkami do společného svazku skleněných kapilár, ústících v centrální skleněné kapiláře (Dittert et al., 2006). Teplota roztoků procházejících horní částí skleněné kapiláry je nastavena pomocí tepelného výměníku řízeného miniaturním Peltierovým článkem, který nastavuje iniciální hodnotu teploty (chlad, nebo teplo). Dolní část kapiláry je pokryta hustě vinutým izolovaným měděným drátkem (délka 5 mm) připojeným ke zdroji stejnosměrného proudu pro odporový ohřev, který nakonec reguluje teplotu roztoku na zvolenou hodnotu. Peltierův článek a topné těleso jsou elektricky propojeny se sondou, která je upevněna na mikromanipulátoru pro polohování soustavy kapilár. Teplota proudícího roztoku je měřena miniaturním termočlánkem vloženým do výstupní kapiláry v blízkosti jejího ústí, které je umístěno ve vzdálenosti menší než 100 μm od povrchu měřené buňky. Pomocí systému je možno na buňky aplikovat až sedm různých experimentálních roztoků, dostatečně rychlé a přesně definované časové průběhy změn teploty roztoku jsou zajištěny pomocí napětí generovaného programem Clampex (verze 9, 10, nebo 11) prostřednictvím rozhraní Digidata (1300, 1400, nebo 1440B) současně s dostatečným plynulým odsáváním kapaliny přitékající do misky. Teplota je řízena buď automaticky, nebo manuálně. Systém umožňuje aplikovat změny teploty v rozsahu 5-60 $^{\circ}\text{C}$ při maximální rychlosti -40 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ až ~ 110 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$.

4.2 Metody cílené mutagenese

Metoda polymerázové řetězové reakce (angl. Polymerase Chain Reaction, PCR) byla využita pro vnesení mutací do primární sekvence vybraných termoTRP proteinů podle postupu doporučeného výrobcem QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Thermo Fisher Scientific). Po dokončení PCR reakce byly vzorky inkubovány jednu hodinu v termostatu (37 °C, 5% CO₂) s 1 μl restriktivního enzymu DpnI (10 U/μl) a každých 15 minut vortexovány. PCR produkty byly ověřeny pomocí horizontální elektroforézy a sekvenací.

4.3 Heterologní exprese TRP kanálů

Plazmidy kódující přirozený typ (angl. wild-type, WT) TRP proteinu, nebo plazmidy se zavedenou mutací byly do lidských embryonálních ledvinných (HEK293T) buněk vpraveny magnetem asistovanou transfekcí (MATra) pomocí nanočástic (IBA GmbH, Německo). Do zkumavky byla připravena směs obsahující 50 μl média Opti-MEM, příslušný objem komerčního transfekčního činidla MATra (0,7 μl MATra/600 ng DNA) a do řádně promíchané směsi bylo přidáno 300-400 ng plazmidu kódujícího TRP a 200 ng plazmidu kódujícího zelený fluorescenční protein (EGFP, ve vektoru pQBI 25). V některých definovaných případech byly současně transfekovány další plazmidy (200 ng DNA kódující protein, obvykle ve vektoru pCMV6-XL5). Po 20-ti minutové inkubaci byl plný objem směsi pipetován do jamky s konfluentně narostlými HEK293T buňkami. Jamka s buňkami byla 20-30 minut inkubována na magnetické desce a po odstranění starého média byly buňky opláchnuty fosfátovým pufrům (PBS, 1 ml) a po dobu 2 minut inkubovány s 0,5 ml Versenova roztoku s trypsinem (5% CO₂, 37 °C). Uvolněné buňky byly rozmíchány v 0,8 ml 5% fetálního telecího séra (FTS) a 1-2 kapky buněčné suspenze byly přidány do 2 ml 5% FTS v jamce se sklíčkem pokrytým poly-L-lysinem. Transfekované buňky byly inkubovány v termostatu (5% CO₂, 37 °C). Pro elektrofyziologická měření byly buňky využívány 24 až 48 hodin po transfekci (hustota přibližně 180 000 buněk·cm⁻²).

4.4 Molekulární modelování

Až do roku 2013, kdy byla publikována první struktura TRPV1 ve vysokém rozlišení (Liao et al., 2013), byly pro molekulární modelování TRP kanálů využívány homologní modely vytvořené na základě krystalových struktur proteinů vykazujících homologií primární aminokyselinové sekvence > ~30%. K modelování C-konce TRPV1 (Vlachova et al., 2003) byla využita struktura proteinu FHIT (z angl. fragile histidine triad, PDB: 1FIT). K molekulárnímu dokování kafry byly použity homologní modely TRPV1 vytvořené na základě struktury draslíkového kanálu Kv1.2 (Marsakova et al., 2012) a KcsA (Susankova et al., 2007). Metody homologního modelování byly prováděny ve spolupráci s laboratorní strukturální biologie Ústavu systémové biologie a ekologie AV ČR. Pro ostatní studie publikované po roce 2013 byly využity dostupné struktury TRPV1, TRPV3, TRPA1 a TRPC5. K molekulárnímu dokování byly používány programy AutoDock Vina (Trott and Olson, 2010), AutoDock Tools 4.2 (Sanner, 1999) a Yasara (Krieger and Vriend, 2014). Metody flexibilního fitování a dlouhých simulací molekulární dynamiky za různých teplot byly prováděny ve spolupráci s Fyzikálním ústavem UK Praha a jsou podrobně popsány v jednotlivých publikacích, které jsou součástí předložené práce. Analýza trajektorií byla prováděna v programu UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004).

4.5 Analýza dat a statistické metody vyhodnocení

Elektrofyzilogické záznamy byly analyzovány prostřednictvím softwaru pCLAMP (verze 9, 10 nebo 11, Molecular Devices, USA) programem Clampfit. Parametry napěťové aktivace byly vyhodnoceny převodem membránového proudu na elektrickou vodivost buňky:

$$G = \frac{I}{(V - V_{rev})} \quad (3)$$

kde V_{rev} je reverzní membránový potenciál. Závislost vodivosti na membránovém potenciálu (G/V charakteristika) byla charakterizována pomocí Boltzmannovy funkce:

$$G = G_{min} + \frac{G_{max} - G_{min}}{1 + \exp\left(\frac{zF}{RT}(V - V_{1/2})\right)} \quad (4)$$

kde G_{max} je maximální dosažitelná vodivost; G_{min} je minimální vodivost; F je Faradayova konstanta ($F = 96\,485 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$); V je napětí; $V_{1/2}$ představuje napětí, při kterém vodivost dosahuje poloviční hodnoty svého maxima; R je univerzální plynová konstanta ($R = 8,314 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$), z je vrátkovací náboj a T je absolutní teplota.

Jednotkové proudy, amplitudové histogramy, pravděpodobnost otevření (P_o) a další parametry popisující jednotkovou aktivitu TRPC5 kanálu byly identifikovány a analyzovány programem Clampfit (verze 10.6 a 11.2, Molecular Devices, USA). Teplotní koeficient (Q_{10}) pro jednotkovou amplitudu a P_o byly vypočteny podle rovnice:

$$Q_{10} = \left(\frac{X_2}{X_1}\right)^{\frac{10}{T_2 - T_1}} \quad (5)$$

kde X_1 a X_2 jsou amplitudy, nebo hodnoty P_o získané při teplotách T_1 a T_2 . Pravděpodobnost otevření, P_o , byla vypočtena z hodnoty NP_o , kde počet kanálů na terčiku (N) byl odhadnut na základě amplitudového histogramu konstruovaného z jednotkových proudů snímaných v přítomnosti englerinu A (3 nM) aplikovaného nejméně 2 min. Termodynamické parametry byly odvozeny z Van't Hoffova zobrazení vztahu mezi přirozeným logaritmem rovnovážné konstanty, K_{eq} , kde $K_{eq} = P_o/(1 - P_o)$, a převrácené hodnoty absolutní teploty. Hodnoty změn entalpie a entropie byly vypočteny z lineární části Van't Hoffovy závislosti aproximované funkcí: $\ln(K_{eq}) = -(\Delta H/RT) + (\Delta S/R)$, kde R je univerzální plynová konstanta.

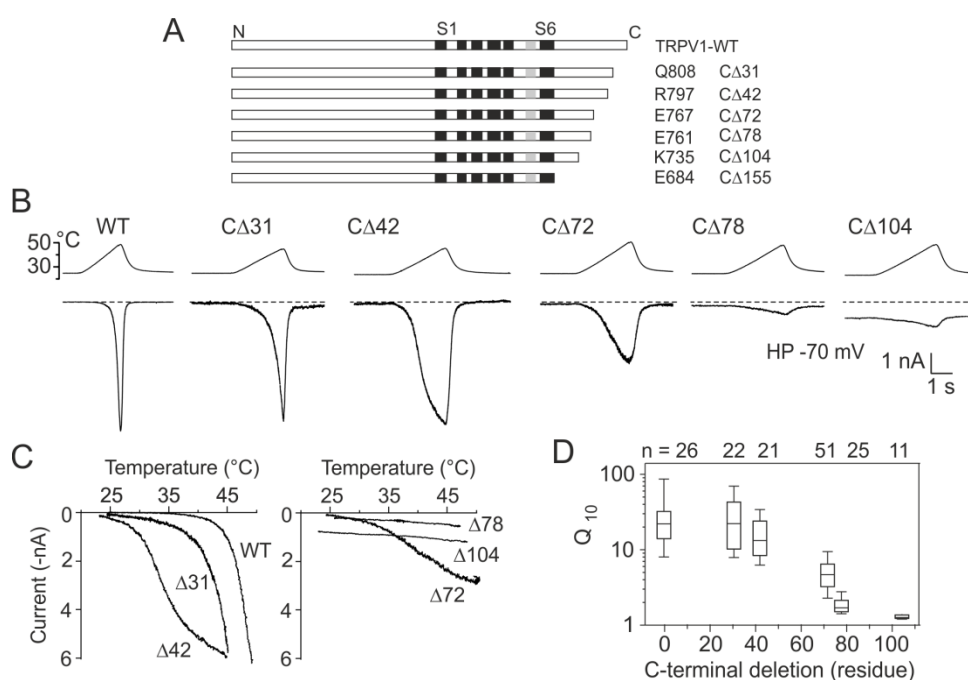
Statistická analýza byla provedena za využití programů SigmaPlot 10.0 (Systat Software Inc., USA) a OriginPro 2021 (OriginLab Corporation, USA). Statisticky významné rozdíly byly určeny podle charakteru dat pomocí Studentova t-testu (párového či nepárového), Mann-Whitney U testem, nebo jednofaktorovou analýzou rozptylu následovanou neparametrickým Dunnetovým testem, nebo parametrickým Bonferroni t-testem. Průměrná data jsou podle charakteru dat prezentována jako průměr \pm střední chyba průměru, S.E.M., nebo jako medián a interkvartilní rozsah.

5 Výsledky a diskuse

(publikace tvořící součást habilitační práce jsou v textu zvýrazněny **modře**)

5.1 Strukturní determinanty teplotní aktivace TRPV1

Oblast cytoplazmatického karboxylového konce (C-konce) patří mezi nejméně konzervované části TRP proteinů (Obr. 2C). Hypotézu, zda rozdíly mezi C-konci receptorů vaniloidní podskupiny mohou být příčinou rozdílného prahu pro jejich teplotní aktivaci, jsme ověřovali pomocí konstruktů TRPV1 s postupně se zkracující aminokyselinovou sekvencí C-konce (Obr. 3). Zjistili jsme, že již zkrácení o 31 aminokyselin statisticky významně změnilo charakteristiky teplotní aktivace. Při zkrácení o 72 aminokyselin se práh pro aktivaci snížil z 41.5°C na 28.6°C; teplotní koeficient Q_{10} klesl z hodnoty 25.6 na 4.7 (Vlachova et al., 2003).



Obr. 3

Zkrácení C-konce TRPV1 snižuje práh pro teplotní aktivaci a strmost teplotní závislosti. (A) Schematické znázornění konstruktů TRPV1 se zkráceným C-koncem. S1-S6, šest transmembránových segmentů a pórová oblast (šedá). (B) Reprezentativní záznamy odpovědí HEK293T buněk exprimujících přirozený typ (WT) TRPV1 a CΔ31, CΔ42, CΔ72, CΔ78 a CΔ104 konstrukty. Teplotní stimul (24 – 49°C; 3 s) zobrazený nad záznamy byl aplikován v kontrolním extracelulárním roztoku. HP, membránový potenciál buněk. (C) Teplotní závislost membránových proudů zobrazených v B. Práh pro aktivaci byl 43.8°C, 38.2°C a 28.9°C pro WT, CΔ31 a CΔ42. (D) Hodnota teplotního koeficientu vynesena v závislosti na délce zkrácení C-konce (Vlachova et al., 2003).

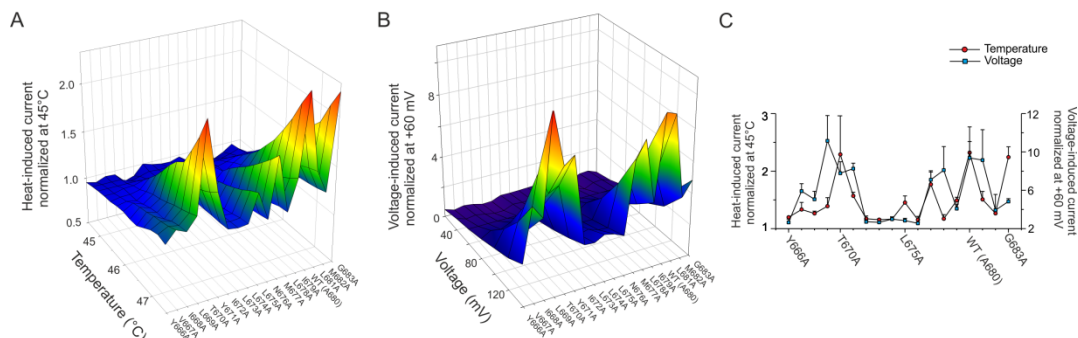
Tyto výsledky jako první naznačily důležitou modulární úlohu cytoplazmatického C-konce v teplotní aktivaci TRPV1 a byly o tři roky později podpořeny studií (Brauchi et al., 2006), která ukázala, že chimérická záměna C-konců mezi TRPV1 a TRPM8 obrací směr teplotní závislosti obou kanálů. Strukturní uspořádání C- a N- konců patrně z později publikovaných struktur také nabízí vysvětlení pro výsledky naší jiné studie, která ukázala, že kapsaicin aplikovaný z vnitřní

strany buněčné membrány neaktivuje TRPV1 ani při dlouhodobé expozici (Vyklícky et al., 2003). Oba konce vytvářejí v cytoplazmatické oblasti kompaktní rozhraní, která neumožní nitrobuněčnému roztoku obsahujícímu kapsaicin dosáhnout vazebného místa, které je zanořeno v transmembránové oblasti.

Oblast vrátek (hradla) iontového kanálu bývá zpravidla nejužším místem póru iontového kanálu. Úloha této části kanálu v teplotní aktivaci TRPV1 není dosud jednoznačně určena. Metodou postupné záměny aminokyselinových reziduí za alanin ve vnitřní části segmentu S6 (Y666-G683, tj. přepokládaném vnitřním póru iontového kanálu) jsme testovali teplotní závislost jednotlivých konstruktů (Susankova et al., 2007). Ze 17 konstruktů jsme identifikovali 16 reziduí, jejichž mutace ovlivnila funkci TRPV1. Funkce mutantu T670A nebyla pozměněna, zatímco Y666A a N676A byly nefunkční. Periodicita účinků mutací byla konzistentní s alfa-helikální strukturou S6 (Obr. 4) a společně s molekulárním modelováním předpověděla možnou úlohu T670 a A680 jako dvou míst flexibilního ohybu segmentu S6 při vrátkování kanálu. Naše výsledky byly o téměř 14 let později potvrzeny studií, ve které se autorům podařilo popsat teplem otevřenou strukturu potkaního TRPV1 v přítomnosti kapsaicinu (Kwon et al., 2021).

Podobně jako řadu dalších termoTRP kanálů lze TRPV1 aktivovat silnou depolarizací membránového potenciálu ($>+80$ mV). Na rozdíl od draslíkových kanálů, jejichž napěťová citlivost je dána vyšším počtem nabitých reziduí v sensorové oblasti, zejména v S4 segmentu, molekulární podstata aktivace termoTRP není známa. Testovali jsme úlohu segmentu S4 a spojující oblasti S4-S5 v napěťové, chemické a teplotní aktivaci TRPV1 (Boukalova et al., 2010). Identifikovali jsme čtyři potenciální místa citlivá k napětí (R557, E570, D576 a R579), jejichž neutralizace pozměnila napěťovou, chemickou a/nebo teplotní aktivaci TRPV1. Stejně mutace homologních reziduí v kanálech TRPV2 nebo TRPV3 překvapivě neměly vliv na teplotní aktivaci, což vedlo k závěru, že nabitá postranní řetězce v S4-S5 oblasti TRPV kanálů mají odlišnou úlohu v regulaci kanálů teplem a agonisty.

TRPV1 je polymodálním kanálem, jehož teplotní závislost je v nativním prostředí regulována mnoha různými faktory včetně vápenatých iontů, signálních drah, oxidačně-redukčního prostředí a hodnoty pH. Vliv zmíněných faktorů na aktivační charakteristiku TRPV1 byl popsán v našich studiích zaměřených na určení molekulárního mechanismu působení těchto modulátorů na teplotní a chemickou aktivitu receptoru. Metodou záměny postranních řetězců TRPV1 za tryptofan v segmentu S1 (rezidua V439 až R455) jsme odhalili místo potenciální interakce vnější části S1 s pórovým helixem sousední podjednotky stabilizující otevřenou konformaci kanálu a určující citlivost k protonům (Boukalova et al., 2013). Naše hypotéza byla potvrzena nedávnou strukturální studií (Kim et al., 2020), která v oblasti S1-S4 jednoznačně prokazuje konformační změny vyvolané teplem.



Obr. 4

Alaninové mutace aminokyselin ve vnitřní části S6 helixu TRPV1 odhalují determinanty teplotní a napěťové aktivace. (A) Průměrné proudové odpovědi konstruktů TRPV1 vyvolané teplotní a napěťovou stimulací. Proudově-teplotní závislost byla pro normalizována na 45°C. (B) Průměrné proudově-napěťové závislosti konstruktů TRPV1 měřené při teplotě 25°C, normalizované na +60 mV (3-11 nezávislých experimentů pro každý konstrukt). (C) Souhrnné porovnání účinku alaninových mutací S6. Průměrný maximální proud vyvolaný teplotním podnětem na 47.5°C, normalizovaný na 45°C (levá osa). Maximální amplituda proudů vyvolaných depolarizačním napětím (+140 mV; pravá osa), normalizované na +60mV. Data jsou prezentována jako průměr \pm SEM (n = 3-11). (Susankova et al., 2007).

V kyselém prostředí (například v podmínkách zánětu) je aktivita TRPV1 zvýšena prostřednictvím dvou negativně nabitých reziduí E600 a E648 ve vnější části póru kanálu. Ukázali jsme, že tato rezidua jsou zodpovědná také za aktivaci a senzitivizaci receptoru gadolinium (Tousova et al., 2005). Naše měření také prokázala, že míra teplotní aktivace TRPV1 závisí na oxidačně-redukčním stavu extracelulárních cysteinů C616, C621 a C634, jež jsou součástí pórové oblasti iontového kanálu (Vyklícky et al., 2002). Membránově propustné oxidační látky zvyšovaly TRPV1 proudy vyvolané teplem (Susankova et al., 2006). Vyslovili jsme hypotézu, podle které volné S-H skupiny zvyšují pravděpodobnost otevření kanálu. Naopak, intracelulární cysteiny v oxidovaném stavu jsou kovalentně spojeny S-S můstky a tato konformace může pro otevření kanálu představovat energetickou bariéru (Tousova et al., 2004).

