

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli.

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE



**Charakterizace kalmodulin vazebných míst  
TRP kanálů**

Characterization of calmodulin binding sites on TRP channels

Bc. Hana Janoušková

*Diplomová práce*

Vedoucí diplomové práce: Ing. Jan Teisinger CSc.

Praha 2009

Práce byla vypracována samostatně, jen s použitím citované literatury a pod vedením příslušného vedoucího diplomové práce.

V Praze 1. 4. 2009

Hana Janoušková  
*Janoušková*

## Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli Ing. Janu Teisingerovi CSc. za pomoc, ochotu, hodně cenných rad a za trpělivost v průběhu práce v laboratoři a vzniku této diplomové práce. Děkuji také Mgr. Blance Holakovské za pomoc při experimentech a zpracování výsledků.

Dále chci poděkovat především mým rodičům a mému příteli Gregovi za všestrannou pomoc a podporu při studiu.

Diplomová práce byla vypracována v letech 2006-2009 a byla podpořena granty GAAV IAA600110701, GAČR 303/07/915 a Centrem Neurověd 9205 LC554.

# Characterization of calmodulin binding sites on TRP channels

## ABSTRACT

Transient receptor potential (TRP) proteins are a diverse family of proteins with structural features typical of ion channels. Calmodulin (CaM) is known to play an important role in the regulation of TRP channels activity. We tried to find and characterize the CaM binding sites of both C-terminus of TRPV1 and N- and C- terminus of TRPM5 ion channel. According to Calmodulin Target Database TRPM5 channel contains three CaM binding sites, one on the N-terminus and two on the C-terminus. Based on this prediction we found three CaM binding sites that fit with the results predicted by the Calmodulin Target Database. TRPV1 was reported that binds CaM on C-terminus, and no classic CaM binding motif was found in this region. In this work, we studied CaM binding site of the C-terminus TRPV1 and we determine the most important amino acids for the CaM/TRPV1 interaction. The most essential residue in this interaction is the arginin 785.

## Keywords:

TRPM5, TRPV1, Calmodulin, CaM binding site, Site-directed mutagenesis, Fluorescence anizotropie

## Klíčová slova:

TRPM5, TRPV1, Kalmodulin, Kalmodulin vazebné místo, Místně specifická mutageneze, Anizotropie fluorescence

# SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<b>CaMKII</b>	kalcium/kalmodulin dependentní proteinkináza II
<b>CaM</b>	kalmodulin
<b>CIRB</b>	region vázající CaM a IP <sub>3</sub> R
<b>cGMP</b>	cyklický guanozin-3',5'-monofosfát
<b>DAG</b>	diacylglycerol
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	kyselina ethylendiamintetraoctová
<b>ER</b>	endoplazmatické retikulum
<b>FITC</b>	fluorescein izothiokyanát
<b>HIS TAG</b>	histidinová kotva
<b>IPTG</b>	izoprophyl-1-thio-β-D-galaktopyranosid
<b>IP<sub>3</sub></b>	inozitol-1,4,5-trifosfát
<b>IP<sub>3</sub>R</b>	inozitol-1,4,5-trifosfát receptor
<b>PH doména</b>	pleckstrin homology doména
<b>PIP<sub>2</sub></b>	fosfatidylinozitol-4,5-bifosfát (PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> )
<b>PIP<sub>3</sub></b>	fosfatidylinozitol-3,4,5-trifosfát (PtdIns(3,4,5)P <sub>3</sub> )
<b>PKA</b>	proteinkináza A
<b>PKC</b>	proteinkináza C
<b>PKG</b>	proteinkináza G
<b>PLC</b>	fosfolipáza C
<b>PLCβ2</b>	fosfolipáza Cβ2
<b>T1R</b>	receptor pro sladkou chuť
<b>T2R</b>	receptor pro hořkou chuť
<b>TRP kanál</b>	transient receptor potential iontový kanál
<b>TRPM5 CT</b>	transient receptor potential melastin 5 C-konec
<b>TRPM5 NT</b>	transient receptor potential melastin 5 N-konec
<b>TRPM5 WT</b>	transient receptor potential melastin 5 Wild Type
<b>TRPV1 CT</b>	transient receptor potential vanilloid 1 C- konec
<b>TRPV1 WT</b>	transient receptor potential vanilloid 1 Wild Type
<b>TRPL kanál</b>	TRP kanálu podobný protein

# OBSAH:

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	6
OBSAH .....	7
<b>1. ÚVOD A CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>9</b>
1.1. Úvod .....	9
1.2. Cíle práce .....	9
<b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED .....</b>	<b>10</b>
2.1. TRP kanály.....	10
2.2. Molekulární struktura TRP kanálů .....	11
2.3. Aktivace TRP kanálů .....	13
2.4. TRPM5 .....	14
2.4.1. Struktura proteinu TRPM5 .....	15
2.4.2. Biologická funkce a tkáňová distribuce .....	17
2.4.3. Ca <sup>2+</sup> aktivuje TRPM5 .....	18
2.4.4. PIP <sub>2</sub> jako důležitý regulátor funkce .....	19
2.4.5. Další modulace funkce TRPM5 .....	21
2.4.5.1. Modulace teplotou .....	21
2.4.5.2. Modulace napětím .....	22
2.4.5.3. Blok kyselým pH .....	22
2.5. TRPV1 .....	23
2.5.1. Struktura proteinu TRPV1 .....	23
2.5.2. Biologická funkce a tkáňová distribuce .....	25
2.5.3. Kapsaicin aktivuje TRPV1 .....	26
2.5.4. Aktivace protony a kationty .....	27
2.5.5. Aktivace teplem .....	28
2.5.6. Senzitizace a regulace TRPV1 .....	28
2.5.6.1. Fosforylace PKA .....	29
2.5.6.2. Fosforylace PKC .....	29
2.5.6.3. Fosforylace CaMKII .....	30
2.5.7. Desenzitizace .....	30
2.6. Kalmodulin reguluje funkci TRP kanálů .....	32
2.6.1. Kalmodulin vazebné motivy .....	33
<b>3. MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>35</b>
3.1. Příprava DNA konstruktů .....	35
3.1.1. PCR amplifikace .....	35
3.1.1.1. Obsah reakční směsi .....	36
3.1.1.2. Podmínky PCR .....	36
3.1.2. Restrikční štěpení .....	37
3.1.2.1. Restrikční štěpení amplifikované DNA .....	37
3.1.2.1.1. Reakční směs pro štěpení DNA konstruktu .....	37



3.1.2.2. Restrikční štěpení vektorové DNA .....	37
3.1.2.2.1. Reakční směs pro restrikční štěpení vektoru .....	38
3.1.2.2.2. Přečištění naštípaného vektoru.....	39
3.1.3. Ligace amplifikovaného fragmentu do vektoru .....	39
3.1.3.1. Ligační směs .....	39
3.1.4. Transformace DNA do buněk <i>E. Coli</i> .....	39
3.1.5. Izolace DNA .....	40
3.1.6. Měření koncentrace DNA .....	40
3.1.7. Místně specifická mutagenese .....	41
3.1.7.1. Navržení primerů pro PCR mutagenesi .....	41
3.1.7.2. Zavedení bodové mutace pomocí QuikChange .....	44
3.1.7.2.1. Obsah reakční směsi .....	45
3.1.7.2.2. Podmínky PCR mutagenese.....	45
3.1.7.3. Transformace PCR produktu.....	45
3.2. Expres a manipulace s proteiny.....	46
3.2.1. Expresní test .....	46
3.2.2. Expres a purifikace proteinů .....	46
3.2.3. Western Blot .....	47
3.2.4. Navržení peptidů pro kalmodulinové místo .....	47
3.2.5. Měření vazby CaM pomocí anizotropie fluorescence .....	48
3.3. Přístroje .....	50
<b>4. VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>51</b>
4.1. Lokalizace a charakterizace kalmodulin vazebného místa TRPV1 CT .....	51
4.1.1. Klíčová role CaM v desenzitizaci TRPV1 .....	51
4.1.2. Příprava bodových mutací CaM vazebného motivu .....	52
4.1.3. Příprava fúzních proteinů TRPV1 CT .....	53
4.1.4. Měření vazby CaM pomocí anizotropie fluorescence .....	53
4.1.5. Diskuze k práci I .....	56
4.2. Příprava mutantních konstruktů C-koncového CaM vazebného místa a vazebné studie CaM na N- a C-koncových peptidech TRPM5 .....	60
4.2.1. Vazebné studie CaM na intracelulárních N- a C-koncích TRPM5 .....	60
4.2.2. Příprava mutantních konstruktů C-koncového CaM vazebného místa ...	61
4.2.2.1. Ligace TRPM5 C-konce do vektoru .....	61
4.2.2.2. Bodové mutace pomocí nukleotid řízené mutagenese .....	62
4.2.2.3. Příprava fúzních proteinů TRPM5 .....	64
4.2.3. Vazebné studie CaM na N- a C-koncových peptidech TRPM5 .....	65
4.2.3.1. Měření vazby CaM pomocí anizotropie fluorescence .....	66
4.2.4. Diskuze k práci II .....	70
<b>5. SOUHRN .....</b>	<b>73</b>
<b>6. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY .....</b>	<b>74</b>

# **1. ÚVOD A CÍLE PRÁCE**

## **1.1. Úvod**

Tato diplomová práce byla vypracována na Fyziologickém ústavu AVČR v laboratoři proteinových struktur pod vedením Ing. Jana Teisingera CSc. Laboratoř se zabývá studiem buněčných transmembránových receptorů TRP a jejich signalizací, převážně pak jejich modulací přes důležité buněčné signální molekuly, jako je kalmodulin a fosfatidylinozitol-4,5-bifosfát.

Moje diplomová práce se zabývá dvěma typy iontových kanálů TRPM5 a TRPV1. Tyto receptory jsou podle dostupných informací modulovány kalmodulinem na svých intracelulárních koncích. Naším úkolem byla charakterizace těchto CaM vazebných domén a identifikace aminokyselin, které se podílí na interakci CaM s receptorem.

## **1.2. Cíle práce**

1. Lokalizace a charakterizace kalmodulin vazebného místa TRPV1 CT
2. Příprava mutantních konstruktů C-koncového kalmodulin vazebného místa TRPM5
3. Vazebné studie kalmodulinu na N- a C- koncových peptidech TRPM5

## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1. TRP kanály

Skupina TRP (transient receptor potential) iontových kanálů je velice rozsáhlá superrodina membránových receptorů, které jsou aktivovány množstvím podnětů přicházejících jak z vnějšího prostředí, tak z prostředí vnitřního přes řadu signálních kaskád, které jsou závislé na vlastnostech TRP kanálu a druhu podnětu.

Současné poznatky ukazují, že TRP kanály zajišťují důležité biologické funkce, jako je teplotní, mechanické, chuťové či feromonové vnímání.

Během evolučního vývoje došlo ke specializaci těchto proteinových komplexů tak, že mohou měnit svou konformaci vlivem různých chemických i fyzikálních podnětů (světlo, změny osmolarity, teplo, chlad atd.). TRP receptory můžeme nalézt již u vývojově nižších organismů, např. hlístic (*Caenorhabditis elegans*), kde slouží jako receptory škodlivých chemických látek, u kvasinek (*Saccharomyces cerevisiae*), které pomocí nich rozeznávají osmolaritu prostředí a octomilky (*Drosophila melanogaster*), jež díky nim reagují na světelné podněty (Clapham, 2003; Montell, 2005). Savci prostřednictvím TRP receptorů rozpoznávají sladké a hořké chutě, teploty v rozmezí fyziologických i patofyziologických hodnot a chemické látky, které vyvolávají bolest. Některé TRP kanály fungují jako buněčná čidla převádějící změny okolního prostředí na produkci tzv. druhých posílů především vápníku, který je nejčastějším buněčným regulátorem.

U člověka bylo dosud identifikováno 27 genů pro TRP receptory a jejich fyziologická úloha byla prokázána v souvislosti s některými onemocněními, jako jsou poruchy metabolismu hořčíku (hypomagnesémie), polycystická onemocnění ledvin, nebo mukolipidózy (poruchy odbourávání glykoproteinů a jejich hromadění ve tkáních). Některé TRP můžeme nalézt v nedráždivých buňkách, jako jsou např. keratinocyty, ledvinný epitel a prostata. V poslední době jsou vlastnosti těchto receptorů intenzivně studovány především v souvislosti s jejich specifickou expresí v nervovém systému (Clapham, 2003; Moran et al., 2004; Wang and Woolf, 2005).

## 2.2. Molekulární struktura TRP kanálů

První krok k molekulární identifikaci TRP kanálů byly studie fotoreceptorů octomilky. Na rozdíl od fotoreceptorů obratlovců, kde G-protein aktivuje cGMP fosfodiesterázu, která poté snižuje koncentraci cGMP, což vede k uzavření iontových kanálů a následné hyperpolarizaci membrány, v případě octomilky G-protein aktivuje PLC, která způsobí aktivaci membránových kanálů, což vede naopak k depolarizaci membrány (Cosens and Manning, 1969; Montell and Rubin, 1989).

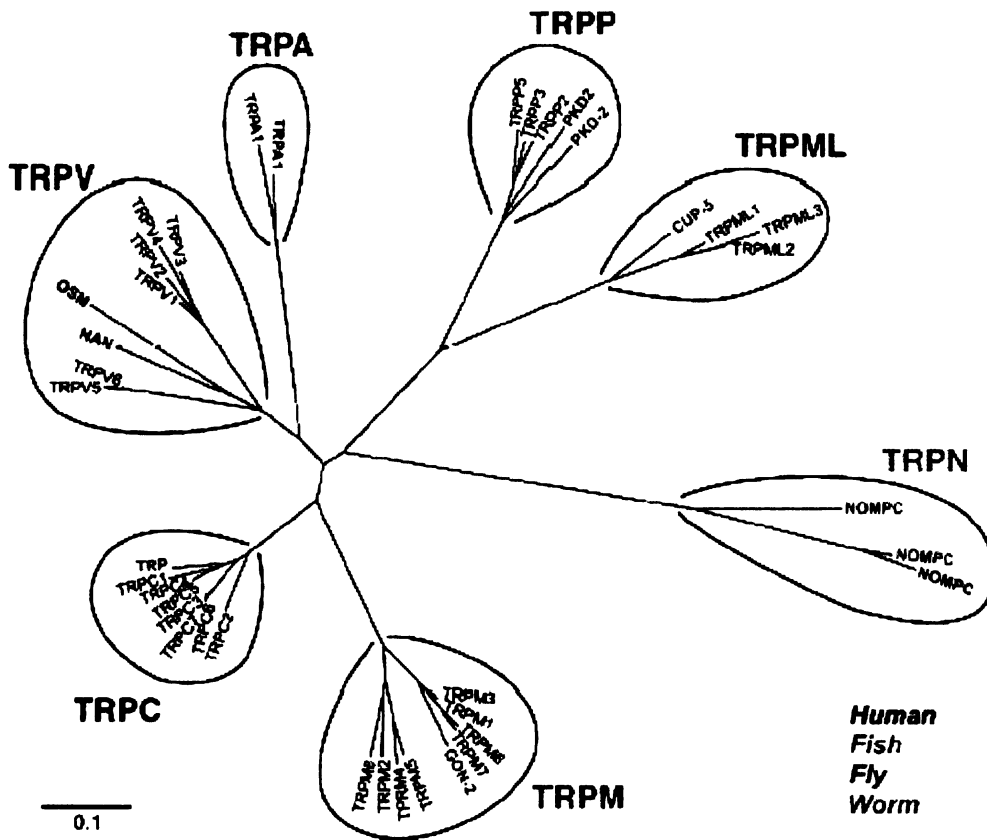
Na základě této odlišnosti, se začal jev detailněji studovat a byl objeven mutant octomilky, u něhož mutace způsobila výrazné funkční změny fotoreceptorů a vyvolání přechodné odpovědi na přetrvávající světelný podnět (odtud název-transient receptor potential) (Cosens and Manning, 1969; Montell and Rubin, 1989). *TRP* gen byl poprvé naklonován roku 1989 (Montell and Rubin, 1989). Interakční podobnosti u *trp* octomilky vyvolaly velký předpoklad, že takové signalizační komplexy mohou být nalezeny také u savců, což bylo zanedlouho potvrzeno.

I přesto, že byly objeveny teprve v nedávné době, patří TRP kanály k jedné z nejrozsáhlejších skupin iontových kanálů. Molekulární struktura monomeru je tvořena šesti transmembránovými segmenty označovanými S1-S6, jednou hydrofóbní kličkou mezi segmenty S5-S6 (tzv. P-loop) a N- a C-konci, které jsou lokalizovány intracelulárně a obsahují specifické domény (Benedikt et al., 2005).

Struktura většiny TRP kanálů je tvořena čtyřmi podjednotkami a hydrofóbními kličkami, které se podílejí na vytvoření centrálního póru iontového kanálu. Součástí póru je selektivní filtr, jenž v závislosti na typu receptoru propouští jednomocné nebo dvojmocné kationty, často kationty obou valencí. Oblast póru, podobně jako je tomu u ostatních iontových kanálů, je důležitou funkční oblastí. Tomu nasvědčuje také zjištění, že mezi konzervované oblasti patří právě část póru spolu se šestou transmembránovou doménou (Benedikt et al., 2005). To naznačuje, že tyto iontové kanály budou mít podobné principy selektivity a propustnosti. Oproti tomu hydrofilní cytosolické N- a C-konce těchto receptorů jsou nejméně konzervované a proto se předpokládá, že obsahují funkční domény, které určují specifické vlastnosti jednotlivých členů TRP rodin.