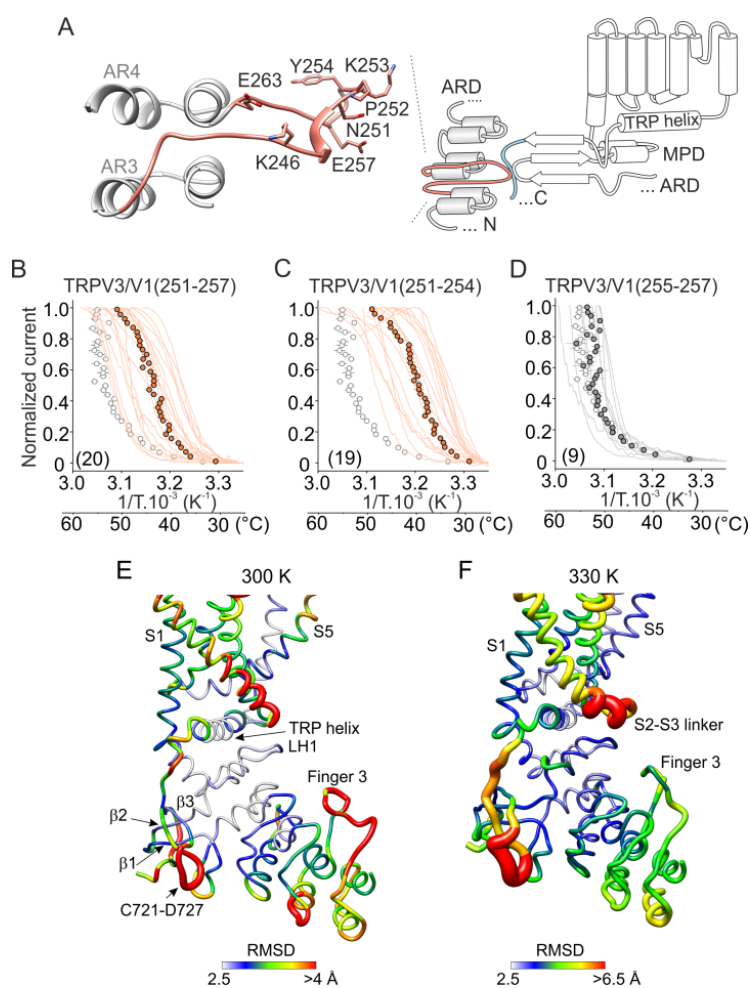
Jednou z klíčových strategií, které poskytují možnost zmírnění neuropatické a zánětlivé bolesti, je agonistou vyvolaná desenzitizace TRPV1 (Touska et al., 2011). Tento proces je zahájen aktivací TRPV1 (kapsaicinem, resiniferatoxinem, piperinem apod.) a následován průchodem vápenatých iontů kanálem, které mění jeho konformaci a snižují pravděpodobnost otevření (desenzitivují). Naše studie zaměřená na objasnění tohoto děje odhalila klíčovou úlohu dvou kladně nabitých reziduí lokalizovaných v TRP doméně (R701 a T704), která určují kinetiku aktivace desenzitizovaného TRPV1. Ukázali jsme, že desenzitizace snižuje zjevnou afinitu vazby kapsaicinu na receptor a že úplná desenzitizace může být do určité míry překonána vysokými koncentracemi agonisty (Novakova-Tousova et al., 2007). Tato vlastnost TRPV1 kanálu jej zásadně odlišuje od většiny jiných známých iontových kanálů, jakými jsou P2X, NMDAR, AMPAR, GABAAR, AChR nebo ASIC, u kterých vysoká koncentrace ligandu vede vždy k vyšší míře desenzitizace.

Mezi látkami všeobecně využívanými v humánní medicíně pro své lokální protizánětlivé, antipruritické a anestetické vlastnosti patří skupina monoterpenů, které jsou hlavními složkami rostlinných silic. Mezi tyto látky patří kafr, který účinně desenzitizuje TRPV1 nezávisle na vazebném místě pro kapsaicin (Xu et al., 2005). Pomocí chimérického konstruktů TRPV1, v němž byla zaměněna oblast pórového helixu homologní oblastí TRPV2, jsme identifikovali potenciální oblast interakce kafru s TRPV1 (Marsakova et al., 2012). Tato oblast zahrnuje L638 a F639 v pórovém helixu a L648 v externím linkeru mezi pórovým helixem a transmembránovým segmentem S6. V nedávné době skupina M. Tominagy navrhla jiné místo interakce kafru s TRPV1 v oblasti S4-S5 (Nguyen et al., 2021). Naše výsledky však ukazují, že konzervovaná mutace rezidua R557, které bylo autory identifikováno jako klíčové pro aktivaci receptoru kaforem, významným způsobem ovlivňuje obecný mechanismus vrátkování kanálu (Boukalova et al., 2010). K objasnění molekulárního mechanismu působení monoterpenoidů na TRPV1 tak bude zapotřebí další experimentální úsilí.

5.2 Určení molekulární podstaty regulace TRPV3 teplem

TRPV3 se kromě udržování kožní bariéry a hojení ran, růstu vlasů a embryonálního vývoje podílí na kožní detekci nociceptivních podnětů včetně teploty a svědění, zatímco jeho patofyziologická funkce je spojena s řadou lidských onemocnění, včetně genodermatózy známé jako Olmstedův syndrom, atopické dermatitidy, růžovky a rakoviny plic (Broad et al., 2016). Na úrovni primární struktury jsou lidské ortology TRPV3 a TRPV1 z 38% identické a z 54% podobné. I přes vysokou konzervovanost a strukturní podobnost má TRPV3 některé specifické vlastnosti, kterými se odlišuje od TRPV1. V heterologním expresním systému je TRPV3 aktivován teplotami překračujícími 50 °C. Při opakované aktivaci kanál senzitivizuje, tzn. zvyšuje se pravděpodobnost otevření kanálu a práh pro aktivaci se posouvá k nižším teplotám. Strukturní podstata tohoto jevu TRPV3 nebyla dlouho objasněna, přirozeně se nabízel přístup hledání funkčního významu částí či jednotlivých aminokyselin proteinu, které vykazují nízkou homologii s TRPV1. V naší studii jsme se zaměřili na oblast smyčky mezi třetí (AR3) a čtvrtou (AR4) ankyrinovou repeticí (N251-E257), jež se nápadně liší od TRPV1 primární sekvencí (Macikova et al., 2019b) (Obr. 5A). Záměna reziduí v této oblasti za aminokyseliny, které se nacházejí na stejné pozici u TRPV1, způsobila významné snížení prahu pro teplotní aktivaci a teplotního koeficientu Q_{10} (Obr. 5B-D). V roce 2018, kdy naše výsledky prokázaly významnou úlohu AR3-AR4 smyčky v teplotní aktivaci a senzitivizaci TRPV3, bylo souběžně publikováno několik struktur TRPV3 získaných pomocí kryoelektronové mikroskopie: myší TRPV3 ve formě apoproteinu (PDB 6DVW) a strukturních konformací se specifickým agonistou 2-APB (6DVY, 6DVZ) a lidský TRPV3 ve formě apoproteinu (PDB 6MHO), v různých konformacích s 2-APB (6MHS, 6MHW, 6MHV) a ve funkčně senzitivizovaném stavu (6MHS) (Singh et al., 2018; Zubcevic et al., 2018). Z těchto struktur bylo patrné, že AR3-AR4 oblast vytváří v cytoplazmatické oblasti funkční rozhraní mezi podjednotkami, které může stabilizovat teplem aktivovaný kanál. Ve spolupráci s A. Sobolevským z Kolumbijské univerzity (New York, USA) jsme metodou cílené mutagenese testovali funkční význam specifických protilehlých reziduí a identifikovali hlavní determinanty teplotní senzitivizace TRPV3. Naše simulace molekulární dynamiky odhalily místa největší flexibility kanálu při zvýšení teploty o 30 K (Obr. 5E,F), a potvrdily tak hypotézu

o strukturálních změnách, které doprovázejí proces senzitivace receptoru při aktivaci teplem, nebo jsou přímo příčinou teplotní senzitivace.



Obr. 5

Cytoplasmatické rozhraní mezi podjednotkami reguluje teplotní závislost aktivace TRPV3. **(A)** Schematické znázornění lokalizace AR3-AR4 smyčky ankyrinové domény (ARD) vedlejší podjednotky s vyznačenými rezidui, která byla mutována. **(B-D)** Průměrné proudové odpovědi chimérických kanálů vyvolané teplem, normalizované na maximální hodnotu první teplotní odpovědi (oranžové křivky). Průměr je vyznačen oranžovými kolečky s šedými chybovými úsečkami. Pro porovnání je zobrazena průměrná odpověď TRPV3 přirozeného typu (prázdná kolečka s šedými chybovými úsečkami). Počet buněk je vyznačen v závorkách. **(E, F)** Simulace molekulární flexibility podjednotky TRPV3 při teplotách 300 K a 330 K (PDB 6DVW; 50-ns simulace). Nejvíce flexibilní části vyznačené červenou barvou a průměrem struktury jsou pravděpodobnými místy hlavních konformačních změn při aktivaci TRPV3 teplem (Macikova et al., 2019b).

Na spolupráci s Kolumbijskou univerzitou jsme navázali experimenty, které byly součástí strukturální studie provedené týmem A. Sobolevského. V této studii se podařilo poprvé popsat kryoelektronovou mikroskopií strukturu přirozeného typu TRP kanálu otevřeného teplem (Nadezhdin et al., 2021). Skutečnost, že plně otevřeného stavu bylo dosaženo jen v případech TRPV3 kanálů rekonstituovaných v určitém typu nanodisků (cNW11, nikoliv MSP2N2), svědčí o důležité úloze složení lipidů v membráně při aktivaci. Naše výsledky tak přispěly k průlomové studii, která odhalila sérii konformačních změn myšičího TRPV3, ke kterým dochází působením tepla (42 $^{\circ}C$).

Mnohočetné mutace *TRPV3* genu jsou genetickým podkladem autozomálně dominantního těžkého onemocnění projevujícího se hyperkeratózou u lidí (Lin et al., 2012). Genetická delece *Trpv3* genu u myši je příčinou porušené struktury epidermální bariéry a deficitu v behaviorální odpovědi na teplo (Moqrich et al., 2005). Poruchy v morfologii chlupů způsobené delecí *Trpv3* jsou velmi podobné myšičímu fenotypu s mutací v genu pro receptor pro epidermální růstový

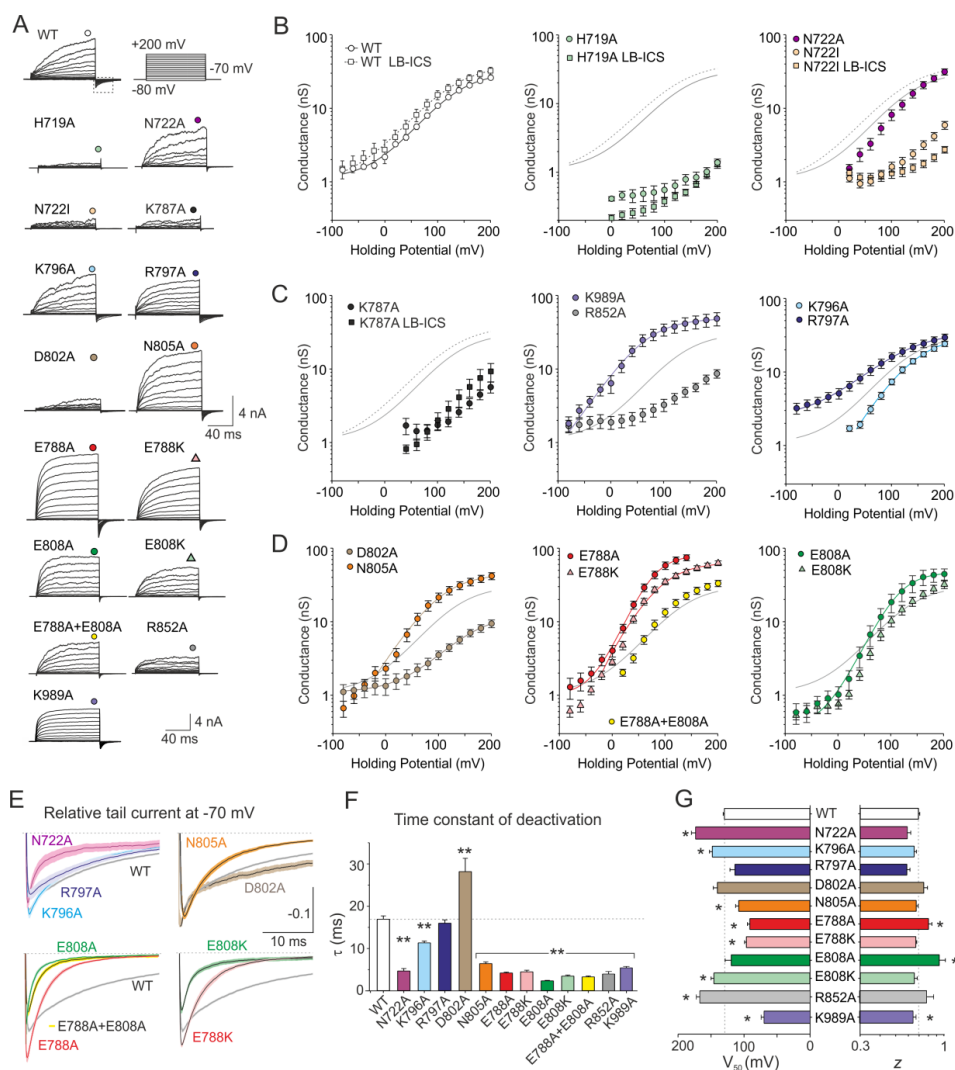
faktor (EGFR) a jeho ligand, transformující růstový faktor TGF- α (Cheng et al., 2010). Na souvislost signálních drah spojených s aktivací EGFR jsme se zaměřili v naší studii s cílem zjistit, zda aktivita TRPV3 může být těmito drahami regulována prostřednictvím fosforylace (Vyklíčka et al., 2017). Zjistili jsme, že EGF senzitivuje endogenní TRPV3 v buněčné linii imortalizovaných lidských keratinocytů prostřednictvím fosforylační kaskády mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK). Pomocí mutací mimikujících fosforylovaný stav kanálu a koexpresi TRPV1 s ERK1 kinázou jsme identifikovali threonin 264 v ankyrinové doméně TRPV3 jako potenciální místo fosforylace. Důležitost tohoto regulačního místa podtrhuje strukturní blízkost rezidua T264 k funkčně klíčové oblasti AR3-AR4 smyčky, jejíž strukturní a funkční význam byl popsán v přechozím odstavci.

5.3 Mechanizmy polymodální aktivace TRPA1

5.3.1 Strukturně-funkční charakterizace transmembránové oblasti TRPA1

Transmembránové segmenty sensorové domény TRP kanálů (S1-S4) jsou uspořádané radiálně kolem centrálního pórového modulu tvořeného čtyřmi segmenty S5-P-S6 (Obr. 2C). Strukturní studie prokazují, že sensorový modul je v procesu vrátkování statický, je však důležitým místem integrace různých extracelulárních i nitrobuněčných regulačních molekul a hlavním místem interakce s anulárními a integrálními lipidy. Srovnávací sekvenční analýza téměř tří tisíc různých TRP proteinů s rozsáhlým (> 3 700) souborem vzdáleně příbuzných sekvencí napětově řízených draslíkových (K_v) kanálů zjistila pozoruhodné rozdíly v evolučně konzervovaných vlastnostech sensorových domén těchto dvou rodin. U K_v kanálů mohou být senzory hydratovány jak z intracelulární, tak z extracelulární strany membránové dvojvrstvy, přičemž vodné prostředí interaguje s polárními zbytky a reguluje napětovou aktivaci kanálů formováním transmembránového elektrického pole. Naproti tomu solvatace senzoru TRP kanálů je omezena na intracelulární stranu, zatímco jeho horní část je vyplněna hydrofobními a aromatickými aminokyselinovými zbytky (Palovcak et al., 2014).

Cílem našich dvou studií bylo objasnění úlohy sensorové domény lidského TRPA1 kanálu v napětové a chemické aktivaci. Postupná záměna polárních aminokyselinových zbytků ve vnitřní kavitě senzoru umožnila identifikaci reziduí zodpovědných za aktivaci TRPA1 depolarizačním napětím a elektrofilními látkami (Obr. 6). Metodami molekulárního modelování jsme určili vazebné místo pro regulační fosfolipid PIP_2 lokalizované ve vnitřní kavitě senzoru (Obr. 7A). Pomocí společné exprese TRPA1 s proteiny specificky interagujícími s PIP_2 se nám podařilo funkčně ověřit předpokládanou úlohu tohoto predikovaného místa. Naše experimenty navíc odhalily, že konzervovaná záporně nabitá rezidua ve vnitřní kavitě senzoru (E788 a E808) mohou být také klíčovými interakčními místem, ze kterého je aktivita kanálu regulována vápenatými ionty, jež jsou nejdůležitějším fyziologickým modulátorem TRPA1 (Zimova et al., 2018). Tyto nálezy vedly k návrhu funkčního modelu převodu chemických a napětových signálů z vnitřní kavity senzoru do vrátkovací oblasti póru. O dva roky později byla publikována struktura TRPA1, která v souladu s naší hypotézou prokázala v oblasti hydratované kavity vazbu vápenatých iontů (Zhao et al., 2020).

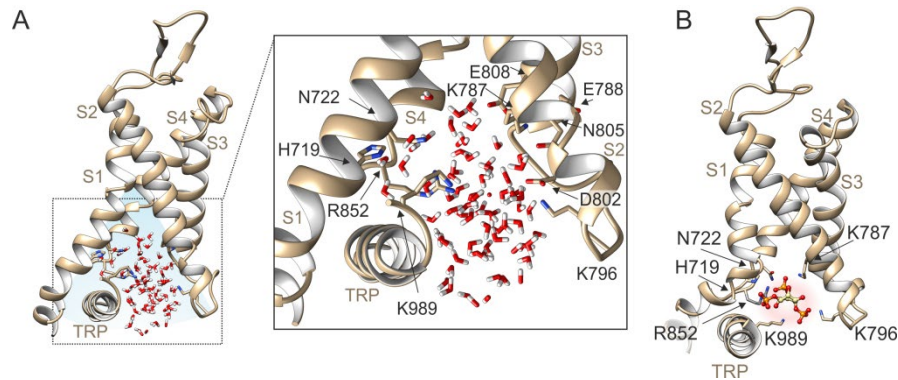


Obr. 6

Polární rezidua ve vnitřní kavitě sensorové domény regulují aktivaci TRPA1 napětím. (A) Repräsentativní záznamy membránových proudů snímané z HEK293T buněk transfekovaných přirozeným typem TRPA1 receptoru nebo indikovanými mutanty vyvolané sérii napěťových skoků (100-ms pulzy od -80 mV do +200 mV, krok +20 mV; panel A, vpravo). (B-D) Průměrné proudově-napěťové charakteristiky konstruktů TRPA1, měřené na konci pulzů, jak je ukázáno v A barevnými symboly nad záznamy. (E) Deaktivací kinetika mutantů TRPA1. Průměrné membránové proudy měřené ve fázi deaktivace, normalizované na maximální amplitudu proudu při +200 mV (panel A, vlevo, tečkovaný obdélník). (F) Průměrné časové konstanty deaktivace pro uvedené konstrukty. Hvězdičky označují signifikantní rozdíl od přirozeného typu TRPA1 (** $P < 0.001$; $n = 6-30$). (G) Průměrné hodnoty polovičního účinného napětí (V_{50}) a vrátkovacího náboje (z) určené z experimentů zobrazených v panelu A-D. Statisticky významný rozdíl od hodnot přirozeného typu TRPA1 je znázorněn hvězdičkou (* $P < 0.05$) (Zimova et al., 2018).

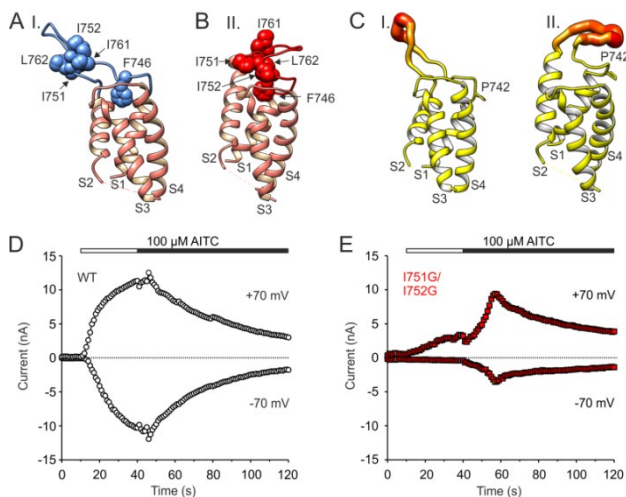
Vnější oblast transmembránového segmentu S1 draslíkových K_V kanálů je evolučně vysoce konzervovaným místem kontaktu mezi senzorem a pórovým helixem vedlejší podjednotky. Extracelulární smyčka mezi segmenty S1 a S2 stabilizuje tento kontakt, ale může také obsahovat glykosylační místa. Homologní oblast u TRPA1 zahrnuje flexibilní smyčku, jejíž část vyčnívá do extracelulárního prostoru a její funkční ani strukturální úloha není objasněna. Metodou molekulárních simulací (MDFF, Molecular Dynamics Flexible Fitting) jsme ve

spolupráci s Fyzikálním ústavem UK vytvořili model otevřeného kanálu na základě dostupné kryomikroskopické struktury otevřeného kanálu TRPV1 (PDB: 3J5Q). Simulace konformační dynamiky extracelulární části flexibilní kličky odhalily dva hlavní konformační stavy oblasti S1-S2 stabilizované hydrofobními interakcemi (Obr. 8). Náhradou dvou klíčových hydrofobních reziduí stabilizujících obě konformace za glycin jsme ověřili potenciální úlohu této oblasti v aktivaci TRPA1 napětím (Marsakova et al., 2017). Mutace dvou predikovaných glykosylačních míst (N747 a N753) výrazně snížila expresi TRPA1, biochemicky se glykosylaci podařilo v téže době prokázat jiné laboratoři (Egan et al., 2016).



Obr. 7

Model intracelulární části senzoru TRPA1. (A) Vnitřní oblast senzorní domény vytváří hydratovanou kavitu, ze které je regulována aktivace receptoru napětím a vápenatými ionty. (B) Za určitých podmínek může tato oblast vázat PIP_2 . Vyznačena jsou rezidua důležitá pro vazbu (Zimova et al., 2018).

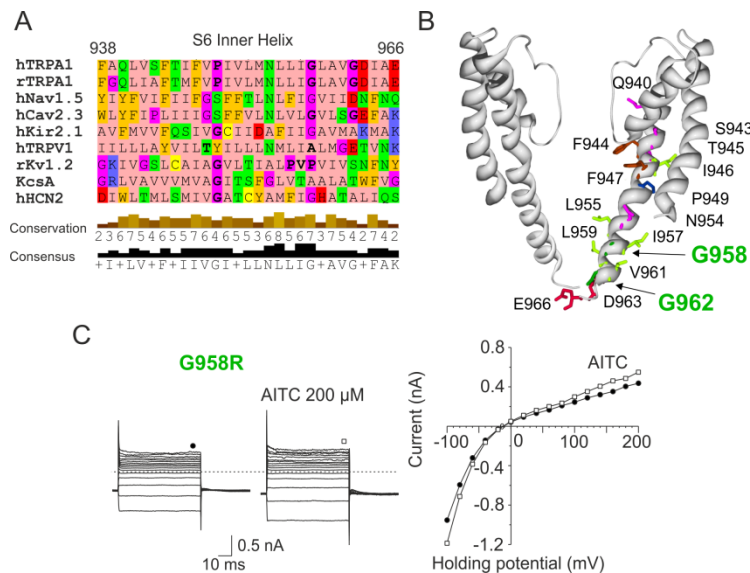


Obr. 8

Vnější část senzorní domény stabilizuje aktivaci TRPA1 allylisothiokyanátem (AITC). (A,B) Dvě různé konformace senzorní domény (I. a II.) s vyznačenými hydrofobními rezidui. (C) Červená barva označuje místa s nejvyšší flexibilitou. (D,E) Záznamy membránových proudů vyvolaných AITC bez Ca^{2+} (bílá horizontální čára) a poté s Ca^{2+} (1 mM, černá čára) u (D) přirozeného typu TRPA1 a (E) mutantu I751G/I752G (Marsakova et al., 2017).

Různé aktivační podněty chemického i fyzikálního charakteru jsou převáděny proteinovým komplexem TRPA1 kanálu do oblasti póru, který konformační změnou umožní průchod kationtů kanálem. Vysoce konzervovaný vrátkovací mechanismus, kterým je pór kanálu otvírán a zavírán, není dostatečně popsán i přesto, že již existuje struktura otevřeného kanálu s jodoacetamidem (Zhao et al., 2020). Tato látka se kovalentně váže na thiolovou skupinu cysteinů 621 a 665 na cytoplazmatickém aminovém konci v interakčním místě pro elektrofilní

agonisty TRPA1, mezi které patří allylisothiokyanát obsažený ve wasabi, allicin, jenž je součástí česnekové esence, skořicový aldehyd, akrolein, a některé zánětlivé mediátory (peroxid vodíku, oxid dusný, 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2) (Talavera et al., 2020). V případě aktivace receptoru depolarizačním napětím nebo nekovalentními agonisty vázajícími se do transmembránové oblasti (např. karvakrol nebo menthol) dochází k odlišnému, zatím nepopsanému procesu konformačních změn zakončenému otevřením póru. K objasnění těchto dějů je proto využívána informace o homologních proteinech a metody bodové mutagenese. Tento přístup jsme využili v naší studii zaměřené na vnitřní oblast pórového α -helixu S6, která je předpokládaným místem vrátkovacího mechanismu kanálu (Benedikt et al., 2009). Postupnou záměnou 16 reziduí jsme identifikovali konzervovaný motiv G(X)₃G, který se vyskytuje také u některých napětově řízených kanálů (Ca_v) a v němž oba glyciny mají úlohu flexibilního místa ohybu S6 helixu (Obr. 9A). Konstrukt TRPA1, v němž byl nahrazen jeden z těchto glycinů kladně nabitým aminokyselinovým zbytkem (G958R), vykazoval fenotyp dovnitř usměrňujícího kanálu (angl. inward rectifier), což je cenná informace o změnách topologie póru v průběhu napětové aktivace (Obr. 9B). Skutečnost, že motiv G(X)₃G chybí u TRPV1, naznačuje odlišný mechanismus převodu signálů do vrátek kanálu.



Obr. 9

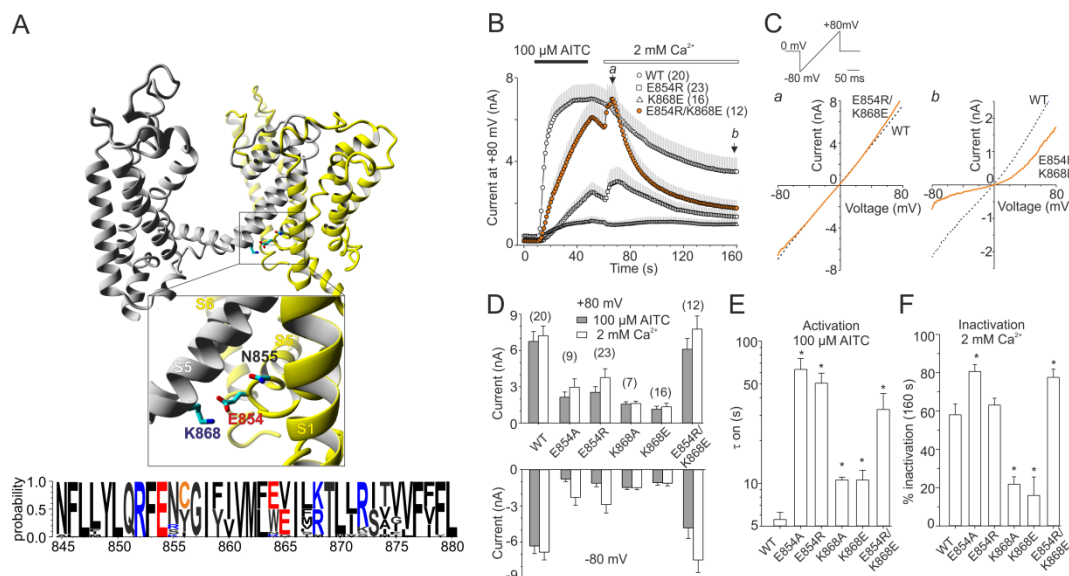
Strukturně-funkční analýza póru TRPA1. (A) Porovnání sekvencí různých kanálů v S6 oblasti. (B) Vyznačena jsou rezidua testovaná ve studii (Benedikt et al., 2009). (C) Záměna glyciny 958 za arginin změnil charakter usměrňování proudů procházejících kanálem a znesnadnil aktivaci allylisothiokyanátem (AITC). Vlevo, proudy vyvolané u mutantu G958R napětovými pulzy od -100 mV do +200 mV. Vpravo, proudově-napětová charakteristika.

5.3.2 Mutace TRPA1-N855S zodpovědná za familiální epizodický bolestivý syndrom u lidí

V roce 2010 byla identifikována mutace v genu pro TRPA1 jako příčina autosomálně dominantního familiálního epizodického syndromu u lidí (Kremeyer et al., 2010). Syndrom je charakterizován vysilující bolestí lokalizovanou v horní části těla, vyvolanou únavou,

hladověním či chladem. Přestože funkční důsledky nukleotidového polymorfismu N855S byly zčásti vysvětleny na základě pozorovaného zvýšení pravděpodobnosti otevření kanálu na záporných potenciálech, jejich strukturní podstata nebyla v původní studii objasněna. Za využití homologního modelování, simulace molekulární dynamiky, mutagenese a elektrofyziologických technik jsme navrhli možné vysvětlení vlivu této mutace na strukturu a funkci TRPA1 (Zima et al., 2015).

Naše studie vycházela z modelu vytvořeného na základě sekvenční homologie transmembránové oblasti TRPA1 s chimérickým draslíkovým kanálem Kv1.2/2.1 (PDB: 2R9R; (Long et al., 2007)). Simulace molekulární dynamiky naznačila, že postranní řetězec N855 je orientován směrem k S4-S5 oblasti vedlejší podjednotky, přičemž rezidua E854 a K868 (z vedlejší podjednotky) vytváří v jeho těsné blízkosti solné můstky (Obr. 10). Při současné záměně nábojů (E854R/K868E) byly změny průměrné vzdálenosti mezi postranními řetězci v průběhu simulace (15-30 ns) dokonce nižší než u přirozeného typu TRPA1, což podpořilo úlohu těchto dvou aminokyselinových zbytků ve stabilizaci rozhraní mezi podjednotkami. Funkčním vyšetřením mutantů jsme potvrdili výsledky molekulárního modelování a vyslovili jsme hypotézu, že hlavním účinkem záměny N855S je strukturní změna S4-S5 oblasti, v jejímž důsledku se zvýší účinnost elektrofilních agonistů a sníží míra inaktivace závislé na vápenatých iontech. Později publikované struktury lidského TRPA1 podpořily správnost naší hypotézy (Paulsen et al., 2015; Suo et al., 2020; Zhao et al., 2020).



Obr. 10

Strukturně-funkční analýza N855S. (A) Nabitá rezidua E854 a K868 vytvářejí solný můstek v těsné blízkosti N855. Boční pohled na dvě sousední podjednotky TRPA1. Dole, sekvenční logo pro TRPA1 protein 22 různých živočišných druhů s vyznačenými nabitými rezidui v S4-S5 oblasti. (B) Současná záměna nábojů na pozicích 854 a 868 zachraňuje porušenou funkci konstruktů s individuální záměnou nábojů. Časový průběh průměrných proudů vyvolaných allylisothiokyanátem (AITC, 100 μ M; 0 Ca^{2+}) u vyznačených konstruktů. (C) Porovnání proudově-napěťové charakteristiky konstruktů stanovené v 70. a 160. sekundě záznamu (označeno šipkami, a a b v B). (D) Průměrná amplituda proudových odpovědí vyvolaných AITC, (E) aktivační časová konstanta a (F) míra Ca^{2+} -závislé inaktivace pro vyznačené konstrukty (Zima et al., 2015).

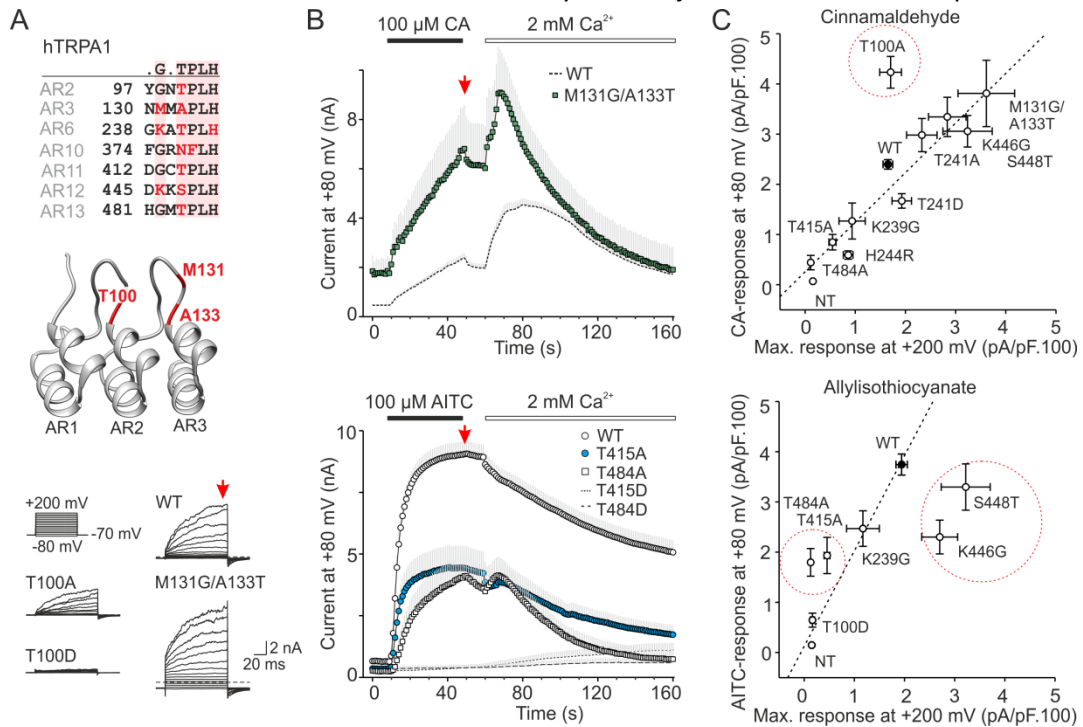
5.3.3 Cytoplazmatická oblast TRPA1: potenciální místo fosforylace

TRPA1 je jediným zástupcem ankyrinové podrodiny TRP receptorů. Jeho unikátní vlastností je mohutný aminový konec, jenž tvoří více než polovinu proteinu (720 z 1119 aminokyselin u lidského ortologu). Je charakterizován výraznou doménou ankyrinových repetit (ARD; aminokyselinové zbytky 1-649), která je tvořena 16 tandemově uspořádanými ankyrinovými repetitami (AR1-AR16) a oblastí spojující ARD s prvním transmembránovým segmentem. Ankyrinová repetice je běžný strukturní motiv, obvykle o 33 reziduích, obsahující vysoce konzervovaný tetrapeptidový motiv T/SPLH, v němž dvojice threoninu/serinu a histidinu tvoří intra- a inter- molekulární vazby, čímž přispívá k lokální konformační stabilitě AR (obr. 6A). Sousední ankyrinové repetice mají tendenci se skládat k sobě a vytvářet protáhlé struktury, které jsou důležité pro protein-proteinové a protein-ligandové interakce. Kromě toho mohou motivy T/SPLH představovat potenciální fosforylační místa pro specifické skupiny Ser/Thr kináz, jejichž konsenzuální sekvence je [S/T*]PX[K/R], kde X je jakákoliv aminokyselina. Mezi ně patří cyklin-dependentní kináza 5 (Cdk5), neuronově specifická kináza s důležitým funkčním významem, o níž je známo, že reguluje nociceptivní signalizaci prostřednictvím N-konce příbuzného receptoru TRPV1. Naše bioinformatická analýza sekvence lidského TRPA1 získaná pomocí několika predikčních serverů předpověděla, že threoniny T100, T241, T415, T484 a serin S448 mohou být konsenzuálními fosforylačními místy pro Cdk5 (Hynkova et al., 2016). Předpokládali jsme, že striktní evoluční konzervovanost motivů T/SPLH v AR2, AR6, AR11-AR13 napříč různými živočišnými druhy zajišťuje stabilitu N-terminálních modulů, je nezbytná pro správnou funkci kanálu a může indikovat potenciální fosforylační místo. Abychom prověřili tuto hypotézu, charakterizovali jsme konstrukty TRPA1, které byly navrženy tak, abychom buď stabilizovali (vložením konsenzuálního motivu GxTPLH do sousední AR), nebo destabilizovali (mutacemi serinu/threoninu na alanin a aspartát) konformaci každé AR obsahující T/SPLH. Možnou úlohu serinů a threoninů jako potenciálních fosforylačních míst jsme ověřovali záměnou těchto reziduí za alanin a aspartát. Pro každý z těchto konstruktů byla kvantifikována amplituda proudů vyvolaných depolarizačním napětím (+200 mV), cinnamaldehydem (100 μ M; +80 mV) a allylisothiokyanátem (100 μ M; +80 mV) (Obr. 11). Prokázali jsme, že analogické mutace v silně konzervovaných sekvencích motivech ankyrinových repetit AR2, AR6 a AR11-13 mají rozdílný vliv na funkční vlastnosti kanálu z hlediska jeho kinetických vlastností a napěťové a chemické citlivosti. To svědčí o diferencované úloze jednotlivých ankyrinových repetit, či jejich modulů, v alosterické aktivaci receptoru. Treonin 673 byl jediným reziduem, které splňovalo podmínky kladené na potenciální fosforylační místo (tj. změna funkce při záměně S/T za aspartát a žádná nebo opačná změna při mutaci za alanin nebo glycin).

Fosforylace je považována za jeden z významných mechanismů regulujících aktivitu TRPA1 za fyziologických i patofyziologických podmínek. Bylo popsáno velké množství signálních drah spojených s procesy zánětu, poškozením tkáně či oxidativním stresem, jež modulují aktivitu TRPA1 prostřednictvím metabotropních receptorů a signalizačních kaskád zahrnujících proteinkinázy A, C, Cdk5, p38-mitogenem aktivovanou kinázu a fosfolipázu C (viz reference v přehledovém článku (Talavera et al., 2020)).

Zatím existuje však jen velmi málo studií, ve kterých bylo identifikováno funkčně významné místo fosforylace TRPA1 (Meents et al., 2017; Hall et al., 2018; Sulak et al., 2018; Barvikova et al., 2020). Bioinformatická analýza sekvence lidského TRPA1 predikuje vysoký počet reziduí, která splňují přísná konsenzuální kritéria a jejichž význam v regulaci kanálu je zatím neznámý.

Naše studie se zaměřila na serin 602, který je lokalizován na N-konci v těsné blízkosti oblasti klíčové pro aktivaci TRPA1 elektrofilními látkami (Barvikova et al., 2020). Tato funkčně důležitá část proteinu, nazývaná „spojovací doména“ (Suo et al., 2020) nebo také „alosterický nexus“ (Zhao et al., 2020), je vytvářena jedním C-koncovým a sedmi N-koncovými krátkými helixy, antiparalelním β -listem a TRPL doménou. Proces otevření kanálu je dvoustupňovým mechanismem, který zahrnuje konformační změnu vyvolanou kovalentní modifikací cysteinu 621 a následnou částečnou modifikací cysteinu 665, jež způsobí změnu orientace lysinu 671, jeho stabilizaci interakcí s C-koncem TRPL domény umožňující rozšíření dolní části póru.



Obr. 11

N-terminální tetrapetidové motivy T/SPLH přispívají k multimodální aktivaci TRPA1. (A) Nahoře, sekvenční porovnání konzervovaných T/SPLH motivů na vyznačených ankyrinových repetitivních (AR) lidského TRPA1. Rezidua mutovaná v této studii jsou označena červeně. Uprostřed, příklad strukturního uspořádání prvních tří AR. Dole, záznam reprezentativních proudových odpovědí uvedených konstruktů na sérii napěťových skoků (od -80 do +200 mV). Maximální amplituda odpovědí na +200mV byla odečtena na konci pulzu (červená šipka). (B) Nahoře, časový průběh průměrných proudů vyvolaných skořicovým aldehydem (CA, 100 μ M; 0 Ca^{2+}) a (dole) allylithioiokyanátem (AITC, 100 μ M; 0 Ca^{2+}) u vyznačených konstruktů. Amplituda proudů byla odečtena na konci aplikace agonisty (červená šipka). (C) Průměrné hodnoty maximálních vodivostí uvedených konstruktů při aktivaci skořicovým aldehydem (nahore) a allylithioiokyanátem (dole) vynesené v závislosti na maximální průměrné odpovědi vyvolané depolarizačním napětím (+200 mV). Červeně jsou označena rezidua, u nichž mutace změnila specificky pouze jednu z aktivačních modalit (Hynkova et al., 2016).