Podle současné a nejvíce uznávané nomenklatury (Montell, 2005) rozdělujeme TRP kanály na základě sekvenční homologie do dvou skupin. Do první skupiny řadíme TRPC (classical, canonical), TRPV (vanilloid), TRPM (melastin), TRPA (ankyrin), TRPN

(NOMP, první člen této rodiny). Druhá skupina obsahuje TRPP (polycystin) a TRPML (mucolipin). Každá rodina zahrnuje minimálně jednoho savčího představitele, mimo jedné výjimky, kterou je rodina TRPN (Obr. 1).



Obr. 1: Fylogenetický strom rodin TRP (Pedersen et al., 2005)

Nejnověji objevená rodina TRPA zahrnuje zatím pouze jednoho savčího člena TRPA1. Do rodiny TRPC řadíme sedm různých kanálů značených jako TRPC1-TRPC7. TRPM obsahuje osm savčích zástupců TRPM1-TRPM8. Zástupců rodiny TRPV je šest TRPV1-TRPV6. TRPN nezahrnuje savčí členy, byl identifikován pouze u *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* a *Danio rerio* NOMPC (Walker et al., 2000). TRPP rodina obsahuje tři členy TRPP2, TRPP3, TRPP5 a zástupci TRPML jsou tři savčí TRPML1-TRPML3.

U skupiny TRP kanálů se nevyužívá tradičního členění podle funkce specifických ligandů či selektivity jako u ostatních iontových kanálů. Je to především kvůli skutečnosti,

že fyziologická úloha těchto receptorů dosud není u mnohých zástupců známa a předpokládá se, že strukturní podobnost je předpokladem podobných mechanismů aktivace a modulace.

### 2.3. Aktivace TRP kanálů

TRP kanály jsou aktivovány velkým množstvím stimulů zahrnujících intra- či extra-buněčné, mechanické a chemické podněty. Bylo popsáno nejen množství aktivačních stimulů, ale také velké množství interagujících partnerů, z nichž mnoho se podílí významně na regulaci TRP kanálů. Stimuly určené pro specifické receptory a jejich dráhy velmi často produkují tzv. druhé posly, které interagují s dalšími členy signální kaskády a stimulují tak různorodé dráhy. Jsou to komplikované děje, které z velké části nejsou plně popsány.

Aktivace receptorem je zprostředkována receptorem spojeným s tzv. G-proteiny či tyrozinkinázovými receptory (trkR). Oba tyto receptory aktivují PLC, ta může poté kanál aktivovat nejméně třemi drahami. Dojde k hydrolýze membránového fosfolipidu  $PIP_2$  na rozpustný  $IP_3$  a membránově vázaný DAG.  $IP_3$  dále aktivuje receptory, které způsobí výlev vápenatého kationtu z buněčných zásob, především z endoplazmatického retikula, do cytoplazmy. Následné zvýšení koncentrace tohoto kationtu funguje jako signál pro mnoho buněčných jevů (Clapham, 1995). Mnoho otázek kolem této aktivace je zodpovězeno, ale stále chybí detailní popis u mnoha dílčích reakcí, ke kterým v této signalizační dráze dochází.

Aktivace ligandem zahrnuje velké množství široce specifikovaných látek. Aktivačním ligandem TRP kanálů mohou být exogenní malé organické molekuly (např. kapsaicin, icilin), endogenní lipidy či produkty lipidového metabolismu (např. diacylglycerol, anandamid), purinové nukleotidy a jejich metabolity (např. ADP ribóza) či anorganické ionty, jako jsou vápenaté a hořečnaté kationty (Ramsey et al., 2006).

Aktivace přímá zahrnuje stimuly jako je teplo, chlad, světlo či změny tlaku. Do tohoto druhu aktivace můžeme také zařadit posttranslační úpravy, které mohou aktivovat popřípadě inhibovat TRP kanál. Mezi takové úpravy patří přímá fosforylace pomocí kináz A, C, G (PKA, PKC, PKG) či regulace CaMKII proteinkinázou (Ramsey et al., 2006). Pro

detailní demonstraci v tomto případě chybí informace, ale tyto stimulační mechanismy se zdají vysoce pravděpodobné.

## 2.4. TRPM5

TRPM rodina iontových kanálů se na základě sekvenční homologie rozděluje do tří podrodin TRPM1/3, TRPM4/5, TRPM6/7 s TRPM2 a TRPM8 (Montell, 2005). Sdílejí zhruba 20% aminokyselinovou identitu s TRPC kanály. Selektivita iontů je u rodiny TRPM velmi různorodá. TRPM1 je nejspíše  $\text{Ca}^{2+}$  propustný kanál (Xu et al., 2001), TRPM2 je propustný především pro  $\text{Na}^+$  a  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  a  $\text{Cs}^+$  (Zhang et al., 2003). TRPM3 formuje kanál pro bivalentní ionty, převážně pro  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mn}^{2+}$  (Grimm et al., 2003; Lee et al., 2003), TRPM4 spolu s TRPM5 jsou jedinými TRP kanály, které jsou selektivní pouze pro monovalentní ionty (Launay et al., 2002; Hofmann et al., 2003). TRPM6 a TRPM7 jsou kromě  $\text{Ca}^{2+}$  vysoce propustné i pro některé stopové prvky, jako je zinek a nikl (Monteilh-Zoller et al., 2003), TRPM8 je propustný pro  $\text{Ca}^{2+}$  (McKemy et al., 2002).

TRPM5 je v poslední době intenzivně studovaným iontovým kanálem rodiny TRPM. Podle nejnovějších informací je TRPM5 důležitý pro vnímání hořké, sladké a umami (masové) chuti (Zhang et al., 2003). Signalizace již byla mnoha autory diskutována, ale dílčí mechanismy regulace aktivity a desenzitizace jsou zajímavou a však prozatím nevyřešenou otázkou.

TRPM5 je strukturně nejbliže vápníkem aktivovanému TRPM4 kanálu (40 % identita v aminokyselinovém složení) a o něco více je vzdálen od chladem aktivovaného kanálu TRPM8 (McKemy et al., 2002, Peier et al., 2002). TRPM5 je aktivován mikromolárními koncentracemi  $\text{Ca}^{2+}$  a je propustný pro monovalentní kationty ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ) (Hofmann et al., 2003; Liu and Liman, 2003; Prawitt et al., 2003). Aktivita kanálu je regulována vápenatými kationty, fosfoinozitidy, teplotou, elektrickým napětím a je inhibována kyselým pH (Liman, 2007).

### 2.4.1. Struktura proteinu TRPM5

TRPM5 byl prvně identifikován při snaze nalézt gen, který je spjat s Beckwith-Wiedemann syndromem (BWS) (Prawitt et al., 2000). Ačkoliv nebyla potvrzena souvislost mezi TRPM5 a tímto onemocněním, byla zjištěna genová lokalizace tohoto proteinu. Gen TRPM5 zahrnuje 24 exonů a je lokalizován na chromozomu 11, zatímco ortolog myšského genu je lokalizován na distálním konci chromozomu 7 (Prawitt et al., 2003, Enklaar et al., 2000).

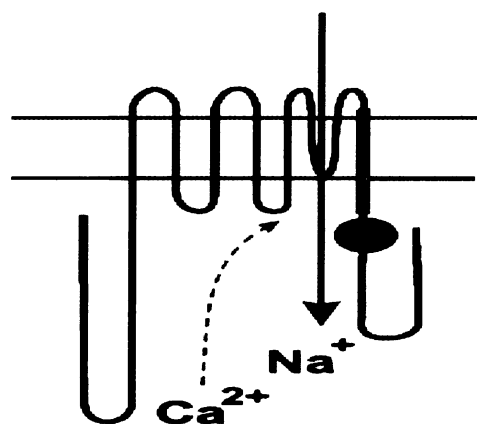
Stejně jako molekulární struktura ostatních TRP kanálů, je TRPM5 tvořen šesti transmembránovými segmenty a krátkou hydrofóbní kličkou mezi segmenty S5-S6. C- a N- konce jsou uloženy intracelulárně a jsou místem výskytu regulačních domén (Obr. 2A).

I přesto, že struktura není dostatečně prostudována, předpokládá se, že na intracelulárních koncích TRPM5 je lokalizována TRP doména, která obsahuje 25 aminokyselin, z nichž šest se označuje jako TRP box (Glu-Trp-Lys-Phe-Ala-Arg). Tento motiv byl předpokládaným znakem všech TRP kanálů, ale dnes bylo již doloženo, že několik rodin TRP tuto doménu vůbec neobsahuje (TRPP, TRPML, TRPA) (Clapham, 2003). Funkční role TRP boxu není známa, a však předpokládá se, že tento motiv se podílí na interakcích kanálů s  $PIP_2$ .

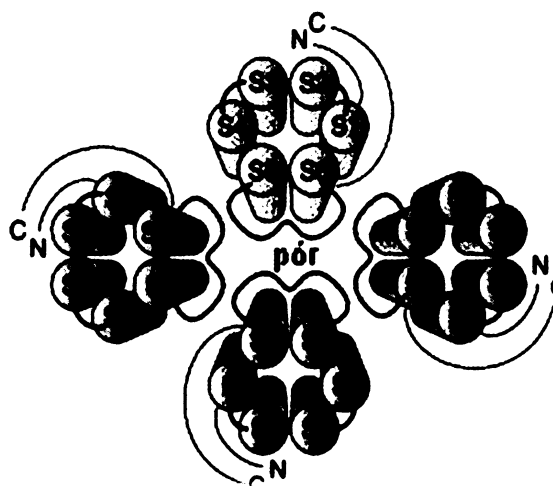
Dalším předpokládaným motivem je kalmodulin vazebná doména (stejně jako TRP box zřejmě lokalizovaná na C- i N-konci), která se nejspíše podílí na regulaci TRPM5 prostřednictvím vápníku (Hofmann et al., 2003; Nilius et al., 2004; Pedersen et al., 2005).

Struktura celého kanálu je tvořena čtyřmi podjednotkami a hydrofóbními kličkami, které vytváří centrální pór (Obr. 2B). Otázkou zůstává zda TRPM5 vytváří homotetramery, nebo se na stavbě kanálu podílejí i jiné druhy iontových kanálů (Zhang et al., 2003). Znalost členů multimerizace hraje významnou roli v porozumění mechanismů týkajících se signálních kaskád aktivace a desenzitizace těchto, jak se zdá, velmi důležitých receptorů.





A.



B.

Obr. 2: A - Molekulární struktura monomeru TRPM5 tvořená šesti transmembránovými doménami a hydrofóbní kličkou mezi pátým a šestým segmentem (S5-S6)

B - Předpokládaná struktura TRPM5 kanálu skládající se ze čtyř podjednotek a hydrofóbních kliček vytvářejících centrální pór

(upraveno podle Li et al., 2002)

## 2.4.2. Biologická funkce a tkáňová distribuce

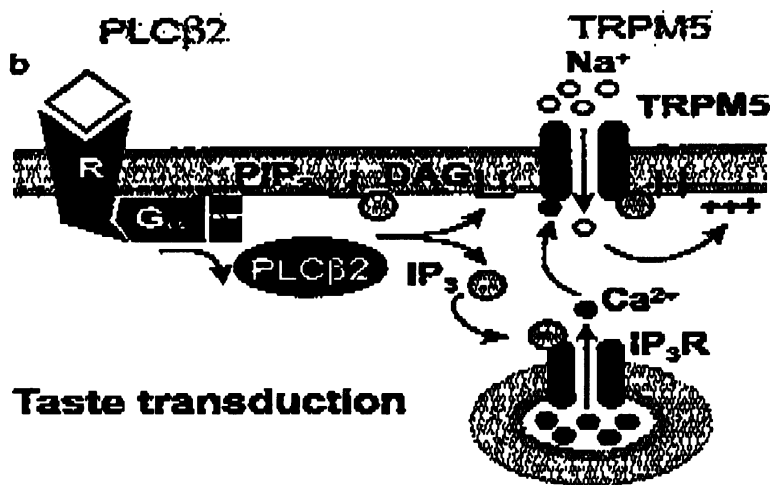
TRPM5 se podle nejnovějších studií podílí na přenosu signálu z chuťových buněk (Zhang et al., 2003). Exprese byla prokázána u chuťových buněk typu II, spolu s T1R a T2R, gustducinem (G-protein) a PLC $\beta$ 2 (Perez et al., 2002). Nedávno byl také identifikován v žaludku, střevech, děloze, varlatech a do budoucna bude jistě objeven i v dalších orgánech (Fonfria et al., 2006; Bezençon et al., 2007).

Zhang et al. roku 2003 prokázali, že delece genu pro TRPM5 způsobuje u myši malou či vůbec žádnou schopnost rozpoznat sladké či hořké látky a myši s nefunkčním genem pro PLC $\beta$ 2 plně ztrácí schopnost rozpoznání sladké, hořké a umami chuti. Tyto závěry spolu s výsledky specifické exprese v chuťových buňkách napovídají, že TRPM5 se podílí na vnímání sladké, hořké a umami chuti a PLC $\beta$ 2 nejspíše signalizuje kaskádu, která vede k aktivaci kanálu TRPM5.

A jak PLC reguluje aktivitu TRPM5? Ačkoliv jedna studie uvádí, že aktivace krysích TRPM5 je nezávislá na zvýšení intracelulárního IP $_3$  a Ca $^{2+}$  (Zhang et al., 2003), jiné práce se shodují, že myši TRPM5 může být přímo aktivován intracelulárním Ca $^{2+}$  a modifikován IP $_3$  (Hofmann et al., 2003; Liu and Liman, 2003; Prawitt et al., 2003).

Liu a Liman roku 2003 vytvořili model transdukce chuti závislé na TRPM5. Specifický substrát aktivuje receptor, který způsobí disociaci trimerického G-proteinu.  $\beta\gamma$ -podjednotka G-proteinu aktivuje PLC $\beta$ 2, která hydrolyzuje PIP $_2$  na DAG a IP $_3$ . IP $_3$  následně aktivuje IP $_3$ R na ER, což způsobí uvolnění vápenatých iontů z buněčných zásob do cytoplazmy. Zvýšení intracelulární koncentrace vápníku otevírá TRPM5 kanál, což vede k vtoku Na $^{2+}$  kationtů do buňky a následné depolarizaci buňky (Obr. 3).

Damann a jeho spolupracovníci (2008) vytvořili předpokládaný model role TRPM5 a jeho působení na nervový systém při procesech vnímání chuti. Receptory pro sladkou a hořkou chuť aktivují PLC signální dráhu a jak bylo výše popsáno, ta stimuluje TRPM5. Otevření TRPM5 kanálu vede k depolarizaci a aktivaci napětově modulovaných Na $^{2+}$  kanálů a dále ke vzniku akčního potenciálu. Z receptorové buňky vlivem depolarizačních změn dochází k výlevu ATP, čímž jsou aktivovány ionotropní purinergní receptory na sousední presynaptické buňce. Na presynaptické buňce dochází k aktivaci Ca $^{2+}$  napětově modulovaných kanálů a k Ca $^{2+}$  závislé exocytóze vezikul obsahujících serotonin. V důsledku výlevu serotoninu z presynaptické buňky a ATP z buňky receptorové jsou depolarizována aferentní senzoričká vlákna.



Obr. 3: Model transdukce chuti závislé na TRPM5 (Liman, 2007)

Tato tématika je v dnešní době intenzivně studována a je otázkou času, kdy budou plně porozuměny regulační a interakční podrobnosti této signalizace a hlavně detailní vysvětlení mechanismu, kterým tato signalizační dráha spouští elektrickou odpověď a změny v neurotransmiteru.

### 2.4.3. Ca<sup>2+</sup> aktivuje TRPM5

Podle již výše doložených výsledků jsou TRPM5 kanály aktivovány přes PLC signální dráhu, která zvyšuje intracelulární koncentraci Ca<sup>2+</sup> v buňce. Kationty Ca<sup>2+</sup> přímo či přes jiné molekuly schopné vázat Ca<sup>2+</sup>, z nichž nejznámější je CaM, interagují s kanály, což způsobí jejich aktivaci.

Hofmann et al. (2003) a Liu and Liman (2003) publikovali, že aktivace TRPM5 je zrušena, když je množství intracelulárního Ca<sup>2+</sup> silně pufováno nebo za situace, kdy IP<sub>3</sub>R

ER jsou inhibovány heparinem. Zhang et al. (2007) prokázal, že zvýšení  $IP_3$  aktivuje výlev  $Ca^{2+}$  kationtů a dochází k aktivaci TRPM5.

TRPM5 a jemu blízký TRPM4 jsou jedinými TRP kanály, které jsou přímo aktivovány zvýšenou koncentrací intracelulárního  $Ca^{2+}$ , ale jsou pro  $Ca^{2+}$  kationty nepropustné. TRPM5 je vysoce senzitivní k  $Ca^{2+}$  a je aktivován mikromolárními koncentracemi (0,3-1  $\mu$ M) tohoto kationtu, na rozdíl od TRPM4, jenž vykazuje senzitivitu daleko nižší. Delší vystavení zvýšené koncentraci  $Ca^{2+}$  vede k desenzitizaci TRPM5, což může být způsobeno ztrátou signální molekuly (Hofmann et al., 2003; Liu and Liman, 2003; Prawitt et al., 2003).

Hofmann a jeho spolupracovníci (2003) se snažili nalézt alespoň náznak aktivace CaM u TRPM5. Přidání CaM inhibitoru kalmidazolu mělo však pouze minoritní efekt na TRPM5 a zvýšené koncentrace  $Ba^{2+}$ , což je aktivátor kalmodulinu, neprokázaly žádné změny v aktivitě TRPM5. Tyto studie sice nepotvrdily souvislost mezi kalmodulinem a aktivací TRPM5, přesto mnoho vědců předpokládá, že tato aktivace je možná a co více tento předpoklad je potvrzen i výsledky z Calmodulin Target Database.