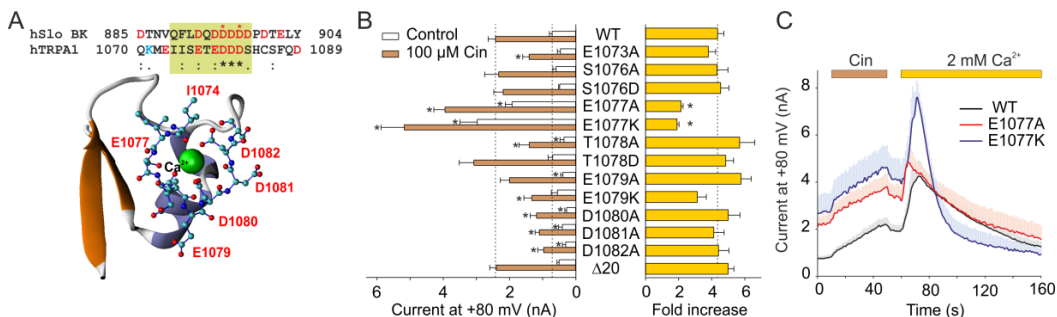
Spojovací doméně bezprostředně předchází serin 602, který je podle předpovědí různých serverů (Savage and Zhang, 2020) potenciálním fosforylačním místem pro různé kinázy, včetně rodin AGC, CMGC a Ca^{2+} /kalmodulin-dependentních proteinkináz. Je zajímavé, že ve strukturách TRPA1 získaných v konformačním stavu bez ligandu (PDB: 6PQQ; (Suo et al., 2020)), nebo v přítomnosti kovalentních agonistů allylithioiokyanátu (3J9P; (Paulsen et al., 2015)), benzyl-isothiokyanátu a JT010 (6PQP a 6PQO; (Suo et al., 2020)) je postranní řetězec

tohoto serinu orientován do cytoplazmy. Naproti tomu v jiných strukturách, nedávno rozlišených v různých uzavřených a aktivovaných konformacích (6V9V, 6V9W, 6V9X a 6V9Y; (Zhao et al., 2020)), je postranní řetězec S602 orientován směrem k proteinu vytvářením vodíkových vazeb s karbonyly hlavního řetězce. To naznačuje, že úloha tohoto předpokládaného konsenzuálního fosforylačního místa může záviset na konformačním stavu kanálu. Vzhledem k tomu, že S602 se nachází v blízkosti funkčně důležité spojovací domény, předpokládali jsme, že modifikace tohoto rezidua může mít silný vliv na vrátkování kanálu. Prokázali jsme, že fosfomimikující mutace S602D zcela zrušila aktivaci kanálu napětovými a chemickými podněty, zatímco mutace za alanin nebo glycin jeho funkci neovlivnila. Míra exprese TRPA1 na povrchu buňky nebyla mutacemi ovlivněna. Zjistili jsme také, že náboj a velikost rezidua na pozici 602 má rozhodující význam pro správnou funkci kanálu. Tyto výsledky naznačují možnost, že Ser602 představuje potenciální fosforylační místo, jehož prostřednictvím může specifická intracelulární signální kaskáda (kaskády) přispívat k přechodu kanálu do uzavřeného stavu. Jedním z obecných aspektů, které jsou obvykle zvažovány při rozhodování, zda identifikovaný aminokyselinový zbytek může představovat potenciální fosforylační místo, je jeho evoluční konzervovanost (Pearlman et al., 2011). Serin 602 není konzervován u všech živočišných druhů, ale je zcela konzervován u primátů včetně člověka. V tomto místě, ani v místě sousedního lysinu (K603) nebyl u lidského TRPA1 dosud identifikován žádný polymorfismus. Naproti tomu bylo v genu *TRPA1* zjištěno celkem 14 variant v blízkém okolí těchto reziduí: T598M (rs147715599), I599V (rs145600263), I599N (rs745749488), I600V (rs1236229851), R601S (rs148585412), R601T (rs1347666288), R604I (rs377764138), R604T, W605R (rs748788882), D606N, D606Y (rs1352827754), E607K (rs755681762), C608Y (rs747708313) a C608R (rs955642376). Některé z těchto polymorfismů mohou významně ovlivňovat fosforylační konsensus a/nebo vrátkování kanálu, a proto by bylo zajímavé zaměřit další výzkum na jejich potenciální účast v lidské patofyziologii.

5.3.4 Distální C-konec jako možné místo interakce TRPA1 s vápenatými ionty

Jedním z nejdůležitějších fyziologických aktivátorů TRPA1 jsou vápenaté ionty (Ca^{2+}), které procházejí otevřeným kanálem, nebo se uvolňují z vnitřních zásob, a v závislosti na aktivačním stavu kanálu dynamicky řídí jeho charakteristické vlastnosti, jakými jsou jednotková vodivost, iontová selektivita, pravděpodobnost otevření (Nagata et al., 2005; Cavanaugh et al., 2008; Patil et al., 2010; Nilius et al., 2011) a míra povrchové exprese (Schmidt et al., 2009). V nízkých koncentracích aktivují Ca^{2+} ionty kanál z intracelulární strany ($\text{EC}_{50}=0.9\text{-}6\ \mu\text{M}$) (Doerner et al., 2007; Zurborg et al., 2007) a silně zvyšují odpovědi vyvolané chemickými a napětovými podněty. Po zvýšení odpovědi následuje téměř úplná a nevratná inaktivace a oba procesy se urychlují při vyšších intracelulárních koncentracích Ca^{2+} (Wang et al., 2008). Ve snaze nalézt potenciální místo, prostřednictvím kterého by Ca^{2+} ionty mohly modulovat TRPA1, jsme se zaměřili na oblast distálního karboxylového konce, který obsahuje vysoce konzervovaný úsek záporně nabitých aminokyselinových zbytků $\text{E}_{1077}\text{TEDDD}_{1082}$ (Obr. 12A). Na základě nápadné sekvenční homologie této oblasti s Ca^{2+} -aktivační doménou draslíkového kanálu $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$ (Yuan et al., 2010) jsme zkonstruovali molekulární model chimérického proteinu a následnou simulaci molekulární dynamiky (200 ns) jsme prokázali stabilní vazbu iontu vápníku (Obr. 12A). Elektrofyzilogickými technikami a metodou mutagenese jsme ověřovali možnou úlohu záporně nabitých reziduí v této oblasti v interakci receptoru s Ca^{2+} . Neutralizace glutamátu

1077, nebo jeho záměna za kladně nabitě reziduum statisticky významně změnila vlastnosti proudových odpovědí zprostředkovaných TRPA1. Maximální odpovědi konstruktů E1077A a E1077K na depolarizační napětí a na skořicový aldehyd (+80 mV) byly statisticky významně vyšší a po přidání Ca^{2+} iontů se zvyšovaly méně než u přirozeného typu receptoru (Obr. 12B,C). Tyto výsledky podpořily možnou úlohu E1077 v regulaci kanálu Ca^{2+} ionty.



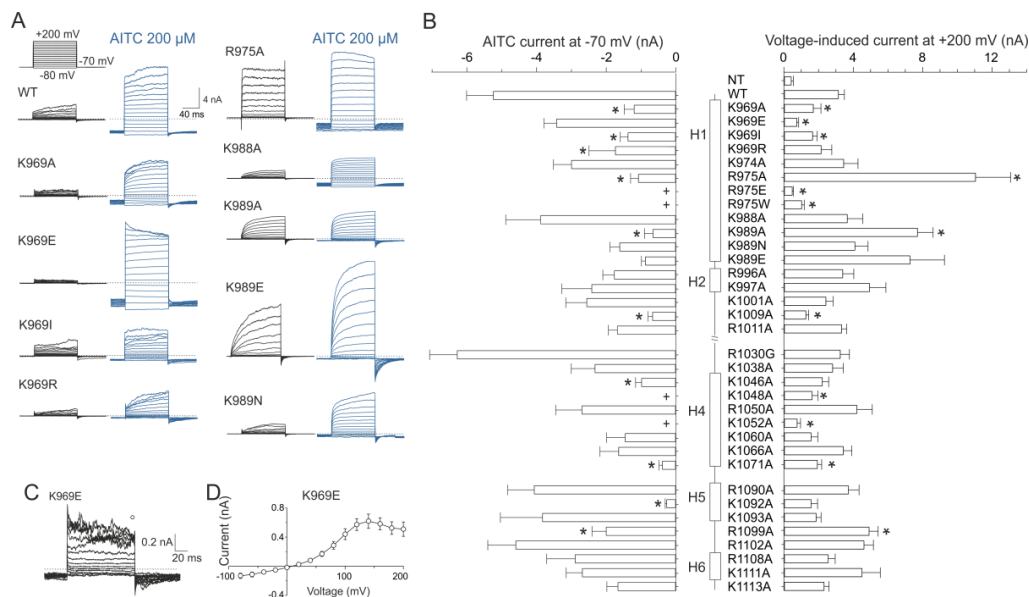
Obr. 12

Mutace negativně nabitých reziduí v kyselé oblasti C-konce mění míru potenciace TRPA1 vápenatými ionty (Ca^{2+}). (A) Nahoře, sekvenční porovnání Ca^{2+} -vazebné domény $K_{\text{Ca}1.1}$ (podle dřívější nomenklatury hSlo1 BK) s C-koncovou oblastí TRPA1. Dole, homologní model Ca^{2+} -vazebné oblasti $K_{\text{Ca}1.1}$ -TRPA1 chimérického proteinu. (B) Souhrnné výsledky mutagenese v záporně nabitě oblasti C-konce TRPA1. Sloupcový graf orientovaný vlevo: průměrné amplitudy proudů vyvolaných na +80 mV v extracelulárním roztoku bez Ca^{2+} (Control) a v přítomnosti skořicového aldehydu (Cin; 100 μM). Sloupcový graf orientovaný vpravo: průměrná míra maximální potenciace proudů vyvolaných skořicovým aldehydem Ca^{2+} ionty (2 mM). Statisticky významné rozdíly jsou indikovány hvězdičkou ($P < 0.05$; $n \geq 8$). (C) Časový průběh proudů vyvolaných skořicovým aldehydem (Cin) u indikovaných konstruktů a jejich potenciace Ca^{2+} ionty (2 mM). Trvání aplikace roztoků je vyznačeno nad záznamy, které jsou zobrazeny jako průměr + střední chyba průměru ($n \geq 6$) (Sura et al., 2012).

5.3.5 Regulace TRPA1 fosfolipidy

Záporně nabitě ligandy, jako jsou fosfoinositidy nebo anorganické polyfosfáty, regulují aktivitu TRPA1 z cytoplazmatické strany (Karashima et al., 2008; Nilius et al., 2008; Rohacs, 2009). Na základě analogie s napěťově řízenými draslíkovými kanály (KCNQ, Kir) a různými iontovými kanály rodiny TRP (TRPV1, TRPM4, TRPM8) jsou potenciálními kandidáty pro interakci TRPA1 s těmito ligandy shluky kladně nabitých aminokyselinových zbytků na cytoplazmatickém C-konci, lokalizované v blízkosti vnitřní části plazmatické membrány (Nilius et al., 2008; Suh and Hille, 2008; Rohacs, 2009). V naší studii zaměřené na odhalení možného mechanismu fyziologické regulace lidského TRPA1 negativně nabitými ligandy jsme jednotlivě zaměnili náboje 27 kladně nabitých aminokyselinových zbytků podél celého C-konce a charakterizovali jsme membránové proudy aktivované depolarizačním napětím a allylthiokyanátem (AITC; 200 μM) (Obr. 13). Systematickou analýzou jsme identifikovali místa (969, 975, 989, 1009, 1046, 1071, 1092 a 1099), na nichž je přítomnost kladného náboje je důležitá pro alosterickou regulaci kanálu chemickými i napěťovými podněty (Samad et al., 2011). Na základě těchto výsledků jsme předložili hypotézu, že identifikovaná rezidua mohou být interakčním místem pro fosfolipidy a/nebo se podílejí na převodu aktivizačních signálů do hradla kanálu. Kromě toho jsme charakterizovali tři kladně nabitá rezidua, R975A, K988A a K989A, jejichž neutralizace způsobila naopak významně vyšší citlivost receptoru k depolarizačnímu napětí, což naznačuje přímé zapojení v napěťově závislé modulaci TRPA1. Jedním z nejvýrazněji ovlivněných

konstruktů byl mutant K969E, který nevykazoval statisticky významné změny v průměrné amplitudě proudů vyvolaných AITC, ale při silně depolarizačních potenciálech (>+140 mV) se maximální proudy výrazně snižovaly (Obr. 13C,D). Záměna K969 za alanin, izoleucin, nebo arginin snížila celkovou aktivitu kanálu, což jsme vysvětlili nezastupitelnou strukturální úlohou kladně nabitého lysinu 969 při hradlování póru kanálu. Funkce tohoto rezidua byla skutečně potvrzena o téměř deset let později ve strukturální studii, která ukázala, že při otevření kanálu elektrofilními látkami je K969 klíčový pro změny dipólového momentu TRP helixů umožňujících rozšíření dolní části póru kanálu (Zhao et al., 2020).



Obr. 13

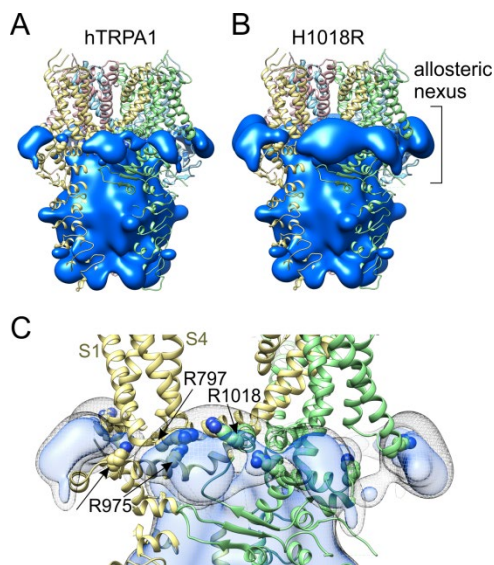
Kladná rezidua na C-konci lidského TRPA1 receptoru se nesterjně podílejí na aktivaci lidského TRPA1. (A) Reprezentativní proudové odpovědi přirozeného typu (WT) a mutantů TRPA1 vyvolané sérií napěťových pulzů (protokol, vlevo nahoře) v kontrolním extracelulárním roztoku (černé záznamy) a v přítomnosti allylisothiokyanátu (AITC; modré záznamy). (B) Souhrnné výsledky mutagenese získané nejméně ze šesti nezávislých měření pro každý mutant. Zobrazeny jsou průměrné hodnoty a střední chyba průměru. Statistická významnost je indikována hvězdičkou ($P < 0.01$). Predikovaná sekundární struktura je indikována uprostřed jako vertikální čára a obdélníky (α -helixy H1, H2, H4-6). (C) Záznam proudových odpovědí konstruktů K969E na napěťovou stimulaci. (D) Průměrná proudově-napěťová závislost K969E odvozená z 8 nezávislých měření, odečtená na konci napěťových pulzů (označeno prázdným symbolem nad záznamem v C) (Samad et al., 2011).

Na možnost interakce proximální části C-konce TRPA1 s negativně nabitými fosfolipidy jsme se zaměřili podrobněji v následných dvou studiích, ve kterých jsme pomocí biofyzikálních metod zjišťovali afinitu k lipidovým membránám pro specifické peptidy navržené tak, aby zahrnovaly kladná rezidua, u nichž byla námi identifikována nejvýraznější změna při záměně za neutrální reziduum (Samad et al., 2011). První studovaný peptid (H1) byl navržen na základě sekvence I⁹⁶⁴AEVQKHASKRIAMQVELHTSLEKKLPL⁹⁹². Ve spolupráci s Univerzitou v Bordeaux jsme využili lipidové modelové systémy složené z aniontových a amfoterních (zwitteriontových) lipidů, které jsou typické pro vnitřní list lipidové membrány (Witschas et al., 2015). Studovány byly strukturální změny peptidu, ke kterým dochází při interakci s lipidy, a také vliv této interakce na uspořádání a integritu lipidů. Výsledky naší studie potvrdily, že peptid, který odpovídá proximální části C-konce TRPA1, interaguje s modelovými systémy lipidových membrán.

Výrazná interakce a zvýšená afinita byla pozorována zejména u membrán obsahujících aniontové lipidy. Při kontaktu s aniontovými membránami měnil peptid svou sekundární strukturu z náhodné na převážně β -listovou. Afinita, fluidita membrány a sekundární struktura peptidu se lišily u membrán obsahujících fosfatidylserin, fosfatidylglycerol a PIP_2 , což svědčí o specifčnosti interakcí. Dalšími dvěma predikovanými místy interakce TRPA1 s membránovými fosfolipidy jsou oblasti C-konce L992-N1008 bezprostředně následující za prvním analyzovaným α -helixem H1 a překrývající se oblast T1003-P1034. Podobně jako v předchozí studii jsme za využití modelových lipidových membrán charakterizovali dva specifické peptidy navržené podle uvedených primárních sekvencí s cílem získat informace o jejich sekundární struktuře, afinitě a účincích v prostředí lipidů. Výsledky ukázaly, že oba peptidy interagují s lipidovými membránami pouze v přítomnosti PIP_2 , jejich vazba je povrchová (s nejvyšší pravděpodobností elektrostatická) a afinita závisí na přítomnosti vápenatých iontů (Macikova et al., 2019a). Porovnání sekvencí různých ortologů TRPA1 v oblasti druhého peptidu ukázalo, že nejvíce konzervovaným reziduem je fenylalanin 1020 lokalizovaný uprostřed predikovaného krátkého α -helixu. Tento aminokyselinový zbytek jsme nahradili glycinem, abychom lokálně narušili strukturu kanálu, a tím jeho předpokládanou interakci s PIP_2 . Pomocí elektrofyziologických technik jsme porovnali aktivační vlastnosti konstruktů s přirozeným typem receptoru. Mutantní kanály F1020G vykazovaly rychlejší aktivační kinetiku, jejich napěťová závislost byla posunuta k více pozitivním membránovým potenciálům a tyto změny závisely na vnější koncentraci Ca^{2+} . K popisu časového průběhu aktivační fáze napěťových odpovědí jsme využili alosterický model (viz 2.4), který naznačil, že mutace F1020G oslabila alosterické propojení předpokládaného napěťového senzoru s hradlem kanálu a zvýšila rovnovážnou konstantu charakterizující přechod mezi jeho neaktivním a aktivovaným stavem. Přítomnost Ca^{2+} ovlivnila rovnováhu mezi zavřeným a otevřeným stavem u konstruktů F1020G, nikoliv však u přirozeného typu kanálu, což naznačuje, že konformační změny způsobené mutací závisí na vápenatých iontech.

Významnou úlohu krátkého α -helixu obsahujícího F1020 v regulaci TRPA1 zprostředkované PIP_2 podpořila také naše navazující studie (Zimova et al., 2020), která se zaměřila na histidin 1018 nacházející se v těsné blízkosti F1020. Záměna H1018 za arginin u lidského TRPA1 (rs959976) byla v nedávné době dána do souvislosti se zvýšenou incidencí dětského astmatu (Gallo et al., 2017). Předpokládali jsme, že arginin v poloze 1018 může měnit afinitu PIP_2 k TRPA1, a tím ovlivňovat teplotní aktivaci kanálu. Některé struktury termosenzitivních TRP kanálů obsahují lipidy v oblastech, které se podílejí na otevření kanálu a nasvědčují tomu, že asociace/disociace lipidů může být jedním ze základních mechanismů teplotní aktivace (Cao et al., 2013b; Nadezhdin et al., 2021). Pomocí depolarizačních napěťových pulzů od -100 mV do +100 mV jsme měřili proudové odpovědi vyvolané chladem (15 °C) v HEK293T buňkách exprimujících lidský TRPA1, mutant H1018R, nebo TRPA1 společně s napěťově závislou fosfatázou (Dr-VSP), která selektivně depletuje PIP_2 (Hossain et al., 2008; Zimova et al., 2018). Naše výsledky ukázaly, že na záporných membránových potenciálech jsou odpovědi H1018R na chlad vyšší než u přirozeného typu TRPA1. Naproti tomu deplece PIP_2 způsobila významné snížení citlivosti TRPA1 k chladu. Simulace molekulární dynamiky (Obr. 14) ukázala, že záměna H1018R výrazně rozšířila kladný elektrostatický potenciál obklopující „alosterický nexus“

(spojovací doménu) nacházející se těsně pod transmembránovou oblastí kanálu, což naznačuje zvýšenou pravděpodobnost vazby PIP₂.



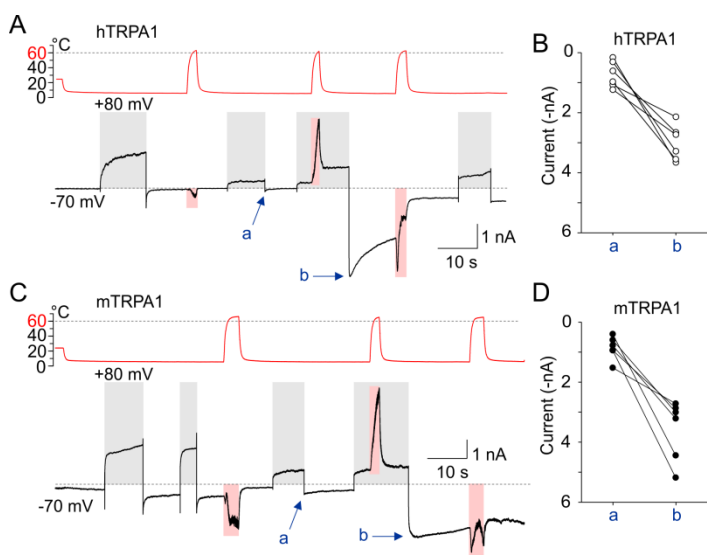
Obr. 14

Molekulární simulace TRPA1 a H1018R (Zimova et al., 2020). (A) Oblasti kladného elektrostatického potenciálu (modrý povrch) obklopující strukturu TRPA1 (PDB: 6PQQ) a (B) H1018R. (C) Detailní pohled na oblast kolem spojující oblasti („allosteric nexus“) ukazuje podstatně více pozitivní hodnoty pro H1018R než pro TRPA1 (znázorněno jako světle šedá síť obklopující světle modrý povrch). Nedávno bylo navrženo, že alosterický nexus tvořený cytoplazmatickou oblastí nacházející se pod transmembránovou oblastí kanálu je důležitým determinantem pro vazbu fosfolipidů i pro funkci hradla TRPA1 (Suo et al., 2020; Zhao et al., 2020).

5.3.6 Teplotní regulace TRPA1

Citlivost TRPA1 na chlad se liší u primátů a hlodavců a za tento rozdíl zodpovídá jediný aminokyselinový zbytek v 5. transmembránovém segmentu S5 (Chen et al., 2013). Pomocí chimérických konstruktů potkaních a lidských TRPA1 proteinů byl identifikován V875 u primátů, odpovídající G878 u hlodavců, a bylo prokázáno, že mutace G878V porušuje chladovou aktivaci myšího a potkaního TRPA1 receptoru. Stejná oblast S5 se uplatňuje také v aktivaci TRPA1 neelektrofilními agonisty (mentol, karvakrol, thymol, eudesmol), ale také některými celkovými anestetiky (isofluran, desfluran a propofol) (Xiao et al., 2008; Paulsen et al., 2015; Meents et al., 2016). Mutace v S5 navíc mohou silně ovlivnit napěťovou závislost kanálu (Zima et al., 2015). Je známo, že teplotní aktivace termoTRP kanálů je spojena s posunem proudově-napěťové závislosti a pro formální popis experimentálních měření aktivity kanálů byl dříve navržen jednoduchý dvoustavový model (Voets et al., 2004). Přestože tento model za určitých podmínek popisuje uspokojivě aktivitu myšího TRPA1 (Karashima et al., 2009), alternativní kinetické modely jsou schopny přesněji zachytit charakteristickou alosterickou povahu aktivace některých termoTRP kanálů (viz 2.3, Obr. 2D,E). V našich experimentech jsme pomocí alosterického modelu navrženého autory Jara-Oseguera a Islas (Jara-Oseguera and Islas, 2013) porovnávali teplotně a napěťově závislé vlastnosti lidského (hTRPA1) a myšího (mTRPA1) receptoru s cílem odhalit základní rozdíly mezi jejich aktivačními mechanismy (Sinica et al., 2019). Při stimulaci depolarizačním napětím vykazovaly aktivační a deaktivací kinetické parametry obou ortologů pouze mírnou teplotní závislost v rozsahu 12-35 °C. Rovnovážný stav při pokojové teplotě (25 °C) byl u mTRPA1 ve srovnání s hTRPA1 výrazně posunutý směrem k otevřenému stavu. Lidský i myší ortolog TRPA1 vykazovaly bimodální teplotní charakteristiku, tj. aktivita kanálů byla zvýšena působením chladu i tepla. Tento výsledek byl v souladu s již dříve publikovanými výsledky získanými na purifikovaném hTRPA1 rekonstituovaném v lipidové dvojvrstvě (Moparathi et al., 2016). Zcela nečekané však bylo naše pozorování, že přechodným působením depolarizačního napětí (+80 mV) aplikovaného současně s teplem nad 60 °C byla vyvolána chladová citlivost u obou ortologů

(Obr. 15). Při ochlazení na 5-8 °C a následné repolarizaci na -70 mV byla několikanásobně zvýšena amplituda membránových proudů vyvolaných chladem a tato aktivita byla potlačena až opětovným působením vysokých teplot (60 °C). Tyto výsledky odhalily nový specifický způsob aktivace TRPA1, který dosud nebyl v literatuře popsán. Na základě alosterického modelu jsme vyslovili hypotézu, že současná aktivace napěťového a teplotního senzoru může vyvolat konformační změnu, která vede ke zvýšení energetického propojení obou senzorů, zvýšení rovnovážné konstanty hradlování a dramatickému (~30 000-násobnému) snížení míry propojení napěťového senzoru s hradlem kanálu.

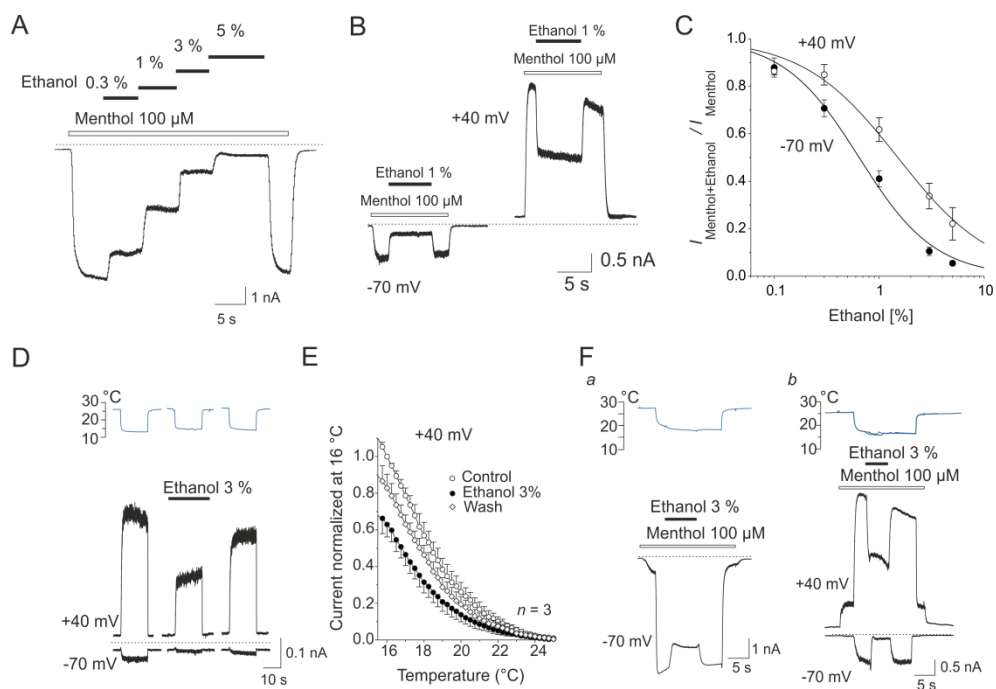


Obr. 15

Současná aktivace napěťového a teplotního senzoru zvyšuje chladovou citlivost TRPA1. (A,C) Záznam membránových proudů zprostředkovaných hTRPA1 (A) a mTRPA1 (C) při stimulaci napětím (+80 mV; šedé stínování) a teplem (60°C; růžové stínování). (B,D) Porovnání amplitud chladových odpovědí měřených před (a) a po (b) současné stimulaci teplem a depolarizačním napětím (Sinica et al., 2019).

5.4 Modulační mechanismy chladové a chemické aktivace TRPM8

TRPM8 je neselektivní kationtový kanál, který je aktivován nízkými teplotami (< 22 °C), chladivými látkami mentolem, icilinem a eukalyptolem (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002) a depolarizačním napětím (Brauchi et al., 2004; Voets et al., 2004). Aktivita kanálu je pozitivně regulována signálním membránovým fosfolipidem fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátem (PIP₂) (Rohacs et al., 2005). Naproti tomu účinným negativním modulátorem TRPM8 je etanol (Weil et al., 2005). Skutečnost, že funkce TRPM8 kriticky závisí na interakci TRPM8-PIP₂, přičemž etanol může snadno pronikat do membrán a narušovat jejich lipidovou strukturu, nás vedla k hypotéze, že může existovat korelace mezi těmito dvěma modulačními mechanismy (Benedikt et al., 2007). V naší studii jsme prokázali, že etanol v klinicky relevantních koncentracích (>17 mM) inhibuje aktivitu TRPM8 vyvolanou chladem a mentolem. Tato inhibice je rychlá, vratná a závislá na membránovém potenciálu. Proudů vyvolané mentolem (100 μM) byly etanolem inhibovány více na negativních potenciálech (IC₅₀ = 0.7 ± 0.1% na -70 mV; n = 11) než na kladných potenciálech (IC₅₀ = 1.5 ± 0.3% na +40 mV; n = 4). Napěťová závislost chladem aktivovaných proudů se v přítomnosti etanolu posunula směrem k více pozitivním membránovým potenciálům.



Obr. 16

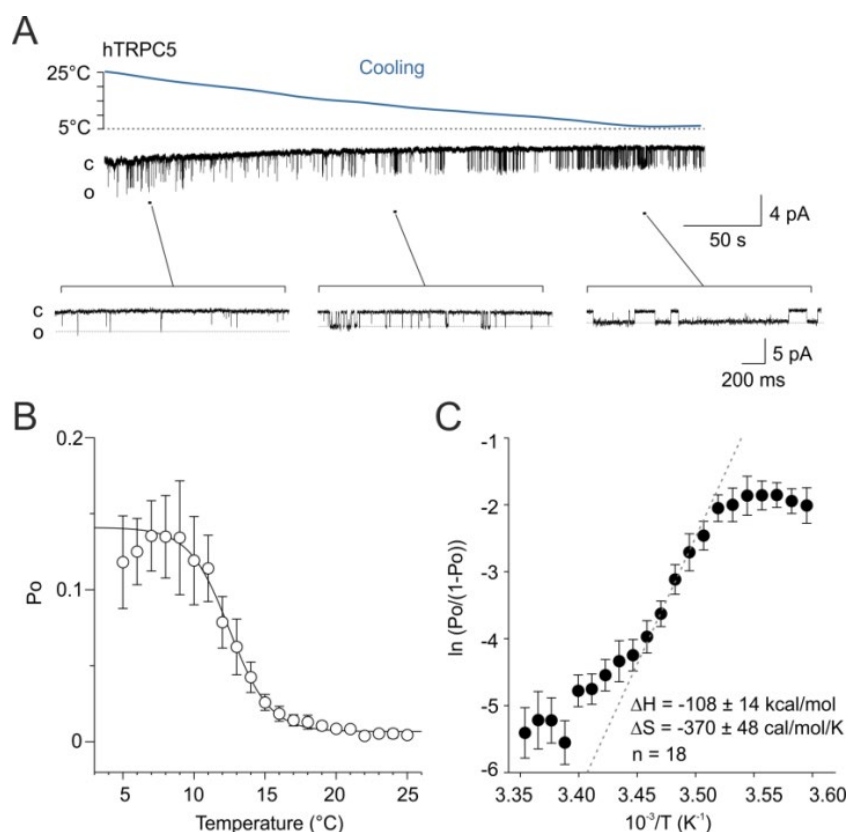
Etanolem indukovaná inhibice TRPM8 membránových proudů vyvolaných mentolem. (A) Reprezentativní záznam membránového proudu vyvolaného mentolem v přítomnosti zvyšující se koncentrace etanolu (membránový potenciál -70 mV). (B) Záznam proudů vyvolaných mentolem na -70 mV a +40 mV (25 °C). (C) Koncentrační závislost inhibice TRPM8 etanolem. (D) Účinky etanolu na proudy vyvolané chladem na záporných a kladných membránových potenciálech. (E) Závislost průměrné amplitudy proudů na teplotě (+40 mV) v kontrolním extracelulárním roztoku a v přítomnosti etanolu. (F) Vliv etanolu na synergickou interakci mentolu a chladu (Benedikt et al., 2007).

Míra inhibice byla silně snížena u buněk dialyzovaných PIP₂ (ze 60 % na 20 % pro 1% etanol a z 90 % na 50 % pro 3% etanol). Aplikace exogenního PIP₂ z cytoplazmatické strany membrány vedlo ke čtyřnásobnému snížení míry tachyfyaxe odpovědi vyvolaných mentolem, což potvrzuje, že PIP₂ skutečně dosáhl svého místa působení na receptor. Vzhledem k tomu, že TRPM8 má vyšší zjevnou afinitu k PIP₂ na kladných membránových potenciálech (Rohacs et al., 2005), v souhrnu naše výsledky podpořily funkční souvislost účinku etanolu s působením membránového PIP₂ na receptor. Etanol a mentol jsou dva odlišné typy látek zvyšujících průnik kůží, které se často používají v kombinaci v různých transdermálních terapeutických systémech (Kobayashi et al., 1994), jako jsou například přípravky pro lokální aplikaci anestetik. Výsledky naší studie poskytují empirický základ pro vysvětlení některých pozorovaných účinků kombinace obou látek v systémech zahrnujících TRPM8 kanály.

5.5 Aktivace TRPC5 chladem

TRPC5 byl zařazen do skupiny termoTRP kanálů jako poslední v pořadí (Zimmermann et al., 2011), a patří proto k nejméně prozkoumaným z hlediska teplotní aktivace. Tento iontový kanál byl nejdříve identifikován jako klíčový molekulární detektor chladu uplatňující se v lokální teplotní adaptaci v periferním nervovém systému (Zimmermann et al., 2011). Po dlouhou dobu bylo studium biofyzikálních vlastností TRPC5 a pochopení jeho biologických funkcí v nativních

systemech značně omezené z důvodu chybějících specifických agonistů a antagonistů. Většina studií vycházela z nepřímého způsobu aktivace TRPC5 prostřednictvím receptorů spřažených s $G_{q/11}$ proteiny, který je společný pro celou kanonickou podrodinu TRP receptorů (Rohacs, 2013). V roce 2015 byl objeven vysoce účinný a selektivní nízkomolekulární aktivátor (-)Englerin A a o dva roky později specifický inhibitor Pico145 (Akbulut et al., 2015; Rubaiy et al., 2017). Také díky tomuto pokroku byla ve zcela nedávné době rozpoznána specifická úloha TRPC5 v mechanismech vzniku neuropatické a zánětlivé bolesti v periferním nervovém systému (Sadler et al., 2021) a chladové bolesti v odontoblastech (Bernal et al., 2021).



Obr. 17

Chladová aktivace TRPC5 kanálu. (A) Záznam (7min) jednotkových proudů, snímaných v konfiguraci cell-attached (+120 mV). Teplota je zobrazena nad záznamem. Dole, 2s- úseky záznamu ve vyšším časovém rozlišení. „c“ značí uzavřený stav kanálu. (B) Závislost průměrné pravděpodobnosti otevření na teplotě. Aproximace Boltzmannovou funkcí (plná čára). (C) Van't Hoffův graf. Hodnoty změn entalpie a entropie byly vypočteny ze sklonu a průsečíku přímky lineární regrese (čárkovaná čára) (Ptakova et al., 2022).

V naší studii jsme se zaměřili na podrobnou charakterizaci chladové aktivace lidského TRPC5. Analyzovali jsme změny jednotkové aktivity na intaktních HEK293T buňkách exprimujících TRPC5 při lineárně se snižující teplotě vnějšího roztoku z 25 °C na 5 °C (Ptakova et al., 2022). Ukázali jsme, že v intervalu 16 až 11 °C vykazuje pravděpodobnost otevření kanálu strmou teplotní závislost, kterou lze charakterizovat teplotním koeficientem $Q_{10} = 0.04$, což je hodnota podobná jako pro některé další teplotně aktivované TRP kanály (Voets, 2012). Naproti tomu v přítomnosti Englerinu A nebo karbacholu byla pravděpodobnost otevření kanálů při

ochlazení z 25 °C na 5 °C zvýšena přibližně 4-5krát, což značí poměrně mírnou závislost na chladu, odpovídající hodnotě Q_{10} přibližně 0.5. Mutantní kanály T970A a D652K/E653K vykazovaly zvýšenou bazální aktivitu při teplotě 25 °C a jejich teplotní závislost byla v porovnání s přirozeným typem receptoru významně nižší. Treonin 970 je místem, ze kterého je regulována aktivita TRPC5 fosforylací proteinkinázou C, která oslabuje interakci mezi TRPC5 a PIP_2 (Ningoo et al., 2021) a disociuje vazbu proteinu NHERF (regulační faktor Na^+/H^+ přenašeče) na vysoce konzervovaný vazebný motiv PDZ. Tím se kanál stává citlivým na diacylglycerol (DAG). Citlivost k DAG může TRPC5 získat také deplecí PIP_2 (Storch et al., 2017). PIP_2 má pravděpodobně navíc důležitou úlohu v mechanismu, kterým STIM1 (stromální interakční molekula 1) a TRPC (TRPC1/3/4/5/6) funkčně komunikují prostřednictvím dvojice konzervovaných opačně nabitých reziduí na C-koncových doménách (Lee et al., 2010). V případě TRPC5 se jedná o interakci dvou negativních reziduí D652 a E653 s kladně nabitými aminokyselinovými zbytky C-koncové domény STIM1 K684 a K685. Jak elektrostatická interakce moduluje aktivitu TRPC, není známo, ale byl navržen pravděpodobný mechanismus, jehož prostřednictvím může STIM1 zvyšovat počet funkčních kanálů v doménách bohatých na PIP_2 , a tím stabilizovat jejich aktivitu (Bodnar et al., 2017). Naše data tak nepřímo prokazují potenciální úlohu PIP_2 v aktivaci TRPC5 chladem. Snížení hladiny PIP_2 v plazmatické membráně v blízkosti TRPC5, způsobené buď chybným transportem TRPC5 do domén bohatých na PIP_2 (vlivem mutací D652K/E653K), nebo oslabením interakce TRPC5- PIP_2 (vlivem mutace T970A zamezující fosforylaci), může propůjčit TRPC5 schopnost vázat DAG, a tím zvýšit bazální aktivitu kanálu na 25°C.

Vzhledem k potenciální úloze TRPC5 jako terapeutického cíle pro léčbu neuropatické bolesti vyvolané chladem (Sadler et al., 2021), přecitlivělosti dentinu a zánětlivé bolesti zubů (Bernal et al., 2021) by nové poznatky o mechanismu teplotní aktivace TRPC5 mohly pomoci při hledání nových terapeutických přístupů k prevenci akutní i chronické bolesti. V naší navazující studii (Zimova et al., 2022) jsme se proto zaměřili na testování možnosti modulace aktivity TRPC5 inhibítorem zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu duloxetinem. Tato látka je lékem (v České republice pod obchodními názvy Cymbalta, Dolyxan, Dulasolan) původně využívaným k léčbě depresivní poruchy, ale také je jediným lékem, který prokázal účinnost v případě závažných periferních bolestivých stavů vyvolaných chladem, souvisejících s diabetickou neuropatií a neuropatií vzniklou v důsledku nežádoucích neurotoxických účinků cytostatik (Perahia et al., 2006; Loprinzi et al., 2020). Naše výsledky ukázaly, že duloxetin v klinicky relevantních koncentracích blokuje chladem vyvolanou aktivitu lidského TRPC5 (Zimova et al., 2022), což může představovat jeden z mechanismů, kterými tato látka účinně působí v periferním nervovém systému.

6 Shrnutí a závěr

6.1 Náš autorský tým jako první prokázal modulární úlohu cytoplazmatického karboxylového konce **TRPV1** v teplotní, chemické a napěťové aktivaci. Předpověděli jsme strukturní uspořádání pórové domény TRPV1 a identifikovali rezidua, která jsou součástí vnitřního hradla kanálu. Charakterizovali jsme funkční úlohu transmembránového segmentu S4 a spojující oblasti S4-S5 v napěťové a teplotní aktivaci a určili čtyři potenciální místa citlivá k depolarizačnímu napětí (R557, E570, D576 a R579). Tyto výsledky potvrdily, že nabitě postranní řetězce v oblasti S4-S5 mají odlišnou úlohu v regulaci teplem a agonisty u různých členů vaniloidní podskupiny TRP. Prokázali jsme, že míra a charakter teplotní aktivace TRPV1 závisí na oxidačně-redukčním stavu cytoplazmatického i extracelulárního prostředí. Odhalili jsme místo potenciální interakce vnější části segmentu S1 s pórovým helixem sousední podjednotky stabilizující otevřenou konformaci kanálu a určující citlivost k protonům. Popsali jsme mechanismus desenzitizace závislé na Ca^{2+} a identifikovali oblast zahrnující pórový helix a externí linker mezi pórovým helixem a transmembránovým segmentem S6 jako místo interakce kofaktoru s TRPV1. Tyto výsledky přispívají k pochopení molekulární podstaty teplotní aktivace kanálu TRPV1, mechanismů jeho regulace v přirozeném prostředí a procesů, kterými se tento kanál podílí na detekci teplotních, napěťových a chemických podnětů na sensorických neuronech. Získané informace o struktuře a funkci jsou také nezbytné pro racionální návrh potenciálních látek s analgetickým účinkem.

6.2 Pomocí cílené mutagenese se nám podařilo v cytoplazmatické oblasti lidského **TRPV3** identifikovat funkčně významné rozhraní mezi podjednotkami, které stabilizuje otevřený stav kanálu při teplotní aktivaci. V této klíčové oblasti (N251–E257) jsme určili hlavní strukturní determinanty teplotní senzitivace TRPV3 kanálu. Naše simulace molekulární dynamiky odhalila místa největší flexibility při zvýšení teploty o 30 K, a potvrdila tak hypotézu o strukturních změnách, které doprovázejí proces senzitivace při aktivaci teplem, nebo jsou přímo příčinou teplotní senzitivace. Naše výsledky spolu s později publikovanými strukturními studiemi jiných týmů přispěly k zatím nejlépe popsánému schématu teplotní aktivace a senzitivace termoTRP receptoru. Kromě toho jsme popsali mechanismus regulace lidského TRPV3 prostřednictvím fosforylační kaskády mitogenem aktivované proteinkinázy, který se uplatňuje v nativním prostředí keratinocytů. Identifikovali jsme threonin 264 v ankyrinové doméně TRPV3 jako potenciální místo fosforylace.