#### **2.4.4. $PIP_2$ jako důležitý regulátor funkce**

Bylo objeveno sedm TRP kanálů, které jsou  $PIP_2$  aktivovány či inhibovány. *Drosophila* TRPL (Estacion et al., 2001) a TRPV1 (Chuang et al., 2001) byly publikovány jako kanály, které jsou  $PIP_2$  inhibovány, kdežto TRPV5 (Lee et al., 2005), TRPM4 (Zhang et al., 2005; Nilius et al., 2006), TRPM5 (Liu and Liman, 2003), TRPM7 (Runnels et al., 2002; Gwanyanya et al., 2006), TRPM8 (Liu and Qin, 2005; Rohacs et al., 2005) jsou  $PIP_2$  aktivovány. Je velká pravděpodobnost, že i ostatní zástupci TRP kanálů se vyznačují touto regulační shodou a do budoucna by právě tato shoda mohla položit základní společný znak všech těchto specifických kanálů.

Studie iontových kanálů, kde  $PIP_2$  regulace je velmi častá, ukázaly, že  $PIP_2$  může interagovat s cílovým kanálem dvěma způsoby. Předpokládá se, že specifita interakcí je shodná i u TRP kanálů, avšak v této oblasti je stále velké množství nezodpovězených otázek. Interakce může být zprostředkována spojením negativně nabitě části  $PIP_2$  a krátkého segmentu proteinu s pozitivně nabitými zbytky (McLaughlin and Murray, 2005). Dalším způsobem je interakce závislá na terciální struktuře, kdy  $PIP_2$  se váže

v různých částech proteinu, které formují vazebné místo pro PIP<sub>2</sub>. Prototypem těchto interakcí jsou tzv. PH domény (pleckstrin homology domain), které váží s různou specifitou metabolitu PIP<sub>2</sub> (např. PH doména PLC má vysokou afinitu k PtdIns (4,5)P<sub>2</sub>; PH doména BTK (Bruton's tyrosine kinase) interaguje přednostně s PtdIns (3,4,5)P<sub>3</sub>) (Ferguson et al., 1995; Varnai et al., 1999).

Předpokládaným vazebným motivem pro PIP<sub>2</sub> je TRP box, i když v dnešní době se zdá být pouze částí vazebného místa pro PIP<sub>2</sub>. Mutace v konzervovaných kladně nabitých aminokyselinových zbytcích obsažených v TRP boxu (K 995, R 998, R 1008) TRPM8 způsobily snížení senzitivity kanálu k PIP<sub>2</sub> a došlo ke zvýšení kanálové inhibice prostřednictvím PIP<sub>2</sub>. Stejně výsledky byly získány z analogických mutací u TRP domén TRPM5 (R1006) a TRPV5 (R 599) (Rohacs et al., 2005). Z toho můžeme usuzovat, že pozitivně nabitě zbytky v TRP boxu jsou důležité pro interakci a regulaci prostřednictvím PIP<sub>2</sub>.

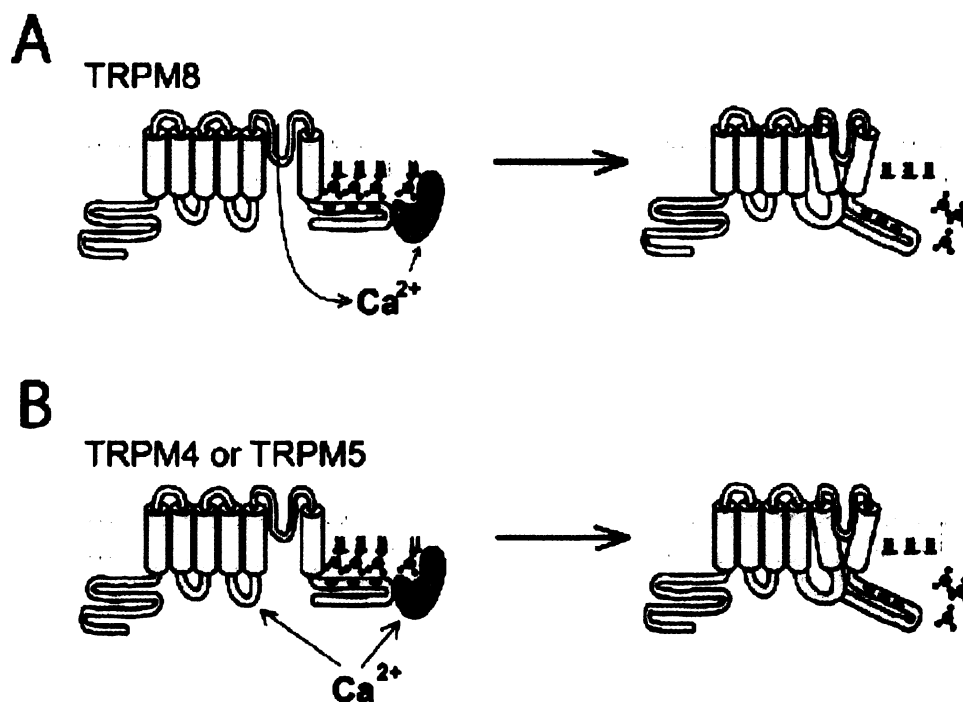
PIP<sub>2</sub> regulace je prozatím nejvíce objasněna mezi členy rodiny TRPM kanálů, i když i zde je množství neobjasněných a rozporuplných výsledků. Bylo prokázáno, že PIP<sub>2</sub> aktivuje 4 z 8 členů savčích TRPM, TRPM7 (Runnels et al., 2002), TRPM5 (Liu and Liman, 2003), TRPM8 (Liu and Qin, 2005; Rohacs et al., 2005) a TRPM4 (Zhang et al., 2005; Nilius et al., 2006). Je velmi pravděpodobné, že PIP<sub>2</sub> hraje stejnou roli i u ostatních čtyř TRPM kanálů, ale prozatím nebylo nic takového publikováno. Předpokládaný efekt PIP<sub>2</sub> na TRP kanály je nejlépe popsán u TRPM8 (Rohacs et al., 2005), TRPM4 (Zhang et al., 2005; Nilius et al., 2006) a TRPM5 (Liu and Liman, 2003).

TRPM8 je kanál propustný pro Ca<sup>2+</sup>. V okamžiku, kdy je aktivován chladem či chlad vyvolávajícími látkami, Ca<sup>2+</sup> proudí přes membránu skrz kanál do buňky. Zvýšená koncentrace cytoplazmatického Ca<sup>2+</sup> aktivuje Ca<sup>2+</sup> senzitivní izoformu PLC, která štěpí PIP<sub>2</sub>, což způsobí uzavření kanálu.

V případě TRPM4 a TRPM5 je mechanismus podobný s tím rozdílem, že tyto kanály nejsou propustné pro Ca<sup>2+</sup>, ale jsou regulovány zvýšenou hladinou cytosolického Ca<sup>2+</sup>. V tomto případě Ca<sup>2+</sup> aktivace PLC a následné štěpení PIP<sub>2</sub> vede ke snížení kanálové aktivity (Obr. 4). Potvrzení tohoto schématu podávají i výsledky, kdy zvýšení koncentrace Ca<sup>2+</sup> či delší vystavení Ca<sup>2+</sup> vede k redukci TRPM5 proudu, a kdy desenzitizace TRPM5 je částečně vratná PIP<sub>2</sub> (Zhang et al., 2007).

Jak PIP<sub>2</sub> interaguje s TRPM kanály? Pozitivně nabitě zbytky v cytoplazmatické oblasti kanálů jsou trvale zapojené v interakcích s PIP<sub>2</sub>. TRP doména je nejvíce konzervovaná mezi TRPC, TRPV a TRPM rodinami. Názor, že by tento region mohl být

PIP<sub>2</sub> interagující doménou diskutoval poprvé Clapham (2003), který zpochybňoval, že 2-3 pozitivně nabitě zbytky jsou dostatečné pro interakci s PIP<sub>2</sub>. Je zřejmé, že tento region je z části zahrnut do interakce, ale zdá se, že je pouze součástí většího PIP<sub>2</sub> interagujícího místa. Mutační analýzy ukazují, že změny pozitivně nabitých zbytků v tomto regionu mění schopnost aktivovat TRPM8 (Rohacs et al., 2005) a však mutace zbytků umístěných mimo TRP-box měly na aktivaci TRPM8 větší efekt (Bandell et al., 2006).



Obr. 4: Role Ca<sup>2+</sup> v desenzitizaci TRPM kanálů (Rohacs, 2007)

Je zřejmé, že PIP<sub>2</sub> je důležitý regulátor nejen TRPM5, ale i ostatních TRP kanálů a možná také společný pro všechny z nich. Otázkou však stále zůstává mechanismus aktivace a které aminokyselinové zbytky se na interakcích podílejí.

## 2.4.5. Další modulační funkce TRPM5

### 2.4.5.1. Modulační funkce teplotou

Už ze vzájemné strukturní blízkosti TRPM5 kanálu s chladem aktivujícím kanálem TRPM8 a o něco více vzdálenými teplem aktivovanými TRPV kanály, je možné uvažovat

o teplotní modulaci, která by nějak ovlivňovala aktivitu TRPM5. Talavera et al. (2005) opravdu dokázali, že vyšší teploty (15-35°C) podporují aktivaci TRPM5. Nicméně samotné teplo není dostatečné pro aktivaci TRPM5. Nilius et al (2005) a Talavera et al (2005) dokonce popsali vzájemnou závislost napětí a teploty, které mají prokazatelný efekt na TRPV1, M5 a M8, kdy zvýšená teplota posouvá napětím ovládanou aktivaci k negativnímu napětí pro TRPV1 a TRPM5 a k pozitivnímu napětí u TRPM8. Na základě těchto výsledků je TRPM5 považován za kanál, který je možné modulovat teplotou, i když přesné mechanismy tohoto fenoménu nejsou plně známy.

#### **2.4.5.2. Modulace napětím**

Aktivace napětím byla objevena u TRPM8, TRPM4 i TRPM5 a možná je to společná vlastnost členů celé rodiny TRPM (Hofmann et al., 2003; Nilius et al. 2003; Rohacs et al., 2005). Proč by TRPM5 kanály, které hrají roli v transdukcí signálu měly být napětím ovládané? Odpověď není v této době úplně zřejmá, i když existuje hypotéza, že závislost na napětí umožňuje lehčí modulaci otevírání těchto kanálů (Nilius et al., 2005). Je možné, že jako napěťový sensor může fungovat čtvrtá transmembránová doména, která obsahuje několik nabitých aminokyselinových zbytků (Nilius et al. 2005).

#### **2.4.5.3. Blok kyselým pH**

Jediným publikovaným specifickým blokátorem TRPM5 je kyselé pH. Liu et al. (2005) prokázali, že TRPM5 je sensitivní na pH nižší 7 a je kompletně blokován při pH 5,9. Naopak TRPM4 nevykazuje změny ani při pH 5,4. Na základě této informace, bylo provedeno srovnání identity aminokyselinových zbytků TRPM5 a TRPM4 za účelem nalezení zbytků, které jsou zodpovědné za specifický blok způsobený kyselým pH. Byly nalezeny tři zbytky, jejichž mutace prokázala roli v senzitivitě kanálu k pH. Glu (E830N) zbytek v S3-S4 klíče a His (H934N) zbytek v regionu póru jsou zodpovědné za blok receptoru kyselým pH a zbytek His (896N) v oblasti póru hraje roli při obnovení aktivity kanálu. TRPM5 je považován za kanál modulovaný kyselým pH, ačkoliv jedna studie nenalezla souvislost mezi pH a sladkou chutí v lidském vnímání (Schiffman et al., 2000).

Je možné, že TRPM5 sám o sobě není pH senzitivní, ale vytváří multimerní kanál s jinými pH senzitivními proteiny.

## 2.5. TRPV1

Vaniloidní receptory TRPV patří zatím k nejlépe prostudovaným TRP kanálům. Intenzivní zájem o tyto receptory je dán především skutečností, že některé z nich jsou specificky exprimovány na primárních sensorických neuronech s nociceptivní charakteristikou a jejich znalost by mohla mít význam při hledání možností ovlivnění bolestivých stavů. Vaniloidní receptory byly pojmenovány podle specifického ligandu prvního identifikovaného savčího člena této rodiny TRPV1, vaniloidní látky kapsaicinu, účinné složky pálivých paprik.

Rodina TRPV zahrnuje šest savčích zástupců TRPV1-TRPV6. Na základě struktury a funkce se savčí TRPV rozděluje do čtyř podrodin TRPV1-TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPV5-6 (Montell, 2005). Obecně můžeme říci, že TRPV1-4 jsou mírně propustné pro  $\text{Ca}^{2+}$ . TRPV5 a TRPV6 jsou jediné vysoce propustné pro  $\text{Ca}^{2+}$  a také regulované koncentrací tohoto kationtu. TRPV1-4, které mají funkci chemoreceptorů, jsou neselektivní termosenzitivní (jsou aktivovány teplem, jehož hodnota se od zástupců skupiny liší) iontové kanály.

Molekulární identifikace vaniloidního (kapsaicinového) receptoru TRPV1, který se vyskytuje převážně na primárních nociceptivních neuronech, se stala v roce 1997 jedním z nejvýznamnějších biomedicinských objevů (Caterina et al., 1997).

### 2.5.1. Struktura proteinu TRPV1

TRPV1 obsahuje 838 aminokyselin a jeho molekulová hmotnost odpovídá 95 kDa. Monomer TRPV1, stejně jako celá rodina TRP kanálů, obsahuje šest transmembránových domén s krátkým regionem tvořící selektivní pór mezi pátou a šestou doménou a dva N- a C- konce intracelulárně lokalizované.

TRPV1 obsahuje 400 aminokyselin dlouhý N-konec lokalizovaný intracelulárně a obsahující prolin bohaté oblasti a šest ankyrinových domén (Jin et al., 2006; McCleverty et

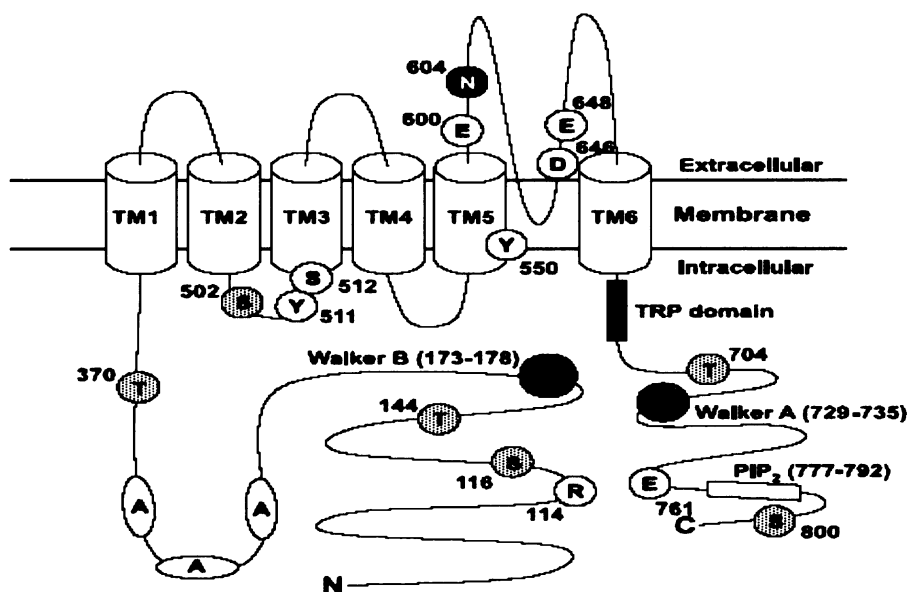


al. 2006), které jsou z funkčního hlediska esenciální (Jung et al., 2002; Hellwig et al., 2005). Ankyrinové repetice jsou konzervované sekvence asi 33 aminokyselin obsahující dva páry antiparalelních  $\alpha$ -helixů spojené  $\beta$ -vlásečkovým motivem (Sedwick and Smerdon; 1999). Tyto repetice jsou zahrnuty ve specifických interakcích protein-protein (Denker and Barber, 2002) a předpokládá se, že se podílejí na uspořádání kvarterní struktury a regulaci funkce receptoru (Engelke et al., 2002). Oblast ankyrinových domén u TRPV1 kanálu má schopnost vázat kalmodulin a zároveň je i vazebným místem pro ATP (Lishko et al., 2007). N-konec dále obsahuje ATP vazebnou doménu označovanou jako Walker B (173-178) (Pingle et al., 2007).

Kratší C-konec, jenž je tvořen 154 aminokyselinami, je stejně jako N-konec intracelulárně umístěný a obsahuje TRP doménu v blízkosti šesté transmembránové domény, která má funkci asociační domény receptorových podjednotek (Garcia-Sanz et al., 2004), dále obsahuje ATP vazebnou doménu Walker A (729-735) (Kwak et al., 2000; Numazaki et al., 2003), PIP<sub>2</sub> vazebnou doménu a vazebné místo pro kalmodulin (Numazaki et al., 2003).

Vaniloidní vazebná místa na receptoru jsou Arg 114 (R114), Tyr 511 (Y511), Ser 512 (S512), Tyr 550 (Y550), Glu 761 (E761). Aminokyselinové zbytky zahrnuté v aktivaci pomocí protonů jsou Glu 648 (E648), Glu 600 (E600). Glu 600 (E600), Asp 646 (D646) a Glu 648 (E648) byly identifikovány jako zbytky zajišťující kationty zprostředkovanou senzitivací a aktivací TRPV1. Zbytek, jenž je N-glykosylován, je Asn 604 (N604). TRPV1 je dále regulován i fosforylací na svých serinech a treoninech pomocí PKA, PKC a CaMKII. Do PKA zprostředkované fosforylace jsou zahrnuty aminokyselinové zbytky Ser 116 (S116), Thr 144 (T144), Thr 370 (T370), Ser 502 (S502). PKC fosforyluje zbytky Ser 502 (S502), Ser 800 (S800) a CaMKII fosforyluje Ser 502 (S502), Thr 704 (T704) (Pingle et al., 2007) (Obr. 5).

Jako funkční kanál se nachází TRPV1 v tetramerické formě v homo- či heteromerech. Byly objeveny heteromerické formy TRPV1 s TRPV2 (Liapi and Wood, 2005) či heteromery TRPV1 s TRPV3 (Smith et al., 2002). Regulace těchto kanálů je zajištěna i na úrovni posttranslačních modifikací a existencí alternativního sestřihu. TRPV1 se vyskytuje ve dvou formách TRPV1 $\alpha$  s 839 aminokyselinami TRV1 $\beta$  obsahující 829 aminokyselin, tyto formy jsou dalšími regulujícími faktory funkce TRPV1 (Wang et al., 2004).



Obr. 5: Struktura TRPV1 monomeru s regulačními doménami a s aminokyselinami podílejícími se na regulaci funkce TRPV1 (Pingle et al., 2007)

## 2.5.2. Biologická funkce a tkáňová distribuce

TRPV1 je neselektivní kationtový kanál propustný pro  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Cs}^+$  a  $\text{Rb}^+$  kationty (Caterina et al., 1997), řídí však selektivitu pro divalentní kationty, především pro  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$  (Caterina et al., 1997; Ahern et al., 2005). Je propustný i pro protony a velké polyvalentní kationty. Na selektivitě se podílí region mezi pátou a šestou transmembránovou doménou, ale přesná lokalizace a jaké aminokyseliny jsou rozhodující není plně objasněno. Bylo prokázáno, že mutace Glu 648 (E648A) snižuje propustnost pro  $\text{Mg}^{2+}$  kationty a zvyšuje propustnost pro  $\text{Ca}^{2+}$  kationty a mutace Asp 646 (D646N) redukuje propustnost pro  $\text{Mg}^{2+}$  (Garcia-Martinez et al., 2000; Tominaga and Tominaga, 2005).

TRPV1 je pro svou schopnost sledovat vnitřní a vnější podněty označován jako molekulární integrátor chemických a fyzikálních podnětů. Vyskytuje se převážně na primárních nociceptivních neuronech a je charakteristický tím, že je aktivován podněty, které člověk vnímá jako bolestivé. Může být tedy aktivován mediátory zánětu (bradykin, histamin, prostaglandin E2), sníženým pH, zvýšenou teplotou nad  $43^\circ\text{C}$  (Caterina et al.,

1997), vaniloidy, mezi které můžeme zařadit aktivní složku pálivých paprik kapsaicin, kafr (Xu et al., 2005), složku v česneku allicin (Macpherson et al., 2005). Aktivátory mohou být i endogenní látky, jako je například anandamid (Zygmunt et al., 1999; Ross, 2003). Po aktivaci kanálu dochází k vtoku kationtů do buňky a k následné depolarizaci membrány a tím je přenesena informace o bolestivém podnětu do centrální nervové soustavy.

Při zánětu a anoxii může být nadměrná aktivace TRPV1 příčinou zvýšené citlivosti k bolestivým podnětům (Cesare et al., 1999). Důkazem toho jsou knock-out studie na myších, u nichž se ztratila tepelná hyperalgezie, zvýšená citlivost k tepelným podnětům během zánětu (Caterina et al., 2000; Davis et al., 2000).

TRPV1 byl popsán u neuronů ganglií zadních kořenů míšních, neuronů trigeminálních a nodózních ganglií (Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998). TRPV1 distribuce však není omezena pouze na nervovou tkáň. Byl identifikován na žírných i gliomových buňkách, na buňkách lidských průdušek, lidských lymfocytech (Szallasi et al., 1999), keratinocytech (Inoue et al., 2002). Svou funkci vykonává i v gastrointestinálním traktu, v mozku (Dawbarn et al., 1981), v uchu (Vass et al., 1995), respiračním traktu (Jia et al., 2005) atd.

### **2.5.3. Kapsaicin aktivuje TRPV1**

Kapsaicin, účinná složka pálivých paprik, vyvolává u člověka pocit bolesti pomocí aktivace kanálu TRPV1. Vtok kationtů do nitra buňky a následná depolarizace membrány má za důsledek vznik akčního potenciálu, kterým je informace o bolestivém podnětu přenesena do centrální nervové soustavy (Szallasi et al., 1999).

Kapsaicin a jeho exogenní analogové, z nichž je nejznámější reziniferatoxin (RTX), který s kapsaicinem sdílí chemickou skupinu homovanilyl (3-methoxy-4-hydroxybenzyl), jsou lipofilní látky a mohou tedy přecházet přes buněčnou membránu. Na základě této vlastnosti se předpokládá, že vazebné místo na TRPV1 je lokalizováno na intracelulární části. Tato domněnka byla potvrzena při aplikaci nabitého analogu kapsaicinu, který byl pro TRPV1 aktivující pouze po injikaci do buňky (Jung et al., 2002). Dalším důkazem jsou i metody bodové mutace, i když v nedávné době byly publikovány práce, které ukazují, že pro aktivaci kanálu je nezbytný kontakt i z extracelulární strany receptoru (Vyklícký et al., 2003; Gilbert et al., 2007).

Bylo objeveno několik aminokyselinových zbytků, které hrají roli při vazbě ligandu na TRPV1. Arg 114 na N-konci a Glu 761 na C-konci (Jung et al., 2002), dále Ser 512 a Tyr 511, jenž jsou lokalizovány na intracelulární smyčce mezi druhým a třetím transmembránovým segmentem a nejspíše hrají roli při vazbě vaniloidů a aktivaci kanálu. Mutací Tyr 511 došlo ke ztrátě kapsaicinové odpovědi, ale teplotní citlivost a aktivace protony byla plně zachována (Jordt and Julius, 2002). Další důležité zbytky, které se podílejí na vazbě vaniloidů a receptoru jsou Tyr 550 u člověka a potkana (Gavva et al., 2004), Met 547 v S4 segmentu u potkana, Leu 549 u morčete a Leu 547 u králíka a člověka (Gavva et al., 2004; Chou et al., 2004; Phillips et al., 2004) a zbytky v oblasti póru Glu 636, Asn 646 a Glu 648 (Welch et al., 2000).

Kapsaicin vykazuje značnou strukturní podobnost s endogenními TRPV1 agonisty, jako jsou anandamid (Zygmunt et al. 1999), 12-hydroperoxyeicosatetraenová kyselina (12-HPETE) (Hwang et al., 2000) a N-arachidonyl dopamin (NADA) (Huang et al., 2002), tudíž o identifikaci regionu, který se podílí na vazbě ligandu, je projevem velký zájem především farmaceutických firem.

#### **2.5.4. Aktivace protony a kationty**

Extracelulární protony regulují TRPV1 dvěma mechanismy. V rozmezí pH 6-7, dochází k senzitivaci kanálu a ke snížení hranice aktivace pomocí tepla a vaniloidů (Caterina et al., 1997). Ve vyšších koncentracích (pH nižší než 6) protony TRPV1 přímo aktivují (Tominaga et al., 1998). Vyšší koncentrace protonů zvyšuje pravděpodobnost otevírání kanálu, ale nemá žádný vliv na vodivost či dobu otevření kanálu (McLatchie and Bevan, 2001). Byly objeveny dva glutamátové zbytky lokalizované v extracelulárním regionu póru, které, jak se zdá, hrají důležitou roli v regulaci TRPV1. Glu 600 je důležitý pro senzitivaci a Glu 648 se zdá být nepostradatelný pro přímou aktivaci (Jordt et al., 2000).

Kationty mohou regulovat TRPV1 podobným způsobem jako protony. Na<sup>+</sup> (50mM), Mg<sup>2+</sup> a Ca<sup>2+</sup> (1-10mM) zvyšuje vliv agonistů, zatímco divalentní kationty (více než 10mM) aktivují TRPV1 přímo (Ahern et al., 2005). Polyvalentní kationty jsou ještě silnějšími regulátory, např. Gd<sup>3+</sup> aktivuje kanál v mikromolárních koncentracích (Toušová et al., 2005), avšak při vyšších koncentracích Gd<sup>3+</sup> aktivně blokuje kanál. Do těchto

interakcí jsou zahrnuty aminokyselinové zbytky Glu 600, Glu 648 a Asp 646 (Ahern et al., 2005).

### **2.5.5. Aktivace teplem**

TRPV1 receptor je aktivován bolestivým teplem s prahovou hodnotou okolo 43°C. Mimo přímé aktivace teplo také značně zvyšuje běžnou odpověď TRPV1 ligandů (Babes et al., 2002). Teplem vyvolaná aktivace dává TRPV1 receptoru funkci teplotního čidla. Bylo publikováno, že TRPV1 se podílí na regulaci tělesné teploty (Caterina et al., 2000; Gaavva et al., 2007). Přesné mechanismy regulace funkce nejsou zatím plně objasněny, ale díky objevu dalších TRP kanálů, které jsou termosenzitivní, lze předpokládat, že jako teplotní senzor funguje nějaká doména, která je u všech členů přítomna a možná evolučně konzervovaná (Jordt et al., 2003; Patapoutian et al., 2003). Bylo publikováno, že určité mutace a fosforylace PKA a PKC vedou ke snížení teplotní hranice pro aktivaci TRPV1 (Jordt et al., 2000; Tominaga et al., 2001; Numazaki et al., 2002), což ukazuje na komplexnější vliv tepla na TRPV1. To potvrzuje i skutečnost, že zatím nebyly popsány mutace, které by odstranily aktivaci kanálu zprostředkovanou teplem.

### **2.5.6. Senzitizace a regulace TRPV1**

Stavy spojené s infekcí, se zánětem a hypoxií jsou provázeny výlevem mediátorů zánětu, lokálním zvýšením kyselosti, teploty či osmotického tlaku. Tyto faktory senzitivizují či přímo aktivují TRPV1. Výsledky knock-out studií potvrzují, že TRPV1 se podílí na aktivaci nociceptorů a vzniku bolesti (Tominaga and Tominaga, 2005). Zvýšená citlivost je dána výsledkem synergického účinku jednotlivých agonistů TRPV1, regulací aktivity TRPV1 fosforylací především PKA, PKC, CaMKII, N-glykosylací Asn 604 (Jahnel et al., 2001) nebo také modulací vazbou ATP na Walker doménu či hydrolýzou PIP<sub>2</sub>, která uvolňuje TRPV1 z inhibice.

### **2.5.6.1 Fosforylace PKA**

Souvislost mezi aktivací PKA a senzitivací TRPV1 byla poprvé prokázána studií, ve které prostaglandin E<sub>2</sub>, jenž nepřímo aktivoval PKA, zvyšoval kapsaicinovou odpověď u neuronů ganglií zadních kořenů míšních (Lopshire and Nicol, 1998). Tyto výsledky potvrzují i studie dalších zánětlivých mediátorů, jenž ovlivňují TRPV1 prostřednictvím PKA aktivace (Smith et al., 2000). Mediátory zánětu mohou sice přímo působit na TRPV1, ale především představují ligandy metabotropních receptorů, jejichž aktivace má za důsledek spuštění signální dráhy, jenž vede k aktivaci proteinkináz a fosforylaci TRPV1 receptoru. Hlavním fosforylačním místem PKA je Ser 502. Tato fosforylace je závislá na AKAP proteinu, který přibližuje PKA k receptoru (Rathee et al., 2002). Dalšími identifikovanými aminokyselinovými zbytky, které jsou fosforylovány, jsou Ser 116 a Thr 370 lokalizované na N-konci (Bhave et al., 2002; Mohapatra and Nau, 2003). Fosforylací Ser 116 PKA dochází k desenzitivaci TRPV1. Thr 144, Thr 370 a Ser 502 jsou důležité pro senzitivaci TRPV1 prostřednictvím fosforylace PKA (Rathee et al., 2002).

### **2.5.6.2. Fosforylace PKC**

Objev regulace funkce TRPV1 pomocí PKA vyvolala intenzivní zájem o studia dalších proteinkináz, které by mohly být zapojeny v senzitivaci TRPV1 receptoru. Bylo dokázáno, že zvýšená koncentrace látek, které jsou uvolňovány z poškozených buněk, jako je prostaglandin, bradykinin, adenosintrifosfát a jiné, aktivují PKC přes vazbu na specifické receptory spřažené s Gq-proteiny. Bylo také zjištěno, že vazba ATP na metabotropní receptor aktivuje PKC, která fosforyluje TRPV1 a snižuje teplotní práh jeho aktivace až o 7°C (Tominaga et al., 2001). Podobný mechanismus tepelné senzitivace byl popsán i u bradykininu (Sugiura et al., 2002). Fosforylace závislá na PKC snižuje teplotní práh aktivace TRPV1 receptoru a zvyšuje membránové odpovědi vyvolané aplikací kapsaicinu, anandamidu a nízkého pH jak u neuronů zadních kořenů míšních tak i u buněk tkáňových kultur, které byly transferovány genem TRPV1 receptoru (Vellani et al., 2001). Byly identifikovány dva zbytky Ser 800 a Ser 502, které jsou prostřednictvím PKC fosforylovány. Ser 502, jak bylo zmíněno výše, je také jedním z hlavních fosforylačních míst pro PKA. Záměnou Ser 800 a Ser 502 za Ala nedochází k senzitivaci a aktivaci TRPV1 ani k posunu teplotního prahu k nižším hodnotám (Numazaki et al., 2002; Bhave et

al., 2003). Bylo také ukázáno, že na jejich fosforylaci je závislá aktivace TRPV1 receptoru oleylethanolamidem (OEA) a zvýšený účinek N-arachidonyl dopaminu (NADA) (Ahern et al., 2003; Premkumar et al., 2004).

### **2.5.6.3. Fosforylace CaMKII**

CaMKII zvyšuje aktivitu TRPV1 a nejspíše prostřednictvím fosforylace reguluje vazbu agonisty na receptor. Byly publikovány zatím dva fosforylační cíle CaMKII Thr 704 a Ser 502 (Jung et al., 2004). Ser 502 je fosforylačním cílem všech tří proteinkináz a nejspíše hraje klíčovou roli v regulaci TRPV1 receptoru. CaMKII fosforylace a její schopnost modulovat funkci TRPV1 není zatím plně objasněna.

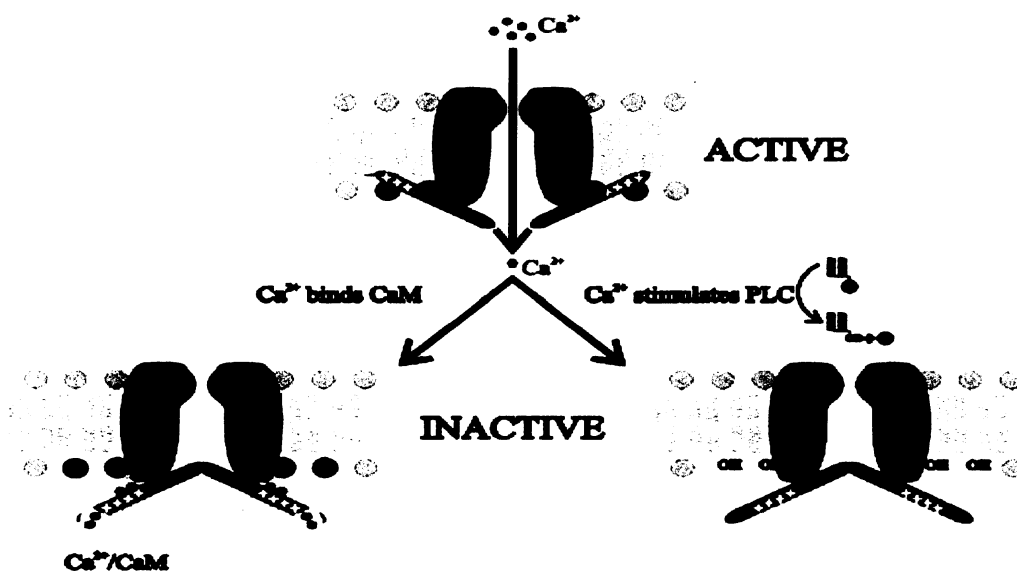
### **2.5.7. Desenzitizace**

Po aktivaci receptoru TRPV1 dochází ke snížení odpovědi receptoru na přítomnost agonisty. Tento stav je doprovázen konformační změnou, která vede k uzavření iontového kanálu a přechodné nebo trvalé ztrátě původní aktivace (Szallasi et al., 1999). Předpokládá se, že desenzitizace receptoru má převážně obrannou funkci a chrání buňku před zvýšenou intracelulární koncentrací  $\text{Ca}^{2+}$ . Míra desenzitizace TRPV1 receptoru je závislá na  $\text{Ca}^{2+}$  kationtech, které regulují dráhy fosforylace, defosforylace (Bhave et al., 2002; Mandadi et al., 2004). Nejlépe prostudovaný je mechanismus  $\text{Ca}^{2+}$  desenzitizace pomocí fosfatázy kalcineurinu, která defosforyluje TRPV1 a tím snižuje jeho aktivitu (Docherty et al., 1996). PKA fosforylace, jenž je zmíněna výše je další způsob, který může vést k desenzitizaci TRPV1.