6.3 Identifikovali jsme hlavní strukturní determinanty polymodální regulace **TRPA1** kanálu. Ukázali jsme, že konzervovaná záporně nabitá rezidua ve vnitřní kavitě senzoru (E788 a E808) mohou být klíčovým interakčním místem, ze kterého je aktivita kanálu regulována vápenatými ionty a membránovými fosfolipidy. Prokázali jsme důležitou regulační a stabilizující úlohu vnější části flexibilní kličky mezi prvními dvěma transmembránovými segmenty. Ukázali jsme, že záměnou N855S-TRPA1, která je podkladem dědičného onemocnění u lidí, je strukturní změna S4-S5 oblasti, v jejímž důsledku se zvýší účinnost elektrofilních agonistů a sníží míra inaktivace závislé na vápenatých iontech. Rozhraní mezi podjednotkami TRPA1 je přitom stabilizováno interakcí mezi E854 a K868. Později publikované struktury lidského TRPA1 podpořily správnost našich hypotéz (Paulsen et al., 2015; Suo et al., 2020; Zhao et al., 2020). Popsali jsme N-konec TRPA1 jako potenciální místo fosforylace a distální oblast C-konce jako možné místo interakce TRPA1 s vápenatými ionty.

6.4 Charakterizovali jsme základní parametry chladové aktivace **TRPM8** a **TRPC5** receptorů a určili jsme, do jaké míry je teplotní práh pro aktivaci chladem determinován fosfolipidy či signálními drahami. Prokázali jsme funkční souvislost inhibičního účinku etanolu na aktivitu TRPM8 vyvolanou chladem a mentolem s působením membránového fosfolipidu PIP₂. Tyto výsledky mohou poskytnout vysvětlení některých pozorovaných účinků kombinace obou látek v některých systémech využívaných pro lokální potlačení bolesti. Termodynamická analýza chladem vyvolané aktivity lidských TRPC5 kanálů odhalila výrazné změny entalpie (-108 kcal·mol⁻¹) a entropie (-370 cal·mol⁻¹·K⁻¹), což svědčí o významných konformačních změnách provázejících proces otevření kanálu. Citlivost TRPC5 na chlad závisí na fosforylačním stavu treoninu 970 a homeostázi intracelulárního vápníku.

7 Literární odkazy

- Akbulut, Y., H.J. Gaunt, K. Muraki, M.J. Ludlow, M.S. Amer, A. Bruns, N.S. Vasudev, L. Radtke, M. Willot, S. Hahn, T. Seitz, S. Ziegler, M. Christmann, D.J. Beech, and H. Waldmann. 2015. (-)-Englerin A is a potent and selective activator of TRPC4 and TRPC5 calcium channels. *Angew. Chem.* 54:3787-3791.
- Arrigoni, C., and D.L. Minor, Jr. 2018. Global versus local mechanisms of temperature sensing in ion channels. *Pflugers Arch.* 470:733-744.
- Bamps, D., J. Vriens, J. de Hoon, and T. Voets. 2021. TRP Channel Cooperation for Nociception: Therapeutic Opportunities. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 61:655-677.
- Bandell, M., G.M. Story, S.W. Hwang, V. Viswanath, S.R. Eid, M.J. Petrus, T.J. Earley, and A. Patapoutian. 2004. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron.* 41:849-857.
- Barvikova, K., I. Barvik, V. Sinica, L. Zimova, and V. Vlachova. 2020. Phospho-Mimetic Mutation at Ser602 Inactivates Human TRPA1 Channel. *Int J Mol Sci.* 21.
- Benedikt, J., A. Samad, R. Ettrich, J. Teisinger, and V. Vlachova. 2009. Essential role for the putative S6 inner pore region in the activation gating of the human TRPA1 channel. *Biochim. Biophys. Acta.* 1793:1279-1288.
- Benedikt, J., J. Teisinger, L. Vyklicky, and V. Vlachova. 2007. Ethanol inhibits cold-menthol receptor TRPM8 by modulating its interaction with membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Neurochem.* 100:211-224.
- Bernal, L., P. Sotelo-Hitschfeld, C. König, V. Sinica, A. Wyatt, Z. Winter, A. Hein, F. Touska, S. Reinhardt, A. Tragl, R. Kusuda, P. Wartenberg, A. Sclaroff, J.D. Pfeifer, F. Ectors, A. Dahl, M. Freichel, V. Vlachova, S. Brauchi, C. Roza, U. Boehm, D.E. Clapham, J.K. Lennerz, and K. Zimmermann. 2021. Odontoblast TRPC5 channels signal cold pain in teeth. *Science advances.* 7.
- Bodnar, D., W.Y. Chung, D. Yang, J.H. Hong, A. Jha, and S. Muallem. 2017. STIM-TRP Pathways and Microdomain Organization: Ca(2+) Influx Channels: The Orai-STIM1-TRPC Complexes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 993:139-157.
- Boukalova, S., L. Marsakova, J. Teisinger, and V. Vlachova. 2010. Conserved Residues within the Putative S4-S5 Region Serve Distinct Functions among Thermosensitive Vanilloid Transient Receptor Potential (TRPV) Channels. *J. Biol. Chem.* 285:41455-41462.
- Boukalova, S., J. Teisinger, and V. Vlachova. 2013. Protons stabilize the closed conformation of gain-of-function mutants of the TRPV1 channel. *Biochim. Biophys. Acta.* 1833:520-528.
- Brauchi, S., P. Orio, and R. Latorre. 2004. Clues to understanding cold sensation: thermodynamics and electrophysiological analysis of the cold receptor TRPM8. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:15494-15499.

- Brauchi, S., G. Orta, M. Salazar, E. Rosenmann, and R. Latorre. 2006. A hot-sensing cold receptor: C-terminal domain determines thermosensation in transient receptor potential channels. *J. Neurosci.* 26:4835-4840.
- Broad, L.M., A.J. Mogg, E. Eberle, M. Tolley, D.L. Li, and K.L. Knopp. 2016. TRPV3 in Drug Development. *Pharmaceuticals.* 9.
- Buijs, T.J., and P.A. McNaughton. 2020. The Role of Cold-Sensitive Ion Channels in Peripheral Thermosensation. *Frontiers in cellular neuroscience.* 14:262.
- Cao, E. 2020. Structural mechanisms of transient receptor potential ion channels. *J. Gen. Physiol.* 152.
- Cao, E., J.F. Cordero-Morales, B. Liu, F. Qin, and D. Julius. 2013a. TRPV1 channels are intrinsically heat sensitive and negatively regulated by phosphoinositide lipids. *Neuron.* 77:667-679.
- Cao, E., M. Liao, Y. Cheng, and D. Julius. 2013b. TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature.* 504:113-118.
- Caterina, M.J., M.A. Schumacher, M. Tominaga, T.A. Rosen, J.D. Levine, and D. Julius. 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 389:816-824.
- Cavanaugh, E.J., D. Simkin, and D. Kim. 2008. Activation of transient receptor potential A1 channels by mustard oil, tetrahydrocannabinol and Ca(2+) reveals different functional channel states. *Neuroscience.* 154:1467-1476.
- Clapham, D.E., and C. Miller. 2011. A thermodynamic framework for understanding temperature sensing by transient receptor potential (TRP) channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108:19492-19497.
- Dittert, I., J. Benedikt, L. Vyklicky, K. Zimmermann, P.W. Reeh, and V. Vlachova. 2006. Improved superfusion technique for rapid cooling or heating of cultured cells under patch-clamp conditions. *J. Neurosci. Methods.* 151:178-185.
- Diver, M.M., J.V.L. King, D. Julius, and Y. Cheng. 2022. Sensory TRP Channels in Three Dimensions. *Annu. Rev. Biochem.*
- Doerner, J.F., G. Gisselmann, H. Hatt, and C.H. Wetzel. 2007. Transient receptor potential channel A1 is directly gated by calcium ions. *J. Biol. Chem.* 282:13180-13189.
- Egan, T.J., M.A. Acuna, M. Zenobi-Wong, H.U. Zeilhofer, and D. Urech. 2016. Effects of N-Glycosylation of the human cation channel TRPA1 on agonist-sensitivity. *Biosci. Rep.*
- Gallo, V., F.N. Dijk, J.W. Holloway, S.M. Ring, G.H. Koppelman, D.S. Postma, D.P. Strachan, R. Granell, J.C. de Jongste, V.W. Jaddoe, H.T. den Dekker, L. Duijts, A.J. Henderson, and S.O. Shaheen. 2017. TRPA1 gene polymorphisms and childhood asthma. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology.* 28:191-198.
- Gao, Y., E. Cao, D. Julius, and Y. Cheng. 2016. TRPV1 structures in nanodiscs reveal mechanisms of ligand and lipid action. *Nature.* 534:347-351.
- Garcia-Avila, M., and L.D. Islas. 2019. What is new about mild temperature sensing? A review of recent findings. *Temperature.* 6:132-141.
- Gracheva, E.O., and S.N. Bagriantsev. 2015. Evolutionary adaptation to thermosensation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 34:67-73.
- Hall, B.E., M. Prochazkova, M.R. Sapio, P. Minetos, N. Kurochkina, B.K. Binukumar, N.D. Amin, A. Terse, J. Joseph, S.J. Raithele, A.J. Mannes, H.C. Pant, M.K. Chung, M.J. Iadarola, and A.B. Kulkarni. 2018. Phosphorylation of the Transient Receptor Potential Ankyrin 1 by Cyclin-dependent Kinase 5 affects Chemo-nociception. *Sci. Rep.* 8:1177.
- Hossain, M.I., H. Iwasaki, Y. Okochi, M. Chahine, S. Higashijima, K. Nagayama, and Y. Okamura. 2008. Enzyme domain affects the movement of the voltage sensor in ascidian and zebrafish voltage-sensing phosphatases. *J. Biol. Chem.* 283:18248-18259.

- Hynkova, A., L. Marsakova, J. Vaskova, and V. Vlachova. 2016. N-terminal tetrapeptide T/SPLH motifs contribute to multimodal activation of human TRPA1 channel. *Sci. Rep.* 6:28700.
- Chen, J., D. Kang, J. Xu, M. Lake, J.O. Hogan, C. Sun, K. Walter, B. Yao, and D. Kim. 2013. Species differences and molecular determinant of TRPA1 cold sensitivity. *Nat. Commun.* 4:2501.
- Cheng, X., J. Jin, L. Hu, D. Shen, X.P. Dong, M.A. Samie, J. Knoff, B. Eisinger, M.L. Liu, S.M. Huang, M.J. Caterina, P. Dempsey, L.E. Michael, A.A. Dlugosz, N.C. Andrews, D.E. Clapham, and H. Xu. 2010. TRP channel regulates EGFR signaling in hair morphogenesis and skin barrier formation. *Cell.* 141:331-343.
- Jara-Oseguera, A., and L.D. Islas. 2013. The role of allosteric coupling on thermal activation of thermo-TRP channels. *Biophys. J.* 104:2160-2169.
- Julius, D. 2013. TRP channels and pain. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 29:355-384.
- Karashima, Y., J. Prenen, V. Meseguer, G. Owsianik, T. Voets, and B. Nilius. 2008. Modulation of the transient receptor potential channel TRPA1 by phosphatidylinositol 4,5-biphosphate manipulators. *Pflugers Arch.* 457:77-89.
- Karashima, Y., K. Talavera, W. Everaerts, A. Janssens, K.Y. Kwan, R. Vennekens, B. Nilius, and T. Voets. 2009. TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:1273-1278.
- Kim, M., N.J. Sisco, J.K. Hilton, C.M. Montano, M.A. Castro, B.R. Cherry, M. Levitus, and W.D. Van Horn. 2020. Evidence that the TRPV1 S1-S4 membrane domain contributes to thermosensing. *Nat. Commun.* 11:4169.
- Kobayashi, D., T. Matsuzawa, K. Sugibayashi, Y. Morimoto, and M. Kimura. 1994. Analysis of the combined effect of 1-menthol and ethanol as skin permeation enhancers based on a two-layer skin model. *Pharm. Res.* 11:96-103.
- Koivisto, A.P., M.G. Belvisi, R. Gaudet, and A. Szallasi. 2022. Advances in TRP channel drug discovery: from target validation to clinical studies. *Nat. Rev. Drug Discov.* 21:41-59.
- Kremeyer, B., F. Lopera, J.J. Cox, A. Momin, F. Rugiero, S. Marsh, C.G. Woods, N.G. Jones, K.J. Paterson, F.R. Fricker, A. Villegas, N. Acosta, N.G. Pineda-Trujillo, J.D. Ramirez, J. Zea, M.W. Burley, G. Bedoya, D.L. Bennett, J.N. Wood, and A. Ruiz-Linares. 2010. A gain-of-function mutation in TRPA1 causes familial episodic pain syndrome. *Neuron.* 66:671-680.
- Krieger, E., and G. Vriend. 2014. YASARA View - molecular graphics for all devices - from smartphones to workstations. *Bioinformatics.* 30:2981-2982.
- Kwon, D.H., F. Zhang, Y. Suo, J. Bouvette, M.J. Borgnia, and S.Y. Lee. 2021. Heat-dependent opening of TRPV1 in the presence of capsaicin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 28:554-563.
- Latorre, R., S. Brauchi, G. Orta, C. Zaelzer, and G. Vargas. 2007. ThermoTRP channels as modular proteins with allosteric gating. *Cell Calcium.* 42:427-438.
- Laursen, W.J., E.R. Schneider, D.K. Merriman, S.N. Bagriantsev, and E.O. Gracheva. 2016. Low-cost functional plasticity of TRPV1 supports heat tolerance in squirrels and camels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 113:11342-11347.
- Lee, K.P., J.P. Yuan, I. So, P.F. Worley, and S. Muallem. 2010. STIM1-dependent and STIM1-independent function of transient receptor potential canonical (TRPC) channels tunes their store-operated mode. *J. Biol. Chem.* 285:38666-38673.
- Liao, M., E. Cao, D. Julius, and Y. Cheng. 2013. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature.* 504:107-112.
- Lin, Z., Q. Chen, M. Lee, X. Cao, J. Zhang, D. Ma, L. Chen, X. Hu, H. Wang, X. Wang, P. Zhang, X. Liu, L. Guan, Y. Tang, H. Yang, P. Tu, D. Bu, X. Zhu, K. Wang, R. Li, and Y. Yang. 2012. Exome sequencing reveals mutations in TRPV3 as a cause of Olmsted syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 90:558-564.
- Long, S.B., X. Tao, E.B. Campbell, and R. MacKinnon. 2007. Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature.* 450:376-382.

- Loprinzi, C.L., C. Lacchetti, J. Bleeker, G. Cavaletti, C. Chauhan, D.L. Hertz, M.R. Kelley, A. Lavino, M.B. Lustberg, J.A. Paice, B.P. Schneider, E.M. Lavoie Smith, M.L. Smith, T.J. Smith, N. Wagner-Johnston, and D.L. Hershman. 2020. Prevention and Management of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy in Survivors of Adult Cancers: ASCO Guideline Update. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 38:3325-3348.
- Macikova, L., V. Sinica, A. Kadkova, S. Villette, A. Ciaccafava, J. Faherty, S. Lecomte, I.D. Alves, and V. Vlachova. 2019a. Putative interaction site for membrane phospholipids controls activation of TRPA1 channel at physiological membrane potentials. *The FEBS journal*. 286:3664-3683.
- Macikova, L., L. Vyklicka, I. Barvik, A.I. Sobolevsky, and V. Vlachova. 2019b. Cytoplasmic Inter-Subunit Interface Controls Use-Dependence of Thermal Activation of TRPV3 Channel. *Int J Mol Sci*. 20.
- Marsakova, L., I. Barvik, V. Zima, L. Zimova, and V. Vlachova. 2017. The First Extracellular Linker Is Important for Several Aspects of the Gating Mechanism of Human TRPA1 Channel. *Front. Mol. Neurosci*. 10:16.
- Marsakova, L., F. Touska, J. Krusek, and V. Vlachova. 2012. Pore Helix Domain Is Critical to Camphor Sensitivity of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Channel. *Anesthesiology*. 116:903-917.
- Matos-Cruz, V., E.R. Schneider, M. Mastrotto, D.K. Merriman, S.N. Bagriantsev, and E.O. Gracheva. 2017. Molecular Prerequisites for Diminished Cold Sensitivity in Ground Squirrels and Hamsters. *Cell reports*. 21:3329-3337.
- McKemy, D.D., W.M. Neuhauser, and D. Julius. 2002. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*. 416:52-58.
- Meents, J.E., M.J. Fischer, and P.A. McNaughton. 2016. Agonist-induced sensitisation of the irritant receptor ion channel TRPA1. *J. Physiol*.
- Meents, J.E., M.J. Fischer, and P.A. McNaughton. 2017. Sensitization of TRPA1 by Protein Kinase A. *PLoS ONE*. 12:e0170097.
- Moparthi, L., T.I. Kichko, M. Eberhardt, E.D. Hogestatt, P. Kjellbom, U. Johanson, P.W. Reeh, A. Leffler, M.R. Filipovic, and P.M. Zygmunt. 2016. Human TRPA1 is a heat sensor displaying intrinsic U-shaped thermosensitivity. *Sci. Rep*. 6:28763.
- Moqrich, A., S.W. Hwang, T.J. Earley, M.J. Petrus, A.N. Murray, K.S. Spencer, M. Andahazy, G.M. Story, and A. Patapoutian. 2005. Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science*. 307:1468-1472.
- Moran, M.M. 2018. TRP Channels as Potential Drug Targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 58:309-330.
- Nadezhdin, K.D., A. Neuberger, Y.A. Trofimov, N.A. Krylov, V. Sinica, N. Kupko, V. Vlachova, E. Zakharian, R.G. Efremov, and A.I. Sobolevsky. 2021. Structural mechanism of heat-induced opening of a temperature-sensitive TRP channel. *Nat. Struct. Mol. Biol*. 28:564-572.
- Nagata, K., A. Duggan, G. Kumar, and J. Garcia-Anoveros. 2005. Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *J. Neurosci*. 25:4052-4061.
- Nguyen, T.H.D., S.G. Itoh, H. Okumura, and M. Tominaga. 2021. Structural basis for promiscuous action of monoterpenes on TRP channels. *Communications biology*. 4:293.
- Nilius, B., G. Owsianik, and T. Voets. 2008. Transient receptor potential channels meet phosphoinositides. *EMBO J*. 27:2809-2816.
- Nilius, B., J. Prenen, and G. Owsianik. 2011. Irritating channels: the case of TRPA1. *J. Physiol. (Lond)*. 589:1543-1549.