V dnešní době je intenzivně studován vliv CaM a PLC na  $\text{Ca}^{2+}$  závislé desenzitizaci TRPV1. Již dříve bylo publikováno, že kalmodulin pravděpodobně interaguje s 35 aminokyselinovým segmentem na C-konci TRPV1 (767-801), avšak odstranění této oblasti pouze zmírňuje projev desenzitizace (Numazaki et al., 2003). Jako vazebné místo pro CaM na N-konci byla publikována oblast první ankyrinové domény na N-konci (189-222). Vazba kalmodulinu se v této oblasti receptoru zvyšuje v přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  kationtů (Rosenbaum et al., 2004). Není dosud známo, zda je do procesu  $\text{Ca}^{2+}$  zprostředkované desenzitizace zapojen více N- či C-konec. Studia kalmodulin vazebných míst ukázala, že kalmodulinové místo na C-konci je také interakční pro  $\text{PIP}_2$ , který je známou molekulou

regulující funkci i ostatních TRP kanálů. PIP<sub>2</sub> se objevuje především ve spojení s PLC dráhou, která je aktivována zvýšenou intracelulární koncentrací Ca<sup>2+</sup>. Pozitivně nabitě zbytky v cytoplazmatické oblasti kanálů jsou pravděpodobně trvale zapojené v interakcích s PIP<sub>2</sub>. Do interakcí s PIP<sub>2</sub> je nejspíše zahrnut TRP box a jeho okolí. Po aktivaci TRPV1 dochází k vtoku Ca<sup>2+</sup> kationtů a tím se aktivuje PLC, jenž hydrolyzuje PIP<sub>2</sub>, pravděpodobně interagující s pozitivně nabitými zbytky v cytoplazmatické oblasti receptoru, čímž drží kanál v aktivní konformaci. Aktivace PLC a následná hydrolýza PIP<sub>2</sub> kanál desenzitizuje. Další možností desenzitizace je aktivace CaM zvýšenou koncentrací Ca<sup>2+</sup> a vazba CaM na kanál. Vzájemně se překrývající oblasti pro CaM a PIP<sub>2</sub> a jejich opačné působení přivádí k názoru, že tyto dva modulátory spolu kompetují (Gordon et al., 2008) (Obr. 6).

Byly popsány i Ca<sup>2+</sup> nezávislé formy desenzitizace TRPV1. Tato desenzitizace je způsobena kontinuální nebo opakovanou tepelnou expozicí a byla pozorována bez přítomnosti Ca<sup>2+</sup> (Tominaga et al., 1998). Konformační změny TRPV1 receptoru, jenž jsou důsledkem desenzitizace, jsou dlouhotrvající (více než 20 minut) a podílí se na nich zřejmě oblast šesté transmembránové domény (Mohapatra et al., 2003).



Obr. 6: Hypotéza desenzitizace TRPV1 regulovaná CaM a PIP<sub>2</sub> (červeně vyznačeny reaktivní zbytky PIP<sub>2</sub>) (Gordon et al., 2008)



## 2.6. Kalmodulin reguluje funkci TRP kanálů

Nejvýznamější protein interagující s  $\text{Ca}^{2+}$  kationty je CaM, který byl nalezen ve všech eukaryotických buňkách. Funkce CaM je vázat  $\text{Ca}^{2+}$  kationty a regulovat další signalizační dráhy či přímo stimulovat cílové proteiny a jejich komplexy.

Struktura CaM se vyznačuje dvěma globulárními konci vzájemně spojenými jedním  $\alpha$ -helixem. Každý konec obsahuje dvě  $\text{Ca}^{2+}$  vazebné domény tzv. EF hand motivy. Každý EF hand motiv obsahuje dva  $\alpha$ -helixy spojené kličkou o dvanácti aminokyselinách, ve kterých aspartátová kyselina a glutamátová kyselina formuje iontové vazebné místo. C-koncová doména obsahuje vazebná místa s desetkrát větší afinitou pro  $\text{Ca}^{2+}$  než N-koncová doména. CaM je aktivován navázáním nejméně dvou či více  $\text{Ca}^{2+}$  kationtů. Aktivace způsobí konformační změnu, molekula se stává flexibilní a přechází z rozvinuté formy do více kompaktní (Crivici and Ikura, 1995; Vetter and Leclerc, 2003) (Obr. 7).

Alosterická aktivace pomocí  $\text{Ca}^{2+}$  je analogická s alosterickou PKA pomocí cAMP, s tím rozdílem, že  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin nevykazuje samotnou enzymatickou aktivitu. Může sloužit jako permanentní regulátor enzymatického komplexu, ale nejčastěji  $\text{Ca}^{2+}$  dává možnost kalmodulinu regulovat další cílové proteiny v buňce.



A. apo-CaM



B.  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM

Obr. 7: A. Rozvolněná struktura CaM bez navázaných  $\text{Ca}^{2+}$  iontů

B. Kompaktní struktura CaM s navázanými  $\text{Ca}^{2+}$  ionty

(Vetter and Leclerc, 2003)

Strukturní studie kalmodulinu a cílového proteinu ukazují, že kalmodulin vytváří kompaktní globulární strukturu, která vzniká ohnutím centrálního helixu. Vazebný partner zaujímá ve většině případech  $\alpha$ -helikální strukturu, která je obklopena aktivovaným kalmodulinem (Ikura et al., 1992).

TRP kanály jsou modulovány kalmodulinem. Tento mechanismus byl již objeven u TRPL *Drosophila melanogaster*, kde se tento kanál podílí na fofotransdukci (Philips et al., 1992; Trost et al., 1999).

Předpokládané vazebné místo pro kalmodulin je region někdy označovaný jako CIRB. Tato doména byla nalezena u všech TRPC zástupců a dnešní studie se zabývají průkazem této domény u TRPV a TRPM rodin. Nejčastější lokalizace vazebných míst pro CaM je na C-konci TRP kanálů, avšak ukazuje se, že často jsou vazebná místa lokalizována i na N-konci.

### 2.6.1 Kalmodulin vazebné motivy

Kalmodulin se vyznačuje značnou konformační flexibilitou a díky tomu má schopnost regulovat a vázat řadu nepříbuzných proteinů. Sekvenční diverzita CaM vazebného místa je velmi bohatá, i když většinou je to oblast kolem dvaceti aminokyselin, které vytváří bazický helix s pozitivně nabitými zbytky, jenž jsou obklopeny zbytky hydrofóbními (Ikura, 1996).

Na základě analýz sekvenční homologie bylo identifikováno několik strukturních a sekvenčních rysů, které umožňují klasifikaci kalmodulin vazebných motivů. Pro skupinu proteinů, které nesou kalmodulin vazebnou skupinu a interagují s CaM nezávisle na  $\text{Ca}^{2+}$  iontech, byl identifikován tzv. IQ motiv (Cheney and Mooseker, 1992). Tento motiv je tvořen sekvencí 25 aminokyselin a vyznačuje se sekvencí IQXXXRGXXXR, kde X může být jakýkoli aminokyselinový zbytek.

Pro proteiny interagující s CaM pouze v přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  iontů byla vytvořena Calmodulin Target Database (<http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb/ctdb/home.html>), kde jsou kalmodulin interakční místa rozdělena podle sekvence na několik motivů: 1-5-10, 1-8-14 a 1-16 motiv. Čísla udávají pořadí hydrofóbních zbytků, které jsou pro interakci

klíčové. Tyto hydrofóbní zbytky jsou pak nejčastěji obklopeny pozitivně nabitými aminokyselinovými zbytky (Rhoads and Friedberg, 1997; Yap et al., 2000).

## 3. MATERIÁL A METODY

### 3.1. Příprava DNA konstruktů

DNA myšího receptoru TRPM5 nám byla poskytnuta profesorem D. Julius (University of California, San Francisco) a DNA krysího receptoru TRPV1 profesorem C. Montell (Johns Hopkins University, Baltimore). Na základě sekvence a sekundární struktury byly navrženy primery pro zavedení restrikčních míst, stop kodónu a primery pro změnu aminokyseliny za jinou. Pro zachování strukturních domén proteinu je nutné, aby stop kodóny nezasahovaly do sekundární struktury. Znalost o sekundární struktuře byla získána prostřednictvím serveru PHD <http://www.predictprotein.org/>. DNA sekvence TRPM5 receptoru je přístupná v genové bance NCBI pod číslem AY 280364, DNA sekvence TRPV1 pod číslem NM 031982.

#### 3.1.1. PCR amplifikace

Amplifikace DNA byla provedena pomocí PCR za použití primerů, které obsahují přídatnou sekvenci restrikčního místa pro usnadnění procesu ligace. Primery byly navrženy tak, aby docházelo k amplifikaci části DNA receptoru obsahující s velkou pravděpodobností kalmodulin vazebné místo, o němž jsme získali informace v Calmodulin Target Database (<http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb/ctdb/home.html>).

Navržené primery pro vnesení restrikčního místa (restrikční místa pro dané restrikční endonukleázy tučně vyznačena):

#### **M5Ct15bNdeI:**

**GGACTACTGCATATG** AGCTACACATTCCAGGTGGTG

#### **M5Ct15bBamH1:**

**CGTAGGATCCCTAGGTGTCAGAGGGTGGCAAGCC**

Primery pro konstrukty TRPM5, které byly ligovány do vektoru pET15b.

**M5Ct32bBamH1:**

GATATCGGATCCGAGCTACACATTCCAGGTGGTG

**M5Ct32bXho1:**

GCCAGACTCGAGTCAGGTGTCAGAGGGTGGCAAGCC

Primery pro konstrukty TRPM5, které byly ligovány do vektoru pET32b.

**3.1.1.1. Obsah reakční směsi**

25 µl PPP Master mix (150 mM Tris-Cl (pH=8,8), 40 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 µM každého dNTP, 100 U/ml Taq Purple DNA polymerázy, aditiva, stabilizátory)

1 µl templát

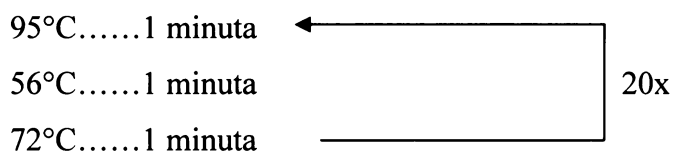
1 µl primer A

1 µl primer B

22 µl PCR H<sub>2</sub>O

Směs krátce vortexujeme, stočíme na centrifuze a dáme do cyklu.

**3.1.1.2. Podmínky PCR**



Reakční směs byla přečištěna PCR kitem od firmy Genomed podle protokolu PCR Purification Protocol.

### **3.1.2. Restrikční štěpení**

K restrikčnímu štěpení byly použity enzymy od firmy New England Biolabs NdeI, BamHI, XhoI a výrobcem doporučené reakční pufrы.

#### **3.1.2.1. Restrikční štěpení amplifikované DNA**

Po amplifikaci DNA pomocí PCR s primery obsahující restrikční místa vzniká DNA, která může být štěpena restrikčními enzymy, jenž dávají vznik kohézním koncům důležitým pro následnou ligaci do vektoru.

##### **3.1.2.1.1. Reakční směs pro restrikční štěpení DNA konstruktů**

140  $\mu$ l templát (c=30 ng/ $\mu$ l)

18  $\mu$ l 1x reakční pufr 10x

2  $\mu$ l BSA 100x

5  $\mu$ l restrikční enzym A

5  $\mu$ l restrikční enzym B

Toto množství je pouze ilustrativní, závisí na koncentraci templátu.

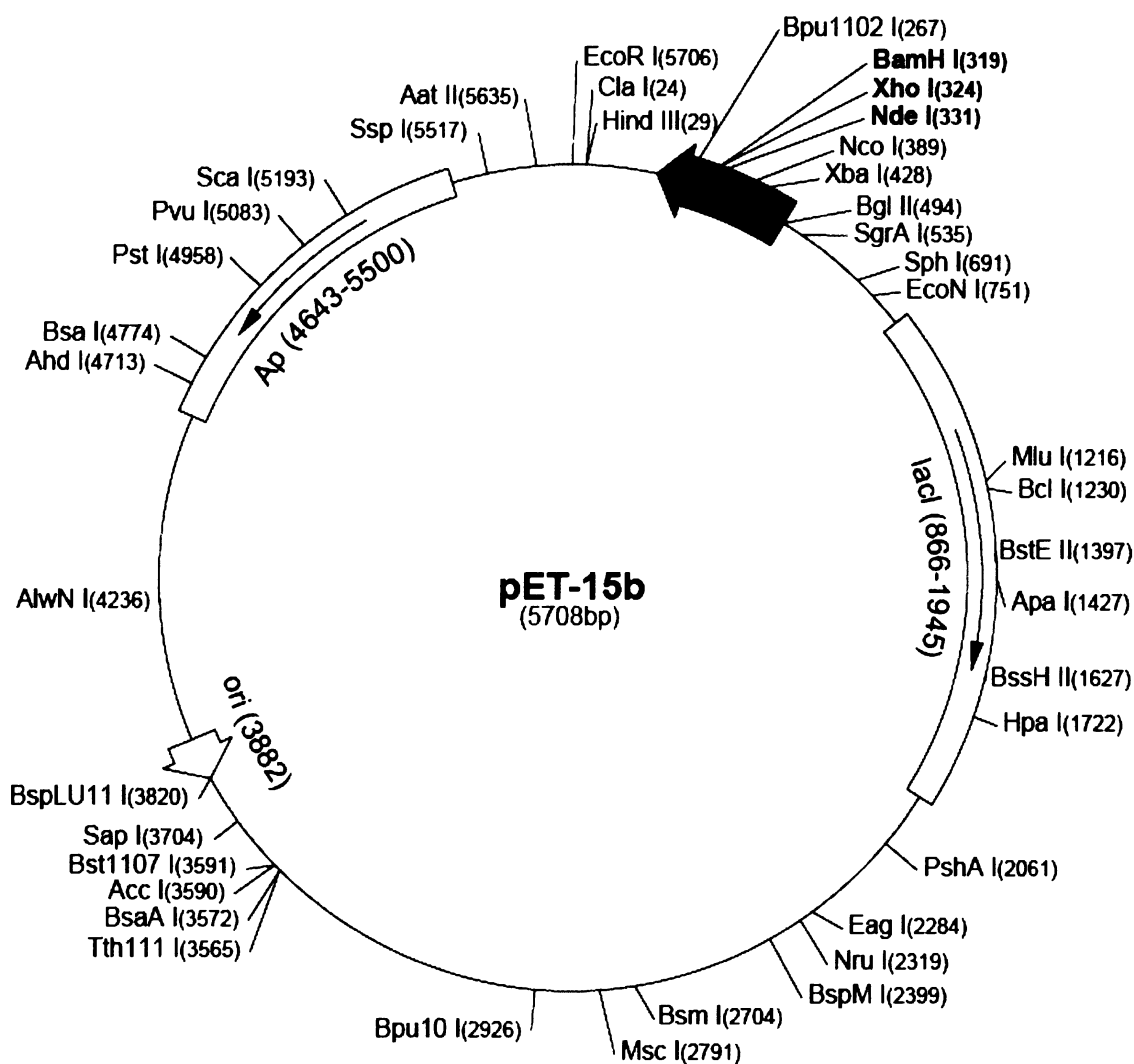
Směs krátce vortexovat, centrifugovat a inkubovat přes noc při 37°C.

Reakční směs byla přečištěna PCR kitem od firmy Genomed podle protokolu PCR Purification Protocol.

##### **3.1.2.2. Restrikční štěpení vektorové DNA**

Pro vnesení cizorodé DNA vektory obsahují polylinker s množstvím restrikčních míst (Obr. 8). V těchto místech je možné za použití vybraných restrikčních enzymů vektor otevřít. Vektor byl štěpen dvěma různými restrikčními enzymy z důvodu orientovaného vkládání DNA konstruktů. Byly použity dva typy vektorů pET15b a pET32b, který

obsahuje navíc sekvenci thioredoxinu, který slouží ke zvýšení rozpustnosti fúzního proteinu.



Obr. 8: Struktura expresního vektoru pET15b

### 3.1.2.2.1. Reakční směs pro restrikční štěpení vektoru

160  $\mu$ l vektor (c=60 ng/ $\mu$ l)

20  $\mu$ l 1x reakční pufr 10x

2  $\mu$ l BSA 100x

9  $\mu$ l restrikční enzym A

9  $\mu$ l restrikční enzym B

Toto množství je pouze ilustrativní, závisí na koncentraci vektoru.

Směs krátce vortexovat, centrifugovat a inkubovat přes noc při 37°C.

#### **3.1.2.2.2. Přechištění naštípaného vektoru**

Ke směsi s naštípaným vektorem byla přidána vkladací barva 6x Loading Dye od firmy Fermentas a vzorek byl nanesen na 1% agarózový gel (10x TBE pufr: 1M Tris, 0,9 M kyselina boritá, 0,01 M EDTA, pH=8,2). Pro kontrolu nanášíme i 5 µl nenaštípaného vektoru. Příslušný fragment byl poté vyříznut žiletkou na UV transiluminátoru. Fragment izolujeme z gelu za použití kitu Gel Extraction Kit od firmy Genomed.

### **3.1.3. Ligace amplifikovaného fragmentu do vektoru**

Vektor a cizorodý fragment můžeme díky restričnímu štěpení stejnými enzymy, které dávají komplementární kohezní konce, spojit.

#### **3.1.3.1. Ligační směs**

15 µl DNA fragment

5 µl DNA vektor (poměr vektor:inzert v molárním poměru 1:3)

2,5 µl ligační pufr (10x T4 DNA reakční pufr, New England Biolabs)

1,5 µl T4 DNA ligáza (New England Biolabs)

Směs krátce vortexovat, krátce centrifugovat a inkubovat při pokojové teplotě 2 hodiny.

### **3.1.4. Transformace DNA do buněk *E.coli***

Ligační směs transformujeme do buněk *E.coli* TOP 10.



Postup:

1. na ledu necháme roztát buňky
2. do 90  $\mu$ l buněk přidáme 25  $\mu$ l ligační směsi a necháme 20 minut na ledu
3. vzorek vložíme na 45 sekund do lázně vyhřáté na 42°C (metoda tepelného šoku)
4. vzorek ochladíme 2 minuty na ledu a přidáme vyhřáté LB (750  $\mu$ l)
5. necháme třepat 30 minut při 37°C
6. odebereme 200-250  $\mu$ l a vysejeme na agarovou plotnu s ampicilinem
7. inkubujeme přes noc v termostatu při 37°C.

### 3.1.5. Izolace DNA

Přes noc na agarové plotně vyrostou kolonie. Jednotlivé kolonie odpícháme špičkou a vneseme do LB s 5  $\mu$ l ampicilinu. Necháme třepat přes noc při 37°C.

Poté izolujeme DNA podle kitu Plasmid Miniprep od firmy Genomed. Dostatečné množství DNA necháme ověřit sekvencí na sekvenční jednotce ABI PRISM na MBÚ AVČR.

### 3.1.6. Měření koncentrace DNA

Po izolaci DNA musíme zjistit její koncentraci pro další práci. Koncentraci můžeme měřit odečítáním z agarózového gelu vhodné koncentrace (více než 2000 bp 0,8-1% gel, 1000 bp a méně 1,5-3% gel) za pomoci koncentračního markeru. Porovnááme světelnou intenzitu vzorku vzhledem k markeru.

Další možností je měření koncentrace DNA spektrofotometricky. U nás se užívá BioPhotometer 6131 od firmy Eppendorf. Jako BLANK se nejčastěji užívá TE pufr (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH=7,5), podle toho v čem máme DNA rozpuštěnou. Koncentrace je měřena automaticky programem dsDNA v jednotkách  $\mu$ g/ml, podle vzorce:

$$A = \epsilon * c * l$$

$\epsilon$  je extinkční koeficient  $0,2 * 10^{-6}$  l/m\*g

$l$  je optická délka kyvety (1 cm)

$c$  je koncentrace vzorku  $\mu$ g/l

### 3.1.7. Místně specifická mutageneze

Stop kodón a záměny aminokyselin byly vneseny do konstruktů našeho zájmu pomocí PCR oligonukleotid řízené mutageneze. Stop kodón byl využit pro zkrácení výsledného proteinu a usnadnění manipulace s ním.

#### 3.1.7.1. Navržení primerů pro PCR mutagenezi

Navržené primery by měly splňovat následující vlastnosti:

- mutace by měla být umístěna nejlépe uprostřed
- délka primerů by se měla pohybovat okolo 25–45 bází, v závislosti na počtu záměn
- minimální obsah GC párů by se měl pohybovat okolo 40%-50%
- primery by měly končit alespoň jedním či dvěma G nebo C nukleotidy
- teplota tání by neměla přesáhnout 78°C
- zápis ve směru od 5'-3' konci

Navržené primery pro vnesení stop kodónu a záměnu aminokyseliny CaM vazebného místa TRPM5 na C-konci (záměny vyznačeny tučně):

**M5CtE1073G1074**: záměna E1073 na stop kodón TAG a G1074 na stop kodón TGA  
CGGAGG AGGGACAGCT**AGTGA**GAGGTGCTGAGGAAAAC

**M5CtK1024N**: záměna K1024 na N  
CTGAGCCTGGTGCTCA**ACC**CAGGTCTTCAGGAAG

**M5CtQ1025L**: záměna Q1025 na L  
AGCCTGGTGCTCAAGCT**TGGT**TTCAGGAAGGAAGCC

**M5CtR1028S:** záměna R1028 na S

CTCAAGCAGGTCTTCAGCAAGGAAGCCCAGCATAAG

**M5CtK1029N:** záměna K1029 na N

CTCAAGCAGGTCTTCAGGAACGAAGCCCAGCATAAG

**M5CtK1034N:** záměna K1034 na N

AGGAAGGAAGCCCAGCATAACCGACAACATCTGGA

**M5CtR1035L:** záměna R1035 na L

GAAGCCCAGCATAAGCTGCAACATCTGGAGAGAGAC

**M5CtR1028SK1029N:** záměna R1028 na S a K1029 na N

CTGGTGCTCAAGCAGGTCTTCAGCACGAAGCCCAGCATAAG

**M5CtK1034NR1035L:** záměna K1034 na N a R1035 na L

AAGGAAGCCCAGCATAACTGCAACATCTGGAGAGAGACTTG

Navržené primery pro záměnu aminokyseliny CaM vazebného místa TRPV1 na C-konci:

**V1CtV769A:** záměna V769 na A

GGCAACTGTGAGGGCGCCAAGCGCACCCCTGAGC

**V1CtR711A:** záměna R711 na A

TGTGAGGGCGTCAAGCGCACCCCTGAGCTTCTCC

**V1CtL777A:** záměna L777 na A

CCCTGAGCTTCTCCGCAGGCCGAGTTTCAGGG

**V1CtR778A:** záměna R778 na A

CTGAGCTTCTCCTCAGCCCGAGTTTCAGGGAG

**V1CtR781A:** záměna R781 na A

CTCCTCAGGCCGAGTTGCAGGGAGAACTGGAAG

**V1CtV782A:** záměna V782 na A

CTCAGGCCGAGTTTCAGCGGAGAACTGGAAGAAC

**V1CtR785A:** záměna R785 na A

GTTTCAGGGAGAAACGCGAAGAACTTTGCCCTG

**V1CtK788A:** záměna K788 na A

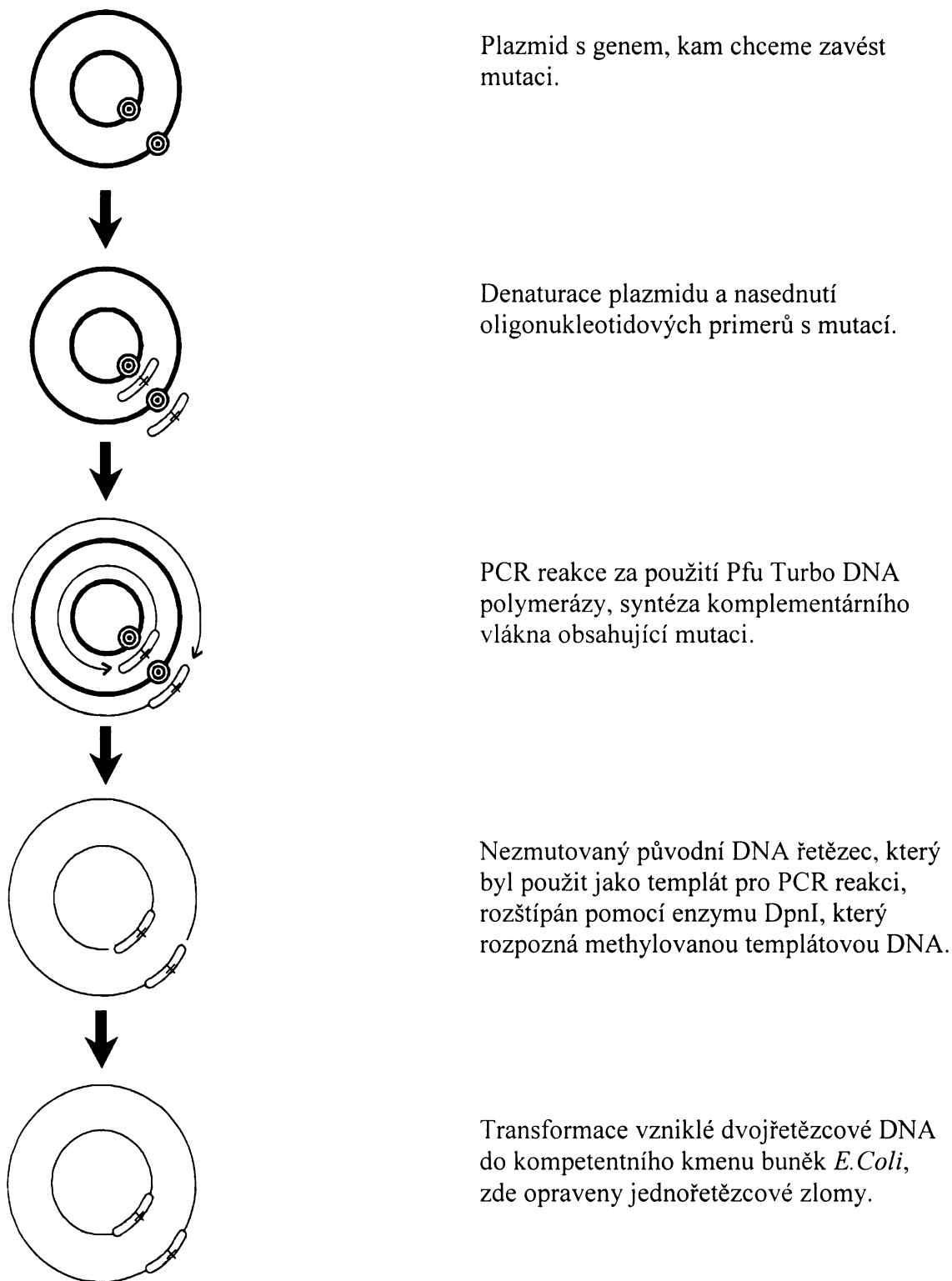
GAAACTGGAAGAACGCTGCCCTGGTTCCC

**V1CtR797A:** záměna R797 na A

CTGGTTCCCCTTCTGGCGGATGCAAGCACTCG

### 3.1.7.2. Zavedení bodové mutace pomocí QuikChange

Na zavedení bodové mutace jsme použili kit QuikChange XL Site-Directed mutagenesis od firmy Stratagene (Obr. 9).



Obr. 9: Princip bodové mutace pomocí metody QuikChange (manuál výrobce)

### 3.1.7.2.1. Obsah reakční směsi

5  $\mu$ l 10x Pfu ultra pufr (100 mM KCl, 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 200 mM Tris-HCl (pH=8,8),  
20 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1% Triton X-100, 1 mg/ml BSA)

2,5  $\mu$ l dNTP

5-8  $\mu$ l templát (v závislosti na koncentraci)

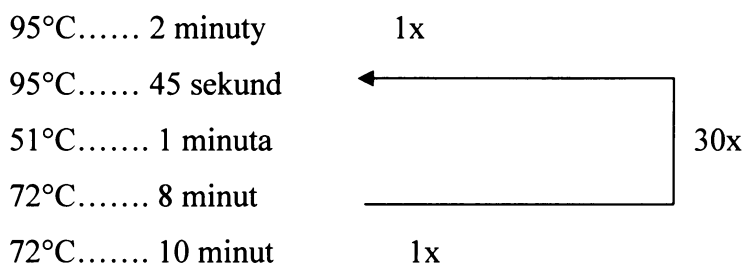
0,8  $\mu$ l primer up

0,8  $\mu$ l primer do

1  $\mu$ l Pfu Turbo DNA polymeráza (7x přesnější než běžně používaná Taq polymeráza)

Doplníme ddH<sub>2</sub>O do finálního objemu 50  $\mu$ l.

### 3.1.7.2.2. Podmínky PCR mutageneze



Pro odstranění templátu bez mutace přidáme ke směsi PCR 1  $\mu$ l DpnI a inkubujeme 1 hodinu při 37°C. Dpn I endonukleáza rozpoznává sekvenci 5'-Gm<sup>6</sup>ATC-3', tato metylovaná sekvence je obsažená v nemutované DNA.

### 3.1.7.3. Transformace PCR produktu

5  $\mu$ l PCR produktu bylo transformováno metodou tepelného šoku při 42 °C po dobu 45 sekund do 50  $\mu$ l buněk TOP 10 *E. coli* (podrobnější postup výše). Následovalo vynesení na agorové plotny, odpíchnutí kolonií, nárůst kolonií, izolace DNA, ověření konstruktů sekvenací (metodicky viz výše).

## **3.2. Expres a manipulace s proteiny**

### **3.2.1. Expresní test**

Expres konstruktu našeho zájmu byla ověřena pomocí expresního testu. Při 37°C jsme ve zkumavkách s LB a 5  $\mu$ l ampicilinu nechali narůst buňky BL 21 *E.coli* (postup transformace viz výše) se zaligovaným konstruktem v expresním vektoru. Po dosažení density 0,6 byl odebrán vzorek 0. Poté bylo do jedné zkumavky přidáno 0,5 mM IPTG a do druhé 1 mM IPTG, čímž jsme indukovali expresi. Následně byla snížena teplota na 20°C nebo na 25°C podle potřeby. Vzorky byly odebírány po čtyřech hodinách.

### **3.2.2. Expres a purifikace proteinů**

Proteiny byly exprimovány v expresním vektoru pET15b, pET32b v buňkách BL21 *E.coli*. Kultivace bakterií probíhala v 1l LB při 37°C. Po dosažení optické hustoty 0,8 byla narostlá kultura zchlazena na pokojovou teplotu a přidáním 0,5 ml 1M IPTG byla indukována expresí proteinu. Kultivace probíhala aerobně při teplotě 25°C po dobu 20 hodin.

Poté byla provedena centrifugace a pelet bakterií byl resuspendován v lyzačním pufru (1x PBS, 1 M NaCl, 10 mM imidazol, 0,05% NP-40, 0,1 mM PMSF, 1 mM  $\beta$ -merkaptoethanol, pH=8). Následně byl přidán lysozym 50  $\mu$ g/ml a směs byla inkubována na ledu po dobu 40 minut. Mechanické rozrušení buněk bylo provedeno na ledu sonikací a vzniklý sonikát byl centrifugován při 4°C po dobu 45 minut.

Pro získání našeho fúzního proteinu s terminální histidinovou kotvou (HIS-TAG) jsme použili metody niklové chromatografie na koloně Superdex 75 s chelatující sepharosou (Amersham Pharmacia Biotech). Postupovali jsme podle instrukcí výrobce. Protein byl eluován eluačním pufrům F (1x PBS pufr, 0,5 M NaCl, 2 mM  $\beta$ -merkaptoethanol, 600 mM imidazol, pH=8) a frakce byly naneseny na 15% SDS-PAGE gel (1x SDS running pufr: 25 mM Tris, 192 mM glycín, 0,1% SDS, pH=8,2).

### 3.2.3. Western Blot

Pro ověření přítomnosti našeho proteinu jsme použili metody Western Blot. SDS-PAGE 15 % gel s proteiny a speciálním western markerem jsme přeblotovali na PVDF membránu a postupně ji vymývali v 1x TBS, blokovacím roztoku (1% alkali-soluble Casein v 1x TBS), 1x TBSTT podle Western Blot protokolu od firmy Novagen. Inkubace v primární protilátce His-Tag monoclonal antibody probíhala přes noc a následná inkubace v sekundární protilátce Goat anti-Mouse IgG-HRP po dobu jedné hodiny. Chemiluminiscence byla detekována na přístroji LAS 100 FujiFilm.

### 3.2.4. Navržení peptidů pro kalmmodulinové místo

Peptidy byly navrženy za pomoci Calmodulin Target Database. TRPM5 receptor podle této databáze obsahuje jedno pravděpodobné vazebné místo na N-konci a dvě na C-konci. Na interakci CaM/receptor se převážně podílejí hydrofóbní a bazické aminokyseliny.

N-koncové peptidy M5 s předpokládaným vazebným místem pro CaM (tučně podtrženo):

RPLAMKSWL**LRDVL**RKGLVKAA**Q**STGAWILT  
(R76-T105)

Mutantní peptidy M5 NT předpokládaného vazebného místa pro CaM:

- Záměna hydrofóbní aminokyseliny:

RPLAMKSWARDVLRKGLVKAAQSTGAWILT                      změna L na A

- Záměna bazické aminokyseliny:

RPLAMKSWLRDVLAKGLVKAAQSTGAWILT                      změna R na A



C-koncové peptidy M5 s předpokládaným vazebným místem pro CaM:

VEYHGRPALAPPFILLSHLSLVLKQVFRKEAQHKRQHL  
(V1001-L1038)

GEVLRKTAHRVDLIAKYIGGLREQ  
(G1074-Q1097)

### **3.2.5. Měření vazby CaM pomocí anizotropie fluorescence**

Veškerá fluorescenční měření byla provedena na fluorimetru ISS PC1™ Photon Counting Spectrofluorimeter při pokojové teplotě v 1 ml křemenné kyvetě. Při měření s TRPV1 byl použit kalmodulin značený fluorescenční sondou Alexa Fluor 488 (Calmodulin from bovine brain Alexa Fluor 488 conjugate) od firmy Molecular Probes, v případě měření s TRPM5 byly použity komerčně objednané peptidy značené N-koncově sondou FITC od firmy GenScript.

Pro měření anizotropie fluorescence TRPV1 konstruktů bylo k 600 pmol značenému kalmodulinu v pufru 50 mM Tris-HCl (pH=7,5) a 2 mM CaCl<sub>2</sub> přidáváno zvyšující se množství TRPV1-CT fúzního proteinu a pro každou koncentraci byla zaznamenána anizotropie. Fluorescence byla excitována při 494 nm a emise byla detekována při vlnové délce 520 nm.

Pro měření anizotropie fluorescence TRPM5-CT, TRPM5-NT peptidů N-koncově značených FITC, bylo do kyvety se 100 nM peptidem v 20 mM pufru Tris-HCl (pH=7,5) a 10 mM CaCl<sub>2</sub> přidáváno zvyšující se množství kalmodulinu. Fluorescence byla excitována při 480 nm a emise byla detekována při vlnové délce 520 nm.

Anizotropie byla spočítána podle vztahu:

$$r = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2I_{\perp})$$

Frakce navázaného kalmodulinu (FB) byla počítána ze vztahu:

$$F_B = \frac{r_{obs} - r_{min}}{(r_{obs} - r_{min}) + Q(r_{max} - r_{obs})}$$

kde Q je poměr kvantových výtěžků navázané a volné formy,  $r_{max}$  značí anizotropii v saturaci,  $r_{min}$  značí minimální anizotropii a  $r_{obs}$  je pozorovaná anizotropie pro určitou koncentraci proteinu.

Data byla zpracována v programu *Microsoft Office Excel* a v programu *Sigma Plot*.