- Ningoo, M., L.D. Plant, A. Greka, and D.E. Logothetis. 2021. PIP2 regulation of TRPC5 channel activation and desensitization. *J. Biol. Chem.* 296:100726.
- Novakova-Tousova, K., L. Vyklicky, K. Susankova, J. Benedikt, A. Samad, J. Teisinger, and V. Vlachova. 2007. Functional changes in the vanilloid receptor subtype 1 channel during and after acute desensitization. *Neuroscience.* 149:144-154.
- Palovcak, E., L. Delemotte, M.L. Klein, and V. Carnevale. 2014. Evolutionary imprint of activation: the design principles of VSDs. *J. Gen. Physiol.* 143:145-156.
- Patil, M.J., N.A. Jeske, and A.N. Akopian. 2010. Transient receptor potential V1 regulates activation and modulation of transient receptor potential A1 by Ca²⁺. *Neuroscience.* 171:1109-1119.
- Paulsen, C.E., J.P. Armache, Y. Gao, Y. Cheng, and D. Julius. 2015. Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. *Nature.* 520:511-517.
- Pearlman, S.M., Z. Serber, and J.E. Ferrell, Jr. 2011. A mechanism for the evolution of phosphorylation sites. *Cell.* 147:934-946.
- Peier, A.M., A. Moqrich, A.C. Hergarden, A.J. Reeve, D.A. Andersson, G.M. Story, T.J. Earley, I. Dragoni, P. McIntyre, S. Bevan, and A. Patapoutian. 2002. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell.* 108:705-715.
- Perahia, D.G., Y.L. Pritchett, D. Desai, and J. Raskin. 2006. Efficacy of duloxetine in painful symptoms: an analgesic or antidepressant effect? *Int. Clin. Psychopharmacol.* 21:311-317.
- Pettersen, E.F., T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, and T.E. Ferrin. 2004. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25:1605-1612.
- Ptakova, A., M. Mitro, L. Zimova, and V. Vlachova. 2022. Cellular context determines primary characteristics of human transient receptor potential canonical 5 as a cold-activated channel. *J. Cell. Physiol.* In press.
- Rohacs, T. 2009. Phosphoinositide regulation of non-canonical transient receptor potential channels. *Cell Calcium.* 45:554-565.
- Rohacs, T. 2013. Regulation of transient receptor potential channels by the phospholipase C pathway. *Advances in Biol Regul.* 53:341-355.
- Rohacs, T., C.M. Lopes, I. Michailidis, and D.E. Logothetis. 2005. PI(4,5)P₂ regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat. Neurosci.* 8:626-634.
- Rubaiy, H.N., M.J. Ludlow, M. Henrot, H.J. Gaunt, K. Miteva, S.Y. Cheung, Y. Tanahashi, N. Hamzah, K.E. Musialowski, N.M. Blythe, H.L. Appleby, M.A. Bailey, L. McKeown, R. Taylor, R. Foster, H. Waldmann, P. Nussbaumer, M. Christmann, R.S. Bon, K. Muraki, and D.J. Beech. 2017. Picomolar, selective, and subtype-specific small-molecule inhibition of TRPC1/4/5 channels. *J. Biol. Chem.* 292:8158-8173.
- Sadler, K.E., F. Moehring, S.I. Shiers, L.J. Laskowski, A.R. Mikesell, Z.R. Plautz, A.N. Brezinski, C.M. Mecca, G. Dussor, T.J. Price, J.D. McCorvy, and C.L. Stucky. 2021. Transient receptor potential canonical 5 mediates inflammatory mechanical and spontaneous pain in mice. *Science translational medicine.* 13.
- Samad, A., L. Sura, J. Benedikt, R. Ettrich, B. Minofar, J. Teisinger, and V. Vlachova. 2011. The C-terminal basic residues contribute to the chemical- and voltage-dependent activation of TRPA1. *Biochem. J.* 433:197-204.
- Sanner, M.F. 1999. Python: a programming language for software integration and development. *J. Mol. Graphics Modell.* 17:57-61.
- Savage, S.R., and B. Zhang. 2020. Using phosphoproteomics data to understand cellular signaling: a comprehensive guide to bioinformatics resources. *Clinical proteomics.* 17:27.

- Schmidt, M., A.E. Dubin, M.J. Petrus, T.J. Earley, and A. Patapoutian. 2009. Nociceptive signals induce trafficking of TRPA1 to the plasma membrane. *Neuron*. 64:498-509.
- Singh, A.K., L.L. McGoldrick, L. Demirkhanyan, M. Leslie, E. Zakharian, and A.I. Sobolevsky. 2019. Structural basis of temperature sensation by the TRP channel TRPV3. *Nat. Struct. Mol. Biol.*
- Singh, A.K., L.L. McGoldrick, and A.I. Sobolevsky. 2018. Structure and gating mechanism of the transient receptor potential channel TRPV3. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 25:805-813.
- Sinica, V., L. Zimova, K. Barvikova, L. Macikova, I. Barvik, and V. Vlachova. 2019. Human and Mouse TRPA1 Are Heat and Cold Sensors Differentially Tuned by Voltage. *Cells*. 9.
- Storch, U., A.L. Forst, F. Pardatscher, S. Erdogmus, M. Philipp, M. Gregoritz, Y.S.M. Mederos, and T. Gudermann. 2017. Dynamic NHERF interaction with TRPC4/5 proteins is required for channel gating by diacylglycerol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 114:E37-E46.
- Story, G.M., A.M. Peier, A.J. Reeve, S.R. Eid, J. Mosbacher, T.R. Hricik, T.J. Earley, A.C. Hergarden, D.A. Andersson, S.W. Hwang, P. McIntyre, T. Jegla, S. Bevan, and A. Patapoutian. 2003. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell*. 112:819-829.
- Suh, B.C., and B. Hille. 2008. PIP2 is a necessary cofactor for ion channel function: how and why? *Annu Rev Biophys*. 37:175-195.
- Sulak, M.A., M. Ghosh, P. Sinharoy, S.R. Andrei, and D.S. Damron. 2018. Modulation of TRPA1 channel activity by Cdk5 in sensory neurons. *Channels*. 12:65-75.
- Suo, Y., Z. Wang, L. Zubcevic, A.L. Hsu, Q. He, M.J. Borgnia, R.R. Ji, and S.Y. Lee. 2020. Structural insights into Electrophile Irritant Sensing by the human TRPA1 channel. *Neuron*. 105.
- Sura, L., V. Zima, L. Marsakova, A. Hynkova, I. Barvik, and V. Vlachova. 2012. C-terminal Acidic Cluster Is Involved in Ca²⁺-induced Regulation of Human Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Channel. *J. Biol. Chem.* 287:18067-18077.
- Susankova, K., R. Ettrich, L. Vyklicky, J. Teisinger, and V. Vlachova. 2007. Contribution of the putative inner-pore region to the gating of the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel (TRPV1). *J. Neurosci.* 27:7578-7585.
- Susankova, K., K. Tousova, L. Vyklicky, J. Teisinger, and V. Vlachova. 2006. Reducing and oxidizing agents sensitize heat-activated vanilloid receptor (TRPV1) current. *Mol. Pharmacol.* 70:383-394.
- Talavera, K., J.B. Startek, J. Alvarez-Collazo, B. Boonen, Y.A. Alpizar, A. Sanchez, R. Naert, and B. Nilius. 2020. Mammalian Transient Receptor Potential TRPA1 Channels: From Structure to Disease. *Physiol. Rev.* 100:725-803.
- Touska, F., L. Marsakova, J. Teisinger, and V. Vlachova. 2011. A "Cute" Desensitization of TRPV1. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12:122-129.
- Tousova, K., K. Susankova, J. Teisinger, L. Vyklicky, and V. Vlachova. 2004. Oxidizing reagent copper-o-phenanthroline is an open channel blocker of the vanilloid receptor TRPV1. *Neuropharmacology*. 47:273-285.
- Tousova, K., L. Vyklicky, K. Susankova, J. Benedikt, and V. Vlachova. 2005. Gadolinium activates and sensitizes the vanilloid receptor TRPV1 through the external protonation sites. *Mol. Cell. Neurosci.* 30:207-217.
- Trott, O., and A.J. Olson. 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem*. 31:455-461.
- Uchida, K., L. Demirkhanyan, S. Asuthkar, A. Cohen, M. Tominaga, and E. Zakharian. 2016. Stimulation-dependent gating of TRPM3 channel in planar lipid bilayers. *FASEB J.* 30:1306-1316.
- Vandewauw, I., K. De Clercq, M. Mulier, K. Held, S. Pinto, N. Van Ranst, A. Segal, T. Voet, R. Vennekens, K. Zimmermann, J. Vriens, and T. Voets. 2018. A TRP channel trio mediates acute noxious heat sensing. *Nature*. 555:662-666.

- Venkatachalam, K., and C. Montell. 2007. TRP channels. *Annu. Rev. Biochem.* 76:387-417.
- Vlachova, V., J. Teisinger, K. Sušánková, A. Lyfenko, R. Ettrich, and L. Vyklicky. 2003. Functional role of C-terminal cytoplasmic tail of rat vanilloid receptor 1. *J. Neurosci.* 23:1340-1350.
- Voets, T. 2012. Quantifying and Modeling the Temperature-Dependent Gating of TRP Channels. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*
- Voets, T., G. Droogmans, U. Wissenbach, A. Janssens, V. Flockerzi, and B. Nilius. 2004. The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature.* 430:748-754.
- Vriens, J., B. Nilius, and T. Voets. 2014. Peripheral thermosensation in mammals. *Nat. Rev. Neurosci.* 15:573-589.
- Vyklicka, L., S. Boukalova, L. Macikova, S. Chvojka, and V. Vlachova. 2017. The human transient receptor potential vanilloid 3 channel is sensitized via the ERK pathway. *J. Biol. Chem.* 292:21083-21091.
- Vyklicky, L., A. Lyfenko, D.P. Kuffler, and V.V. Vlachova. 2003. Vanilloid receptor TRPV1 is not activated by vanilloids applied intracellularly. *Neuroreport.* 14:1061-1065.
- Vyklicky, L., A. Lyfenko, K. Susankova, J. Teisinger, and V. Vlachova. 2002. Reducing agent dithiothreitol facilitates activity of the capsaicin receptor VR-1. *Neuroscience.* 111:435-441.
- Wang, H., and J. Siemens. 2015. TRP ion channels in thermosensation, thermoregulation and metabolism. *Temperature.* 2:178-187.
- Wang, Y.Y., R.B. Chang, H.N. Waters, D.D. McKemy, and E.R. Liman. 2008. The Nociceptor Ion Channel TRPA1 Is Potentiated and Inactivated by Permeating Calcium Ions. *J. Biol. Chem.* 283:32691-32703.
- Weil, A., S.E. Moore, N.J. Waite, A. Randall, and M.J. Gunthorpe. 2005. Conservation of functional and pharmacological properties in the distantly related temperature sensors TRPV1 and TRPM8. *Mol. Pharmacol.* 68:518-527.
- Witschas, K., M.L. Jobin, D.N. Korkut, M.M. Vladan, G. Salgado, S. Lecomte, V. Vlachova, and I.D. Alves. 2015. Interaction of a peptide derived from C-terminus of human TRPA1 channel with model membranes mimicking the inner leaflet of the plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 1848:1147-1156.
- Xiao, B., A.E. Dubin, B. Bursulaya, V. Viswanath, T.J. Jegla, and A. Patapoutian. 2008. Identification of transmembrane domain 5 as a critical molecular determinant of menthol sensitivity in mammalian TRPA1 channels. *J. Neurosci.* 28:9640-9651.
- Xu, H., N.T. Blair, and D.E. Clapham. 2005. Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism. *J. Neurosci.* 25:8924-8937.
- Xu, L., X. Liang, W. Zhen, Z. Xue, F. Zhang, X. Yi, X. Chen, L. Hu, B. Li, B. Zhang, Y. Wang, Z. Deng, W. Yang, H. Wen, T. Guo, Y. Zhu, and Y. Fan. 2022. A common mechanism of temperature-sensing in thermoTRP channels. *bioRxiv.*2022.2005.2023.493163.
- Yuan, P., M.D. Leonetti, A.R. Pico, Y. Hsiung, and R. MacKinnon. 2010. Structure of the human BK channel Ca²⁺-activation apparatus at 3.0 Å resolution. *Science.* 329:182-186.
- Zakharian, E., C. Cao, and T. Rohacs. 2010. Gating of transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) channels activated by cold and chemical agonists in planar lipid bilayers. *J. Neurosci.* 30:12526-12534.
- Zhao, J., J.V. Lin King, C.E. Paulsen, Y. Cheng, and D. Julius. 2020. Irritant-evoked activation and calcium modulation of the TRPA1 receptor. *Nature.* 585:141-145.
- Zima, V., K. Witschas, A. Hynkova, L. Zimova, I. Barvik, and V. Vlachova. 2015. Structural modeling and patch-clamp analysis of pain-related mutation TRPA1-N855S reveal inter-subunit salt bridges stabilizing the channel open state. *Neuropharmacology.* 93:294-307.

- Zimmermann, K., J.K. Lennerz, A. Hein, A.S. Link, J.S. Kaczmarek, M. Delling, S. Uysal, J.D. Pfeifer, A. Riccio, and D.E. Clapham. 2011. Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 5 (TRPC5) is a cold-transducer in the peripheral nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 108:18114-18119.
- Zimova, L., K. Barvikova, L. Macikova, L. Vyklicka, V. Sinica, I. Barvik, and V. Vlachova. 2020. Proximal C-Terminus Serves as a Signaling Hub for TRPA1 Channel Regulation via Its Interacting Molecules and Supramolecular Complexes. *Frontiers in Physiology*. 11:189.
- Zimova, L., A. Ptakova, M. Mitro, J. Krusek, and V. Vlachova. 2022. Activity dependent inhibition of TRPC1/4/5 channels by duloxetine involves voltage sensor-like domain. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 152:113262.
- Zimova, L., V. Sinica, A. Kadkova, L. Vyklicka, V. Zima, I. Barvik, and V. Vlachova. 2018. Intracellular cavity of sensor domain controls allosteric gating of TRPA1 channel. *Science Signaling*. 11.
- Zubcevic, L., M.A. Herzik, Jr., M. Wu, W.F. Borschel, M. Hirschi, A.S. Song, G.C. Lander, and S.Y. Lee. 2018. Conformational ensemble of the human TRPV3 ion channel. *Nat. Commun*. 9:4773.
- Zurborg, S., B. Yurgionas, J.A. Jira, O. Caspani, and P.A. Heppenstall. 2007. Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca²⁺. *Nat. Neurosci*. 10:277-279.

8 Použité zkratky

| | |
|------------------|--|
| AChR | acetylcholinový receptor |
| AITC | allylisothiokyanát |
| AMPA | receptor pro α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionovou kyselinu |
| AR | ankyrinová repetice (angl. ankyrin repeat) |
| ARD | doména ankyrinových repetit (angl. ankyrin repeat domain) |
| ASIC | iontový kanál aktivovaný protony (angl. acid-sensing ion channel) |
| cAMP | cyklický adenosinmonofosfát |
| Cdk5 | cyklin-dependentní kinasa 5 |
| DAG | diacylglycerol |
| NMDAR | N-metyl-D-aspartátový receptor |
| GABAAR | ionotropní receptor pro kyselinu γ -aminomáselnou |
| ECS | extracelulární roztok (angl. extracellular solution) |
| EDTA | ethylendiamintetraoctová kyselina |
| FTS | fetální telecí sérum |
| GFP | zelený fluorescenční protein (angl. green fluorescent protein) |
| HEK293T | lidské embryonální ledvinné buňky linie 293T (angl. human embryonic kidney cells) |
| hTRPA1 | lidský ortolog receptoru TRPA1 |
| IAA | jodoacetamid |
| JT010 | 2-chloro- <i>N</i> -(4-(4menthoxyphenyl)thiazol-2yl)- <i>N</i> -(3-methoxypropyl)-acetamid |
| MATra | magnetické částice využité k transfekci buněk |
| MD | molekulární dynamika |
| MDFF | metoda molekulární simulace (angl. Molecular Dynamics Flexible Fitting) |
| P1 – P2 | označení pórových helixů 1 a 2 TRPA1 |
| PBS | fosfátový pufr |
| PCR | polymerasová řetězová reakce (angl. polymerase chain reaction) |
| PDB | proteinová databáze (angl. Protein Data Bank) |
| PIP ₂ | fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát |
| PKC | proteinkinasa C |
| PLC | fosfolipasa C |
| Q ₁₀ | teplotní koeficient |
| ROS | reaktivní formy kyslíku (angl. reactive oxygen species) |
| S1 až S6 | označení transmembránových α -helixů 1 až 6 TRPA1 |
| TRP | tranzientní receptorový potenciál (angl. transient receptor potential) |
| TRPA1 | ankyrinový tranzientní receptorový potenciálový kanál, subtyp 1 |
| TRPC1-7 | kanonický tranzientní receptorový potenciálový kanál, subtyp 1-7 |
| TRP-like | strukturně analogický motiv k TRP-boxu |
| TRPM1-8 | melastatinový tranzientní receptorový potenciálový kanál, subtyp 1-8 |
| TRPML1-3 | mukolipinový tranzientní receptorový potenciálový kanál, subtyp 1-3 |
| TRPP1-3 | polycystinový tranzientní receptorový potenciálový kanál, subtyp 1-3 |
| TRPV1-6 | vaniloidní tranzientní receptorový potenciálový kanál, subtyp 1-6 |
| WT | přirozený typ (angl. wild type) |

9 Seznam vybraných publikací autorky s IF

(s vyznačením ***publikací tvořících součást habilitační práce**. Publikace jsou seřazeny inverzně chronologicky)

- *1) Ptakova, A., M. Mitro, L. Zimova, and V. Vlachova. 2022. Cellular context determines primary characteristics of human transient receptor potential canonical 5 as a cold-activated channel. *Journal of Cellular Physiology*. Doi: 10.1002/jcp.30821.
- *2) Zimova, L., A. Ptakova, M. Mitro, J. Krusek, and V. Vlachova. 2022. Activity dependent inhibition of TRPC1/4/5 channels by duloxetine involves voltage sensor-like domain. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 152:113262.
- 3) Bernal, L., P. Sotelo-Hitschfeld, C. König, V. Sinica, A. Wyatt, Z. Winter, A. Hein, F. Tóuska, S. Reinhardt, A. Tragl, R. Kusuda, P. Wartenberg, A. Sclaroff, J.D. Pfeifer, F. Ectors, A. Dahl, M. Freichel, V. Vlachova, S. Brauchi, C. Roza, U. Boehm, D.E. Clapham, J.K. Lennerz, and K. Zimmermann. 2021. Odontoblast TRPC5 channels signal cold pain in teeth. *Science Advances*. 7.
- *4) Nadezhdin, K.D., A. Neuberger, Y.A. Trofimov, N.A. Krylov, V. Sinica, N. Kupko, V. Vlachova, E. Zakharian, R.G. Efremov, and A.I. Sobolevsky. 2021. Structural mechanism of heat-induced opening of a temperature-sensitive TRP channel. *Nat Struct Mol Biol*. 28:564-572.
- 5) Sinica, V., and V. Vlachova. 2021. Transient receptor potential ankyrin 1 channel: An evolutionarily tuned thermosensor. *Physiological Research*. 70:363-381.
- 6) Barvikova, K., I. Barvik, V. Sinica, L. Zimova, and V. Vlachova. 2020. Phospho-Mimetic Mutation at Ser602 Inactivates Human TRPA1 Channel. *International Journal of Molecular Sciences*. 21.
- 7) Zimova, L., K. Barvikova, L. Macikova, L. Vyklicka, V. Sinica, I. Barvik, and V. Vlachova. 2020. Proximal C-Terminus Serves as a Signaling Hub for TRPA1 Channel Regulation via Its Interacting Molecules and Supramolecular Complexes. *Frontiers in Physiology*. 11:189.
- *8) Macikova, L., V. Sinica, A. Kadkova, S. Villette, A. Ciaccafava, J. Faherty, S. Lecomte, I.D. Alves, and V. Vlachova. 2019a. Putative interaction site for membrane phospholipids controls activation of TRPA1 channel at physiological membrane potentials. *FEBS Journal*. 286:3664-3683.
- *9) Macikova, L., L. Vyklicka, I. Barvik, A.I. Sobolevsky, and V. Vlachova. 2019b. Cytoplasmic Inter-Subunit Interface Controls Use-Dependence of Thermal Activation of TRPV3 Channel. *International Journal of Molecular Sciences*. 20, 16.
- 10) Sinica, V., L. Zimova, K. Barvikova, L. Macikova, I. Barvik, and V. Vlachova. 2019. Human and Mouse TRPA1 Are Heat and Cold Sensors Differentially Tuned by Voltage. *Cells*. 9.
- 11) Prucha, J., J. Krusek, I. Dittert, V. Sinica, A. Kadkova, and V. Vlachova. 2018. Acute exposure to high-induction electromagnetic field affects activity of model peripheral sensory neurons. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 22:1355-1362.