### 3.3. Přístroje

Analytické váhy, KERN (Česká Republika)

Centrifuga Biofuge 28 RS HERAEUS SEPATECH s rotory (Německo):

# 3746, 13 500 min<sup>-1</sup>, HFA 13.50

# 37# 3754, 14 000 min<sup>-1</sup>

53, 22 000 min<sup>-1</sup>, HFA 22.1

Centrifuga velkoobjemová K 80, JANEZKI (Německo)

Elektroforetická souprava OMNI-BIO (Česká Republika), SIGMA-ALDRICH (USA),  
BIO-RAD (USA)

LAS 100, FUJIFILM (Japonsko)

MiniCentrifuga, EPPENDORF (Německo)

PCR Mastercycler gradient/personal, EPPENDORF (Německo)

pH Meter 3505, JENWAY (Anglie)

Sonikátor 3000, MISONIX (USA)

Spectrofluorimeter ISS PC1™ Photon Counting (USA)

Spektrofotometr BioPhotometer 6131, EPPENDORF (Německo)

Termostat, MELAG (Německo)

Třepačka, INFORS HT BIOTRADE (Švýcarsko)

UV- transiluminátor, MELAG (Německo)

Vodní lázeň, UNIMED (Česká Republika)

## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1. Lokalizace a charakterizace kalmodulin vazebného místa TRPV1 CT

#### 4.1.1. Klíčová role CaM v desenzitizaci TRPV1

Receptor TRPV1 je důležitým integrátorem fyzikálních a chemických stimulů. Numazaki a jeho spolupracovníci již roku 2003 popsali možnost desenzitizace TRPV1 pomocí kalmodulinu na 35 aminokyselin dlouhém segmentu C-konce TRPV1. Komplex procesů, které vedou v konečné fázi k desenzitizaci receptoru jsou  $\text{Ca}^{2+}$  dependentní. Tento fenomén je v dnešní době intenzivně studován hlavně proto, že látky, které mají schopnost s tímto 35 aminokyselinovým segmentem interagovat, mohou být do budoucna užitečné pro léčení či zmírnění bolesti.

Kalciové ionty hrají v tomto mechanismu unikátní roli. Jsou zahrnuty v regulaci různorodých buněčných procesů a tudíž intracelulární koncentrace tohoto kationtu je buňkou úzce kontrolována. V cytoplazmě je koncentrace velmi nízká (okolo  $0,1\mu\text{M}$ ), zatímco v extracelulární části je podstatně vyšší (okolo  $1\text{mM}$ ). Řada rozmanitých stimulů vede k otevření  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů v plazmatické membráně a vtoku  $\text{Ca}^{2+}$  kationtů do buňky. Co víc, i některé organely, jako je sarkoplazmatické retikulum, endoplazmatické retikulum, mitochondrie i jádro, fungují jako zásoby vápníku (Vetter and Leclerc, 2003).

Na  $\text{Ca}^{2+}$  kationtech je závislý i kalmodulin. Tento 15 kDa velký intracelulární protein je regulátorem mnoha buněčných proteinů a transmembránových iontových transportérů. Při vzrůstu intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  kationtů nad  $10^{-5}\text{M}$  se čtyři  $\text{Ca}^{2+}$  ionty váží na kalmodulin, čímž dochází ke změně konformace, která je pro CaM aktivující (Yap et al., 2000).

Proteiny, na které je kalmodulin schopen se vázat nevykazují žádnou sekvenční shodu, ale většinou obsahují  $\alpha$ -helix s hydrófbními aminokyselinami, jejichž pozice se stala rozhodující při vytvoření nomenklatury kalmodulin vazebných motivů. Dalším znakem jsou bazické aminokyselinové zbytky, které obklopují zbytky hydrofóbní (Vetter and Leclerc, 2003).

Regulace a vazba kalmodulinu byla objevena i u TRP kanálů. Kalmodulin může interagovat s kanály na jejich N- či C- intracelulárních koncích (Rosenbaum et al., 2004; Zhu, 2005). Kalmodulin vazebná doména na N-konci TRPV1 receptoru je lokalizována v oblasti ankyrinových domén (Rosenbaum et al., 2004) a na C-konci je to segment dlouhý 35 aminokyselin (E767-T801) (Numazaki et al., 2003).

Naším cílem byla charakterizace vazebného motivu na C-konci receptoru TRPV1. Vazba CaM na tento úsek je  $\text{Ca}^{2+}$  dependentní, ale nebyl zde identifikován žádný z popsaných kalmodulin vazebných motivů (Numazaki et al., 2003). Tento motiv nejlépe koresponduje s 1-8-14 motivem na pozici 1 a 14 (podle Calmodulin Target Database). Za pomoci bodových mutací hydrofóbních a bazických zbytků této oblasti a měření anizotropie fluorescence, jsme určili aminokyseliny esenciální pro vazbu CaM na C-konci TRPV1 a charakterizovali jsme atypický kalmodulin vazebný motiv.

#### 4.1.2. Příprava bodových mutací CaM vazebného motivu

DNA TRPV1 (V686-K837) byla ligována do expresního vektoru pET32b za použití EcoRI a HindIII restrikčních míst. Pro charakterizaci CaM vazebného místa na C-konci jsme vytvořili devět bodových mutací 35 aminokyselin dlouhého CaM vazebného motivu pomocí místně specifické mutagenese.

- CaM vazebné místo na C-konci TRPV1:

EGVKRTLSFSLRSGRVSGRNWKNFALVPLLRDAST (E767-T801)

(1)

(14)

atypický CaM vazebný motiv 1-14

- Mutace CaM vazebného místa:
  - Val 769 Ala (V769A)
  - Arg 771 Ala (R771A)
  - Leu 777 Ala (L777A)
  - Arg 778 Ala (R778A)
  - Arg 781 Ala (R781A)
  - Val 782 Ala (V782A)
  - Arg 785 Ala (R785A)
  - Lys 788 Ala (K788A)
  - Arg 797 Ala (R797A)

#### **4.1.3. Příprava fúzních proteinů TRPV1 CT**

TRPV1 C-konec byl exprimován jako fúzní protein s thioredoxinem na N-konci a histidinovou kotvou na N- i C-konci. Izolovaný C-konec má silné tendence agregovat, proto nebylo možné thioredoxin štěpit. Měření anizotropie fluorescence byla tedy provedena s celým fúzním proteinem.

#### **4.1.4. Měření vazby CaM pomocí anizotropie fluorescence**

Pomocí měření anizotropie fluorescence jsme identifikovali aminokyselinové zbytky, které se významně podílí na vazbě CaM/receptor. Do kyvety s fluorescenčně značeným kalmodulinem jsme titrovali postupně zvyšující se množství fúzního proteinu TRPV1 CT. Vazba TRPV1/CaM je  $\text{Ca}^{2+}$  dependentní, tudíž nedocházelo k vazbě CaM v nepřítomnosti vápenatých kationtů. Stejně výsledky publikoval Numazaki et al. roku 2003.

Zaznamenali jsme hodnotu anizotropie pro každou koncentraci TRPV1. Z ní byla poté vypočítána frakce navázaného kalmodulinu a disociační konstanty pro jednotlivé

konstrukty. Disociační konstanty mutantních fúzních peptidů jsme porovnávali s nemutovanou formou TRPV1 (WT TRPV1).

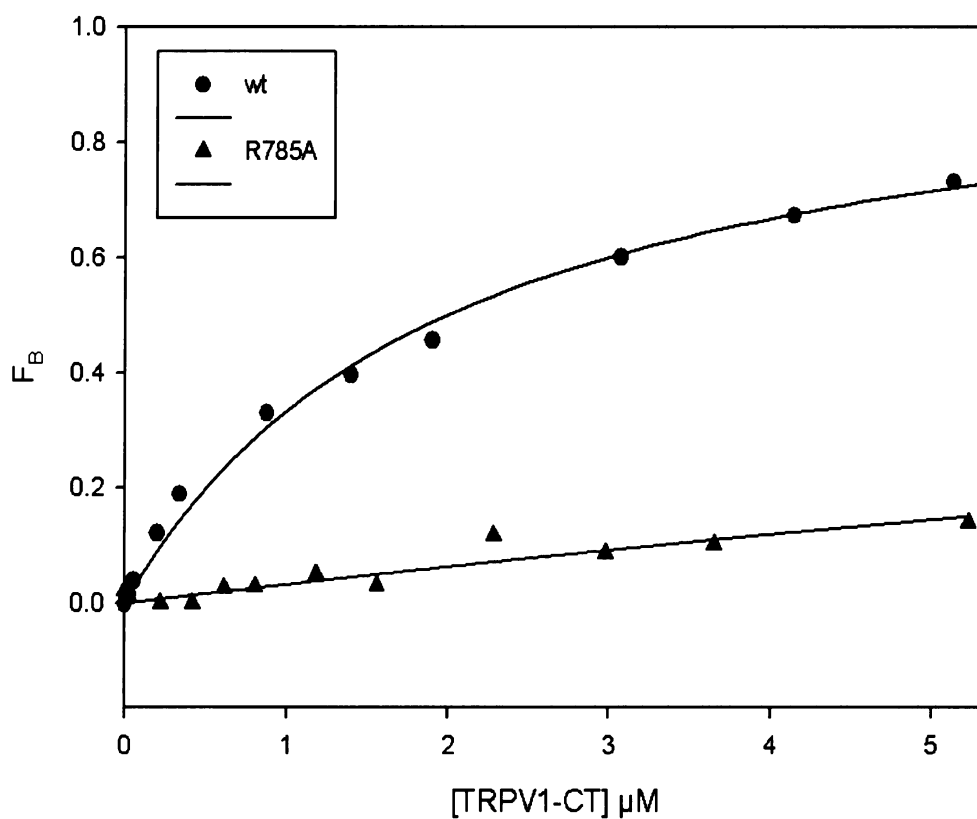
Hodnoty disociačních konstant mutantních forem a WT TRPV1 jsou uvedeny v Tab. 1.

Konstrukt	Disociační konstanta [ $\mu\text{M}$ ]
WT	1,5 $\pm$ 0,4
V769A	3,9 $\pm$ 0,9
R771A	10,3 $\pm$ 1,6
L777A	2,3 $\pm$ 0,5
R778A	1,5 $\pm$ 0,3
R781A	0,8 $\pm$ 0,2
V782A	1,5 $\pm$ 0,2
R785A	29,5 $\pm$ 5,8
K788A	3,0 $\pm$ 0,5
R797A	9,0 $\pm$ 1,7

Tab. 1: Tabulka hodnot disociačních konstant

Porovnání hodnot disociačních konstant  $K_D$  mutantních konstruktů s WT TRPV1 ukazuje, že bodové mutace Leu 777 Ala, Arg 778 Ala, Arg 781 Ala a Val 782 Ala, neovlivnily vazbu kalmodulinu, zatímco bodové mutace Val 769 Ala, Arg 771 Ala, Arg 785 Ala, Lys 788 Ala a Arg 797 Ala vykazují signifikantní zvýšení disociační konstanty. Nejvyšší nárůst disociační konstanty byl pozorován u mutantního konstruktu Arg 785 Ala (R785A), proto můžeme usuzovat, že tento aminokyselinový zbytek je při interakci

TRPV1/CaM nejvýznamnější. Pokles vazebné afinity značeného CaM u konstruktu R785A s porovnáním s WT byl nejvýraznější (Obr. 10).



Obr. 10: Titrační křivky měření fluorescenční anizotropie. Porovnání WT TRPV1 CT s konstruktem R785A

Tyto výsledky jsou součástí publikace:

Gryčová L, Lánský Z, Friedlová E, Obšilová V, Janoušková H, Obšil T, Teisinger J (2008). **Ionic interactions are essential for TRPV1 C-terminus binding to calmodulin.** Biochem Biophys Res Commun 375:680-683



#### 4.1.5. Diskuze k práci I

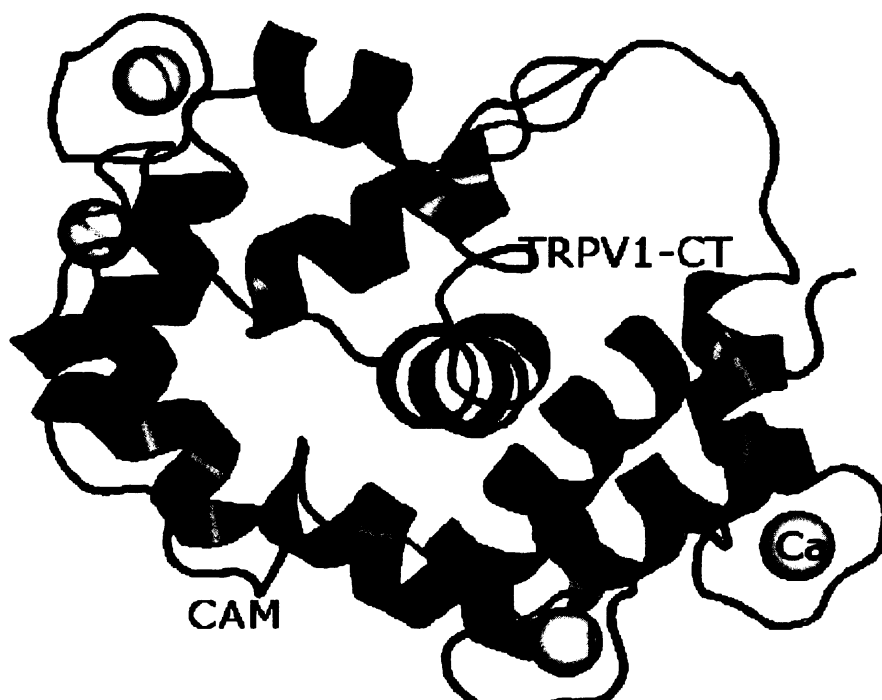
Kalmodulin je důležitým regulátorem řady buněčných procesů a velkou měrou se podílí i na modulaci funkce TRP kanálů (Zhu, 2005). TRPV1, dosud nejvíce prostudovaný zástupce TRP iontových kanálů, je prostřednictvím tohoto  $\text{Ca}^{2+}$  vazebného proteinu desenzitizován. Vazba CaM na 35 aminokyselin dlouhém fragmentu TRPV1 CT byla prokázána roku 2003 (Numazaki et al., 2003), avšak nebyl zde nalezen žádný z běžných CaM vazebných motivů.

Naším cílem byla charakterizace tohoto úseku a odhalení esenciálních aminokyselin, které se podílejí na vazbě TRPV1 CT/CaM a to pomocí bodových mutací a porovnání naměřené anizotropie fluorescence mutantních konstruktů s WT.

Bylo dokázáno, že z devíti bodových mutací bazických a nejdůležitějších hydrofóbních zbytků, čtyři zbytky Leu 777, Arg 778, Arg 781 a Val 782 se nejspíše nepodílejí na vazbě TRPV1/CaM, protože u konstruktů s jejich mutací nebyl zaznamenán signifikantní nárůst disociačních konstant. Naopak zbytky Val 769, Arg 771, Arg 785, Lys 788 a Arg 797 jsou pro vazbu TRPV1/CaM důležité, především pak Arg 785, jehož mutace nejvíce ovlivnila vazbu CaM. Co je zajímavé, že pouze jeden hydrofóbní zbytek byl prokázán jako esenciální pro vazbu CaM.

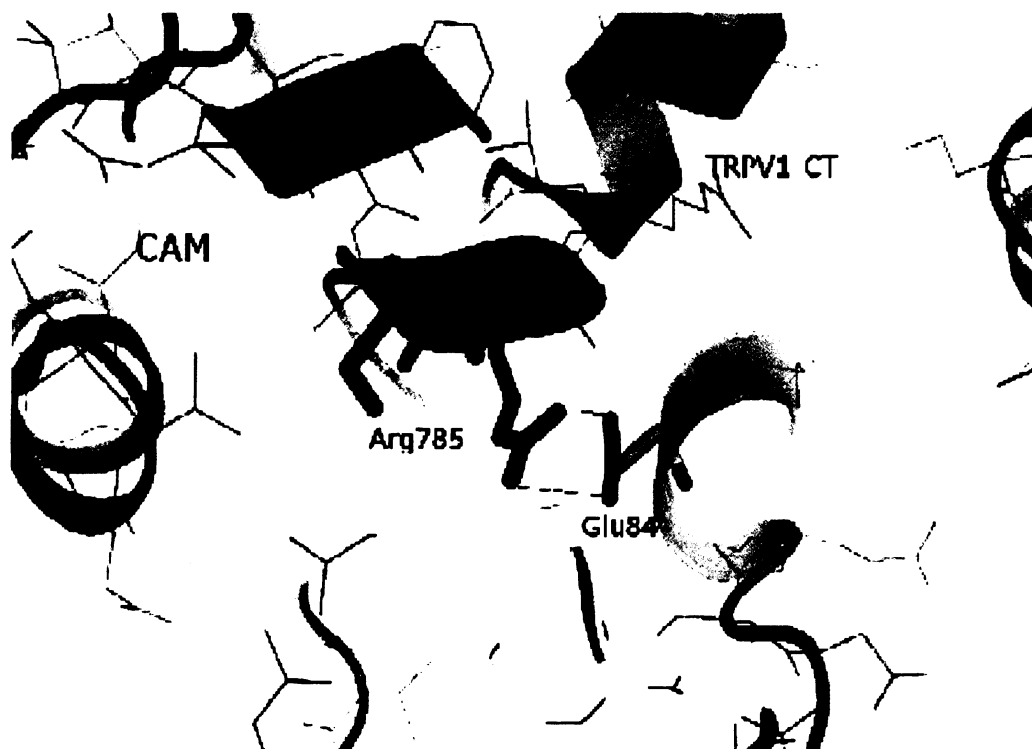
Pro získání představy o interakcích TRPV1/CaM byl naší laboratoří sestaven homologní počítačový model (Obr. 11) (Gryčová et al., 2008). Model kalmodulin vazebného motivu TRPV1 CT byl vytvořen na základě podobnosti se strukturou kinázy lehkého řetězce myozinu (myosin light chain kinase - MLCK) (Ikura et al., 1992) nesoucí 1-8-14 konzervovaný motiv. Tento motiv vykazuje určitou podobnost, není však identický. Na pozici 8 MLCK nese hydrofóbní aminokyselinový zbytek, ten je v případě kalmodulin vazebného motivu TRPV1 nahrazen polárním zbytkem Ser 776.