- 12) Touska, F., B. Turnquist, V. Vlachova, P.W. Reeh, A. Leffler, and K. Zimmermann. 2018. Heat-resistant action potentials require TTX-resistant sodium channels NaV1.8 and NaV1.9. *J Gen Physiol.* 150:1125-1144.
- *13) **Zimova, L., V. Sinica, A. Kadkova, L. Vyklicka, V. Zima, I. Barvik, and V. Vlachova. 2018. Intracellular cavity of sensor domain controls allosteric gating of TRPA1 channel. *Science Signaling.* 11, 514.**
- 14) Kadkova, A., V. Synytsya, J. Krusek, L. Zimova, and V. Vlachova. 2017. Molecular basis of TRPA1 regulation in nociceptive neurons. A review. *Physiological Research.* 66:425-439.
- *15) **Marsakova, L., I. Barvik, V. Zima, L. Zimova, and V. Vlachova. 2017. The First Extracellular Linker Is Important for Several Aspects of the Gating Mechanism of Human TRPA1 Channel. *Frontiers in Molecular Neuroscience.* 10:16.**
- *16) **Vyklicka, L., S. Boukalova, L. Macikova, S. Chvojka, and V. Vlachova. 2017. The human transient receptor potential vanilloid 3 channel is sensitized via the ERK pathway. *Journal of Biological Chemistry.* 292:21083-21091.**
- *17) **Hynkova, A., L. Marsakova, J. Vaskova, and V. Vlachova. 2016. N-terminal tetrapeptide T/SPLH motifs contribute to multimodal activation of human TRPA1 channel. *Scientific Reports.* 6:28700.**
- 18) Touska, F., Z. Winter, A. Mueller, V. Vlachova, J. Larsen, and K. Zimmermann. 2016. Comprehensive thermal preference phenotyping in mice using a novel automated circular gradient assay. *Temperature.* 3:77-91.
- 19) Witschas, K., M.L. Jobin, D.N. Korkut, M.M. Vladan, G. Salgado, S. Lecomte, V. Vlachova, and I.D. Alves. 2015. Interaction of a peptide derived from C-terminus of human TRPA1 channel with model membranes mimicking the inner leaflet of the plasma membrane. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1848:1147-1156.
- *20) **Zima, V., K. Witschas, A. Hynkova, L. Zimova, I. Barvik, and V. Vlachova. 2015. Structural modeling and patch-clamp analysis of pain-related mutation TRPA1-N855S reveal inter-subunit salt bridges stabilizing the channel open state. *Neuropharmacology.* 93:294-307.**
- 21) Boukalova, S., F. Touska, L. Marsakova, A. Hynkova, L. Sura, S. Chvojka, I. Dittert, and V. Vlachova. 2014. Gain-of-function mutations in the transient receptor potential channels TRPV1 and TRPA1: how painful? *Physiological Research.* 63 Suppl 1:S205-213.
- *22) **Boukalova, S., J. Teisinger, and V. Vlachova. 2013. Protons stabilize the closed conformation of gain-of-function mutants of the TRPV1 channel. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1833:520-528.**
- 23) Vetter, I., A. Hein, S. Sattler, S. Hessler, F. Touska, E. Bressan, A. Parra, U. Hager, A. Leffler, S. Boukalova, M. Nissen, R.J. Lewis, C. Belmonte, C. Alzheimer, T. Huth, V. Vlachova, P.W. Reeh, and K. Zimmermann. 2013. Amplified cold transduction in native nociceptors by M-channel inhibition. *J Neurosci.* 33:16627-16641.
- *24) **Marsakova, L., F. Touska, J. Krusek, and V. Vlachova. 2012. Pore Helix Domain Is Critical to Camphor Sensitivity of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Channel. *Anesthesiology.* 116:903-917.**

- *25) Sura, L., V. Zima, L. Marsakova, A. Hynkova, I. Barvik, and V. Vlachova. 2012. C-terminal Acidic Cluster Is Involved in Ca²⁺-induced Regulation of Human Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Channel. *Journal of Biological Chemistry*. 287:18067-18077.
- 26) Vetter, I., F. Touska, A. Hess, R. Hinsbey, S. Sattler, A. Lampert, M. Sergejeva, A. Sharov, L.S. Collins, M. Eberhardt, M. Engel, P.J. Cabot, J.N. Wood, V. Vlachova, P.W. Reeh, R.J. Lewis, and K. Zimmermann. 2012. Ciguatoxins activate specific cold pain pathways to elicit burning pain from cooling. *EMBO Journal*. 31:3795-3808.
- *27) Samad, A., L. Sura, J. Benedikt, R. Ettrich, B. Minofar, J. Teisinger, and V. Vlachova. 2011. The C-terminal basic residues contribute to the chemical and voltage-dependent activation of TRPA1. *Biochem J*. 433:197-204.
- 28) Touska, F., L. Marsakova, J. Teisinger, and V. Vlachova. 2011. A "Cute" Desensitization of TRPV1. *Curr Pharm Biotechnol*. 12:122-129.
- *29) Boukalova, S., L. Marsakova, J. Teisinger, and V. Vlachova. 2010. Conserved Residues within the Putative S4-S5 Region Serve Distinct Functions among Thermosensitive Vanilloid Transient Receptor Potential (TRPV) Channels. *J Biol Chem*. 285:41455-41462.
- *30) Benedikt, J., A. Samad, R. Ettrich, J. Teisinger, and V. Vlachova. 2009. Essential role for the putative S6 inner pore region in the activation gating of the human TRPA1 channel. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Research*. 1793:1279-1288.
- 31) Vyklicky, L., K. Novakova-Tousova, J. Benedikt, A. Samad, F. Touska, and V. Vlachova. 2008. Calcium-dependent desensitization of vanilloid receptor TRPV1: a mechanism possibly involved in analgesia induced by topical application of capsaicin. *Physiol Res*. 57 Suppl 3:S59-68.
- *32) Benedikt, J., J. Teisinger, L. Vyklicky, and V. Vlachova. 2007. Ethanol inhibits cold-menthol receptor TRPM8 by modulating its interaction with membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Neurochem*. 100:211-224.
- *33) Novakova-Tousova, K., L. Vyklicky, K. Susankova, J. Benedikt, A. Samad, J. Teisinger, and V. Vlachova. 2007. Functional changes in the vanilloid receptor subtype 1 channel during and after acute desensitization. *Neuroscience*. 149:144-154.
- *34) Susankova, K., R. Ettrich, L. Vyklicky, J. Teisinger, and V. Vlachova. 2007. Contribution of the putative inner-pore region to the gating of the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel (TRPV1). *J Neurosci*. 27:7578-7585.
- *35) Dittert, I., J. Benedikt, L. Vyklicky, K. Zimmermann, P.W. Reeh, and V. Vlachova. 2006. Improved superfusion technique for rapid cooling or heating of cultured cells under patch-clamp conditions. *J Neurosci Methods*. 151:178-185.
- *36) Susankova, K., K. Tousova, L. Vyklicky, J. Teisinger, and V. Vlachova. 2006. Reducing and Oxidizing Agents Sensitize Heat-Activated Vanilloid Receptor (TRPV1) Current. *Mol Pharmacol*. 70:383-394.
- *37) Tousova, K., L. Vyklicky, K. Susankova, J. Benedikt, and V. Vlachova. 2005. Gadolinium activates and sensitizes the vanilloid receptor TRPV1 through the external protonation sites. *Mol Cell Neurosci*. 30:207-217.

- 38) Krusek, J., I. Dittert, T. Hendrych, P. Hnik, M. Horak, M. Petrovic, M. Sedlacek, K. Susankova, L. Svobodova, K. Tousova, E. Ujec, V. Vlachova, L. Vyklicky, F. Vyskocil, and L. Vyklicky, Jr. 2004. Activation and modulation of ligand-gated ion channels. *Physiol Res.* 53 Suppl 1:S103-113.
- *39) **Tousova, K., K. Susankova, J. Teisinger, L. Vyklicky, and V. Vlachova. 2004. Oxidizing reagent copper-o-phenanthroline is an open channel blocker of the vanilloid receptor TRPV1. *Neuropharmacology.* 47:273-285.**
- *40) **Vlachova, V., J. Teisinger, K. Susankova, A. Lyfenko, R. Etrich, and L. Vyklicky. 2003. Functional role of C-terminal cytoplasmic tail of rat vanilloid receptor 1. *J Neurosci.* 23:1340-1350.**
- 41) Vyklicky, L., A. Lyfenko, D.P. Kuffler, and V. Vlachova. 2003. Vanilloid receptor TRPV1 is not activated by vanilloids applied intracellularly. *Neuroreport.* 14:1061-1065.
- 42) Kuffler, D.P., A. Lyfenko, L. Vyklicky, and V. Vlachova. 2002. Cellular mechanisms of nociception in the frog. *J Neurophysiol.* 88:1843-1850.
- 43) Lyfenko, A., V. Vlachova, L. Vyklicky, I. Dittert, M. Kress, and P.W. Reeh. 2002. The effects of excessive heat on heat-activated membrane currents in cultured dorsal root ganglia neurons from neonatal rat. *Pain.* 95:207-214.
- 44) Tucek, S., P. Michal, and V. Vlachova. 2002. Modelling the consequences of receptor-G-protein promiscuity. *Trends Pharmacol Sci.* 23:171-176.
- 45) Vlachova, V., A. Lyfenko, L. Vyklicky, and R.K. Orkand. 2002. Suramin affects capsaicin responses and capsaicin-noxious heat interactions in rat dorsal root ganglia neurones. *Physiol Res.* 51:193-198.
- 46) Vyklicky, L., A. Lyfenko, K. Susankova, J. Teisinger, and V. Vlachova. 2002. Reducing agent dithiothreitol facilitates activity of the capsaicin receptor VR-1. *Neuroscience.* 111:435-441.
- 47) Tucek, S., P. Michal, and V. Vlachova. 2001. Dual effects of muscarinic M2 receptors on the synthesis of cyclic AMP in CHO cells: background and model. *Life Sci.* 68:2501-2510.
- 48) Vlachova, V., A. Lyfenko, R. Orkand, and L. Vyklicky. 2001. The effects of capsaicin and acidity on currents generated by noxious heat in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol.* 533:717-728.
- 49) Abdrachmanova, G., J. Teisinger, V. Vlachová, and L. Vyklický, Jr. 2000a. Molecular and functional properties of synaptically activated NMDA receptors in neonatal motoneurons in rat spinal cord slices. *Eur J Neurosci.* 12:955-963.
- 50) Abdrachmanova, G., V. Vlachova, and L. Vyklicky. 2000b. Axotomy-induced change in the properties of (S)-alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptor channels in rat motoneurons. *Neuroscience.* 99:119-131.
- 51) Palecek, J.I., G. Abdrachmanova, V. Vlachova, and L. Vyklick, Jr. 1999. Properties of NMDA receptors in rat spinal cord motoneurons. *Eur J Neurosci.* 11:827-836.
- 52) Vlachová, V., Z. Vitásková, L. Vyklický, and R.K. Orkand. 1999. Procaine excites nociceptors in cultures from dorsal root ganglion of the rat. *Neurosci. Lett.* 263:49-52.

- 53) Vyklický, L., V. Vlachová, Z. Vitásková, I. Dittert, M. Kabát, and R.K. Orkand. 1999. Temperature coefficient of membrane currents induced by noxious heat in sensory neurones in the rat. *J Physiol (Lond)*. 517:181-192.
- 54) Dittert, I., V. Vlachová, H. Knotková, Z. Vitásková, L. Vyklický, M. Kress, and P.W. Reeh. 1998. A technique for fast application of heated solutions of different composition to cultured neurones. *J Neurosci Methods*. 82:195-201.
- 55) Vyklický, L., H. Knotková-Urbancová, Z. Vitásková, V. Vlachová, M. Kress, and P.W. Reeh. 1998. Inflammatory mediators at acidic pH activate capsaicin receptors in cultured sensory neurons from newborn rats. *J Neurophysiol*. 79:670-676.
- 56) Tureček, R., V. Vlachová, and L. Vyklický, Jr. 1997. Spontaneous openings of NMDA receptor channels in cultured rat hippocampal neurons. *Eur J Neurosci*. 9:1999-2008.
- 57) Vlachová, V., H. Zemková, and L. Vyklický, Jr. 1996. Copper modulation of NMDA responses in mouse and rat cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci*. 8:2257-2264.
- 58) Tureček, R., L. Vyklický, V. Vlachová, and L. Vyklický, Jr. 1995. G-protein modulation of glycine-resistant NMDA receptor desensitization in rat cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci*. 7:1826-1830.
- 59) Vlachová, V., and L. Vyklický. 1993. Capsaicin-induced membrane currents in cultured sensory neurons of the rat. *Physiol Res*. 42:301-311.
- 60) Vyklický, L., and V. Vlachová. 1992. Membrane currents induced by L-homocysteic acid in mouse cultured hippocampal neurons. *Neuroscience*. 48:813-819.
- 61) Vyklický, L., Jr., V. Vlachová, and J. Krůšek. 1990. The effect of external pH changes on responses to excitatory amino acids in mouse hippocampal neurones. *J Physiol (Lond)*. 430:497-517.
- 62) Zemková, H., F. Vyskočil, M. Tolar, V. Vlachová, and E. Ujec. 1989. Single K⁺ currents during differentiation of embryonic muscle cells in vitro. *Biochim Biophys Acta*. 986:146-150.
- 63) Krůšek, J., L. Vyklický, Jr., L. Vyklický, and V. Vlachová. 1988. Glutamine-induced membrane currents in cultured chick spinal cord neurons. *Neurosci Lett*. 90:333-337.
- 64) Paleček, J., R. Vejsada, P. Hník, T. Soukup, V. Vlachová, and G. Asmussen. 1988. Functional Properties of Atypical Muscle Spindles after Nerve Crush in Newborn Rats. *Mechanoreceptors*. 149-154.
- 65) Vyklický, L., V. Vlachová, J. Krůšek, and L.J. Vyklický. 1988. A new look at the relation between agonist binding and the opening of chemically regulated ion channels. *Cesk Fysiol*. 37:289-296.
- 66) Bolotina, V., J. Borecký, V. Vlachová, M. Baudyšová, and F. Vyskočil. 1987a. Voltage-dependent chloride channels with several substates in excised patches from mouse neuroblastoma cells. *Neurosci Lett*. 77:298-302.
- 67) Bolotina, V., J. Borecký, V. Vlachová, and F. Vyskočil. 1987b. High Conductance Cl⁻ Channels in Neuroblastoma-Cells Dissipate into Several Substates. *Physiologia Bohemoslovaca*. 36:522-522.

- 68) Vlachová, V., L. Vyklický, L. Vyklický, Jr., and F. Vyskočil. 1987. The action of excitatory amino acids on chick spinal cord neurones in culture. *J Physiol (Lond)*. 386:425-438.
- 69) Vyklický, L., L. Vyklický, Jr., F. Vyskočil, V. Vlachová, E. Ujec, and J. Michl. 1986. Evidence that excitatory amino acids not only activate the receptor channel complex but also lead to use-dependent block. *Brain Res*. 363:148-151.
- 70) Vyklický, L., Jr., J. Michl, V. Vlachová, L. Vyklický, and F. Vyskočil. 1985a. Ionic currents in neuroblastoma clone E-7 cells. *Neurosci Lett*. 55:197-201.
- 71) Vyklický, L., Jr., L. Vyklický, F. Vyskočil, E. Ujec, J. Michl, and V. Vlachová. 1985b. Single non-inactivating K⁺ channels in the myotubes of the chick embryo in tissue culture. *Gen Physiol Biophys*. 4:241-248.
- 72) Vyklický, L., L. Vyklický, Jr., V. Vlachová, J. Michl, and F. Vyskočil. 1985c. Cobalt ions block L-glutamate and L-aspartate-induced currents in cultured neurons from embryonic chick spinal cord. *Neurosci Lett*. 61:345-350.
- 73) Vyskočil, F., L. Vyklický, V. Vlachová, and E. Ujec. 1985. II. Miniature end-plate currents at the neuromuscular junction of the larva of the fly *Sarcophaga Bullata*. *Mol. Physiology*. 7:143-154.

10 Přílohy

Publikace jsou řazeny inverzně chronologicky

Příloha 1

Ptakova, A., M. Mitro, L. Zimova, and V. Vlachova. 2022. Cellular context determines primary characteristics of human transient receptor potential canonical 5 as a cold-activated channel. *Journal of Cellular Physiology*. Doi: 10.1002/jcp.30821.

Příloha 2

Zimova, L., A. Ptakova, M. Mitro, J. Krusek, and V. Vlachova. 2022. Activity dependent inhibition of TRPC1/4/5 channels by duloxetine involves voltage sensor-like domain. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 152:113262.

Příloha 3

Nadezhdin, K.D., A. Neuberger, Y.A. Trofimov, N.A. Krylov, V. Sinica, N. Kupko, V. Vlachova, E. Zakharian, R.G. Efremov, and A.I. Sobolevsky. 2021. Structural mechanism of heat-induced opening of a temperature-sensitive TRP channel. *Nat Struct Mol Biol*. 28:564-572.

Příloha 4

Macikova, L., V. Sinica, A. Kadkova, S. Villette, A. Ciaccafava, J. Faherty, S. Lecomte, I.D. Alves, and V. Vlachova. 2019a. Putative interaction site for membrane phospholipids controls activation of TRPA1 channel at physiological membrane potentials. *FEBS Journal*. 286:3664-3683.

Příloha 5

Macikova, L., L. Vyklicka, I. Barvik, A.I. Sobolevsky, and V. Vlachova. 2019b. Cytoplasmic Inter-Subunit Interface Controls Use-Dependence of Thermal Activation of TRPV3 Channel. *International Journal of Molecular Sciences*. 20, 16.

Příloha 6

Zimova, L., V. Sinica, A. Kadkova, L. Vyklicka, V. Zima, I. Barvik, and V. Vlachova. 2018. Intracellular cavity of sensor domain controls allosteric gating of TRPA1 channel. *Science Signaling*. 11, 514.

Příloha 7

Vyklicka, L., S. Boukalova, L. Macikova, S. Chvojka, and V. Vlachova. 2017. The human transient receptor potential vanilloid 3 channel is sensitized via the ERK pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 292:21083-21091.

Příloha 8

Marsakova, L., I. Barvik, V. Zima, L. Zimova, and V. Vlachova. 2017. The First Extracellular Linker Is Important for Several Aspects of the Gating Mechanism of Human TRPA1 Channel. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 10:16.

Příloha 9

Hynkova, A., L. Marsakova, J. Vaskova, and V. Vlachova. 2016. N-terminal tetrapeptide T/SPLH motifs contribute to multimodal activation of human TRPA1 channel. *Scientific Reports*. 6:28700.

Příloha 10

Zima, V., K. Witschas, A. Hynkova, L. Zimova, I. Barvik, and V. Vlachova. 2015. Structural modeling and patch-clamp analysis of pain-related mutation TRPA1-N855S reveal inter-subunit salt bridges stabilizing the channel open state. *Neuropharmacology*. 93:294-307.

Příloha 11

Boukalova, S., J. Teisinger, and V. Vlachova. 2013. Protons stabilize the closed conformation of gain-of-function mutants of the TRPV1 channel. *Biochimica et Biophysica Acta Mol Cell Research*. 1833:520-528.

Příloha 12

Sura, L., V. Zima, L. Marsakova, A. Hynkova, I. Barvik, and V. Vlachova. 2012. C-terminal Acidic Cluster Is Involved in Ca²⁺-induced Regulation of Human Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Channel. *Journal of Biological Chemistry*. 287:18067-18077.

Příloha 13

Marsakova, L., F. Touska, J. Krusek, and V. Vlachova. 2012. Pore Helix Domain Is Critical to Camphor Sensitivity of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Channel. *Anesthesiology*. 116:903-917.

Příloha 14

Samad, A., L. Sura, J. Benedikt, R. Ettrich, B. Minofar, J. Teisinger, and V. Vlachova. 2011. The C-terminal basic residues contribute to the chemical and voltage-dependent activation of TRPA1. *Biochem J*. 433:197-204.

Příloha 15

Boukalova, S., L. Marsakova, J. Teisinger, and V. Vlachova. 2010. Conserved Residues within the Putative S4-S5 Region Serve Distinct Functions among Thermosensitive Vanilloid Transient Receptor Potential (TRPV) Channels. *Journal of Biological Chemistry*. 285:41455-41462.

Příloha 16

Benedikt, J., A. Samad, R. Ettrich, J. Teisinger, and V. Vlachova. 2009. Essential role for the putative S6 inner pore region in the activation gating of the human TRPA1 channel. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Research*. 1793:1279-1288.

Příloha 17

Novakova-Tousova, K., L. Vyklicky, K. Susankova, J. Benedikt, A. Samad, J. Teisinger, and V. Vlachova. 2007. Functional changes in the vanilloid receptor subtype 1 channel during and after acute desensitization. *Neuroscience*. 149:144-154.

Příloha 18

Susankova, K., R. Ettrich, L. Vyklicky, J. Teisinger, and V. Vlachova. 2007. Contribution of the putative inner-pore region to the gating of the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel (TRPV1). *J Neurosci*. 27:7578-7585.

Příloha 19

Benedikt, J., J. Teisinger, L. Vyklicky, and V. Vlachova. 2007. Ethanol inhibits cold-menthol receptor TRPM8 by modulating its interaction with membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Neurochem*. 100:211-224.

Příloha 20

Dittert, I., J. Benedikt, L. Vyklicky, K. Zimmermann, P.W. Reeh, and V. Vlachova. 2006. Improved superfusion technique for rapid cooling or heating of cultured cells under patch-clamp conditions. *J Neurosci Methods*. 151:178-185.

Příloha 21

Susankova, K., K. Tousova, L. Vyklicky, J. Teisinger, and V. Vlachova. 2006. Reducing and Oxidizing Agents Sensitize Heat-Activated Vanilloid Receptor (TRPV1) Current. *Mol Pharmacol*. 70:383-394.

Příloha 22

Tousova, K., L. Vyklicky, K. Susankova, J. Benedikt, and V. Vlachova. 2005. Gadolinium activates and sensitizes the vanilloid receptor TRPV1 through the external protonation sites. *Mol Cell Neurosci*. 30:207-217.

Příloha 23

Tousova, K., K. Susankova, J. Teisinger, L. Vyklicky, and V. Vlachova. 2004. Oxidizing reagent copper-o-phenanthroline is an open channel blocker of the vanilloid receptor TRPV1. *Neuropharmacology*. 47:273-285.

Příloha 24

Vlachova, V., J. Teisinger, K. Susankova, A. Lyfenko, R. Ettrich, and L. Vyklicky. 2003. Functional role of C-terminal cytoplasmic tail of rat vanilloid receptor 1. *J Neurosci*. 23:1340-1350.