Typickým rysem kalmodulin vazebné domény je  $\alpha$ -helikální uspořádání, které bylo nalezeno u mnoha kalmodulin vazebných proteinů (Rhoad and Friedberg, 1997). Vytvořený model zaujímá také  $\alpha$ -helikální sekundární strukturu.

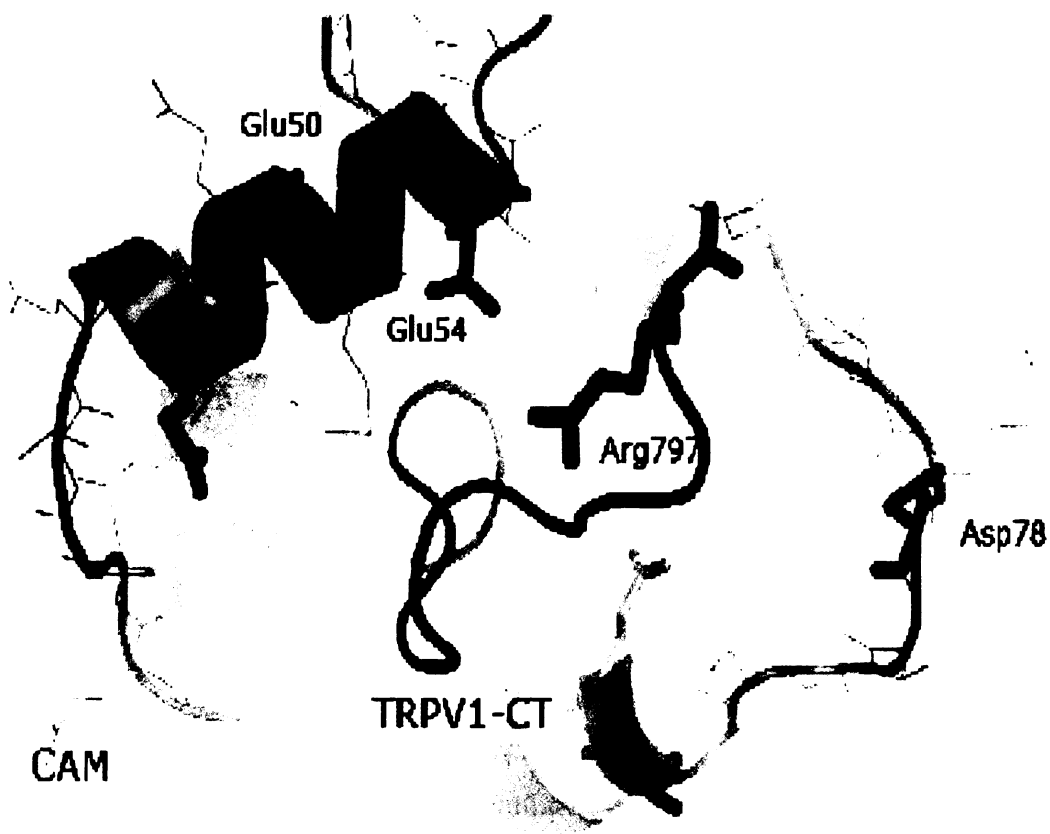


Obr. 11: Homologní počítačový model kalmodulin vazebného motivu TRPV1 CT (fialově) v komplexu s kalmodulinem (zeleně) (Ca<sup>2+</sup> ionty žlutě) (Gryčová et al., 2008)

Měřením anizotropie byly identifikovány aminokyselinové zbytky podílející se na vazebných interakcích TRPV1 CT/CaM. Vytvořený homologní model ukazuje, že bazické zbytky Arg 771, Arg 785, Lys 788 interagují s negativně nabitými aminokyselinovými zbytky Glu 127, Glu 84, Glu 47 v molekule kalmodulinu. Pro vazbu se zdají být klíčové van der Waalsovy interakce Arg 785 a Glu 84 (Obr. 12). V blízkém okolí Arg 797 jsou umístěny dva klastry kyselých aminokyselin kalmodulinu. Arg 797 může interagovat s Glu 50, Glu 54, Asp 78 (Obr. 13). Arg 771 nejspíše vytváří vodíkové vazby s Glu 14 a Ser 11 (kalmodulin). Hydrofóbní Val 769 interaguje podle modelu s Phe 92 (kalmodulin). Mutace Arg 778 a Arg 781 neovlivnila vazbu TRPV1 CT/CaM, což potvrzuje i model, který nepředpokládá žádné specifické polární interakce s kalmodulinem. Na základě těchto poznatků se předpokládá, že kalmodulin interaguje s TRPV1 CT podobně, jak bylo popsáno u MLCK. V případě TRPV1 však hrají významnější roli polární interakce nad hydrofóbními (Gryčová et al., 2008).



Obr. 12: Klíčové van der Waalsovy interakce Arg 785 TRPV1 CT (červeně) s Glu 84 kalmodulinu (modře) (Gryčová et al., 2008)



Obr. 13: Arg 797 TRPV1 CT (fialově) sousedí s dvěma klastry kyselých aminokyselin kalmodulinu (zeleně). Arg 797 může interagovat s Glu 50, Glu 54 či s Asp 78 (Gryčová et al., 2008)

## **4.2. Příprava mutantních konstruktů C-koncového CaM vazebného místa a vazebné studie CaM na N- a C-koncových peptidech TRPM5**

### **4.2.1. Vazebné studie CaM na intracelulárních N- a C-koncích TRPM5**

TRPM5 iontový kanál se podílí na vnímání sladké, hořké a umami chuti (Zhang et al., 2003). Spolu s TRPM4 je to jediný TRP kanál, který je regulován zvýšenou intracelulární koncentrací  $\text{Ca}^{2+}$  iontů a zároveň je pro tyto ionty nepropustný (Hofmann et al., 2003; Liu and Liman, 2003). Podle dostupných informací je TRPM5 kanál v porovnání s jinými receptory aktivován nízkými koncentracemi  $\text{Ca}^{2+}$  iontů. Zda se na tomto mechanismu podílí přímá vazba těchto kationtů na intracelulární část receptoru či dochází k regulaci pomocí nějakého  $\text{Ca}^{2+}$  vazebného proteinu, není objasněno.

Touto otázkou se zabýval Hofmann et al. (2003). Vycházel z faktu, že velký počet TRP kanálů je regulován přes  $\text{Ca}^{2+}$ -vazebný protein kalmodulin. Bylo publikováno, že kalmidazol, inhibitor kalmodulinu, má pouze minoritní efekt na aktivaci TRPM5 a vysoké koncentrace  $\text{Ba}^{2+}$ , usnadňující aktivaci kalmodulinu, nijak neovlivňují aktivaci receptoru. Z těchto výsledků lze soudit, že nejspíše dochází k přímé aktivaci TRPM5 kanálu po zvýšení intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů v cytoplazmě.

I když regulace prostřednictvím kalmodulinu je velmi zajímavou a lákavou odpovědí na otázky ohledně aktivace a modulace funkce iontových kanálů, studie TRPM5 kanálu zatím nijak tuto možnost nepotvrdila. Mnoho vědců přesto předpokládá, že kalmodulin se podílí na regulaci aktivity TRPM5 kanálu. Nebylo zatím publikováno žádné CaM vazebné místo, ale podle dostupných informací o kalmodulin vazebných motivech dle Calmodulin Target Database, byly nalezeny tři pravděpodobné kalmodulin vazebné motivy, jeden na N-konci a dva na C-konci.

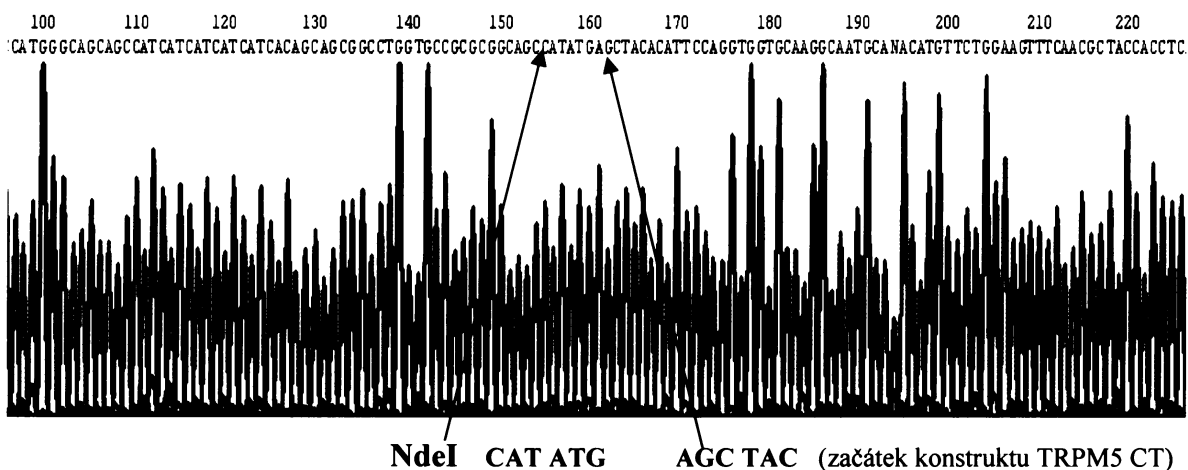
TRPM4 receptor, obsahuje pět kalmodulin vazebných motivů, dvě na N-konci a tři na C-konci (Nilius et al., 2004). Poněvadž TRPM5 kanál s TRPM4 sdílí podobné funkční vlastnosti i velkou sekvenční homologii, můžeme předpokládat, že i TRPM5 receptor obsahuje kalmodulin vazebné motivy, což bylo potvrzeno i výsledky z Calmodulin Target Database.

Pochopení regulace TRPM5 pomocí CaM je v naprostém počátku. Nebyl publikován vliv kalmodulinu ani jeho vazebné motivy. Naším cílem bylo určení lokalizace a charakterizace kalmodulin vazebných motivů pomocí navržených peptidů pravděpodobných kalmodulin vazebných motivů na N- a C-konci TRPM5, příprava mutantních forem C-koncového kalmodulin vazebného místa TRPM5 a následná exprese fúzních proteinů. Vazba kalmodulinu byla detekována pomocí anizotropie fluorescence.

## 4.2.2. Příprava mutantních konstruktů C-koncového CaM vazebného místa

### 4.2.2.1. Ligace TRPM5 C-konce do vektoru

TRPM5 C-konec byl amplifikován metodou PCR s navrženými primery s restrikčními místy BamHI, NdeI pro expresní vektor pET15b a NdeI, XhoI pro expresní vektor pET32b. Po štěpení vektorů stejnými restrikčními enzymy jsme konstrukty zaligovaly do expresních vektorů a správnost ligace ověřili sekvenací (Obr. 14). Pomocí programu *BLAST 2 Sequence* jsme ověřili, zda není konstrukt či vektor nějak porušen či nedošlo k posunu čtecího rámce.



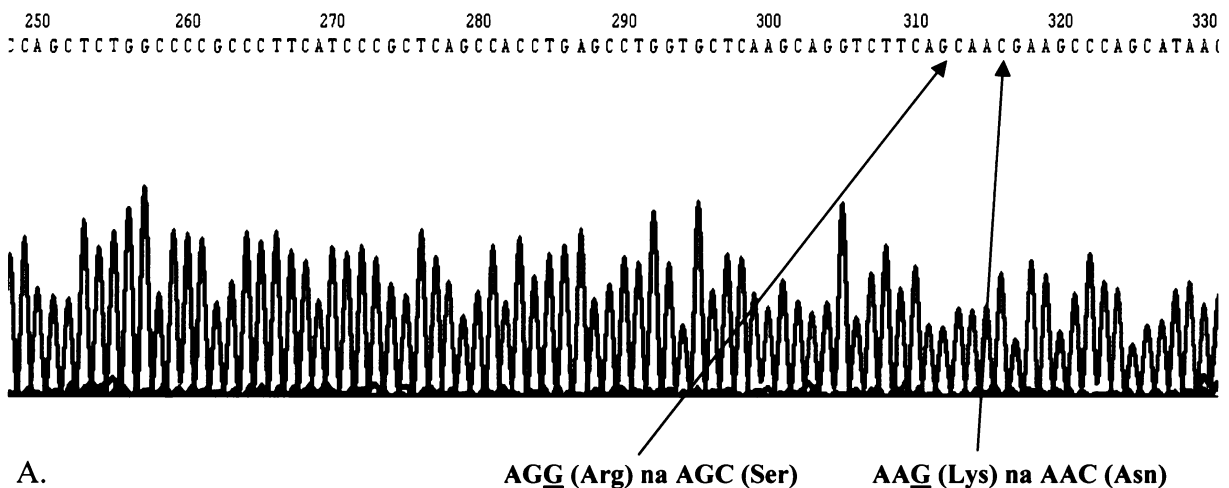
Obr. 14: Ukázka sekvenačních dat v programu *Chromas*, kde šipkou je znázorněno restrikční místo NdeI a správně zaligovaný konstrukt TRPM5 CT v pET15b

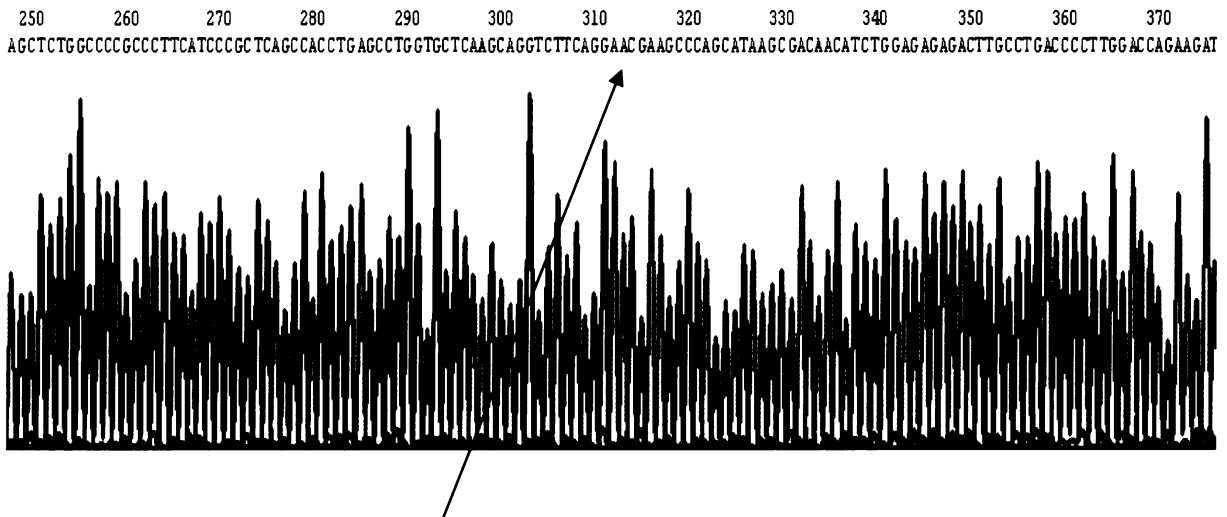
#### 4.2.2.2. Bodové mutace pomocí nukleotid řízené mutagenese

Kalmodulin vazebné místo jsme určili s pomocí Calmodulin Target Database. Fragment H1018-Q1036 byl označen za jedno z nejpravděpodobnějších kalmodulin vazebných míst C-konce TRPM5. Pro charakterizaci CaM vazebného místa bylo navrženo osm mutantních forem CaM místa TRPM5 CT pomocí metody QuickChange (Obr. 15). Podobným způsobem byly vneseny stop kodóny v místě aminokyselin E1073 a G1074, které nezasahují do sekundární struktury proteinu. Všechny konstrukty byly ověřeny v programu *BLAST 2 Sequence* (Obr. 16). Ukázky výsledku zobrazuje Obr. 15 a 16.

##### Mutace CaM vazebného místa TRPM5 CT:

- Lys 1024 Asn (K1024N)
- Gln 1025 Leu (Q1025L)
- Arg 1028 Ser (R1028S)
- Lys 1029 Asn (K1029N)
- Lys 1034 Asn (K1034N)
- Arg 1035 Leu (R1035L)
- Arg 1028 Ser Lys 1029 Asn (R1028SK1029N)
- Lys 1034 Asn Arg 1035 Leu (K1034NR1035L)





B. AAG (Lys) na AAC (Asn)

Obr. 15: A. Ukázka sekvenačních dat v programu *Chromas*, kde Arg 1028 je změněn na Ser a Lys 1029 je změněn na Asn

B. Ukázka sekvenačních dat v programu *Chromas*, kde Lys 1029 je změněn na Asn



A.



```

Query 3103 CACCTGAGCCTGGTGCTCAAGCAGGTCTTCAGGAAGGAAGCCCAGCATAAGCGACAACAT
3162
Sbjct 279 CACCTGAGCCTGGTGCTCAAGCAGGTCTTCAGGAACGAAGCCCAGCATAAGCGACAACAT
338
Query 3163 CTGGAGAGAGACTTGCCTGACCCCTTGGACCAGAGATCATTACCTGGGAAACGGTTCAA
3222
Sbjct 339 CTGGAGAGAGACTTGCCTGACCCCTTGGACCAGAAGATCATTACCTGGGAAACGGTTCAA
398

```

B.

Obr. 16: Srovnání sekvencí TRPM5 WT (horní řádek) s mutantní formou TRPM5 (dolní řádek)

A. Arg 1028 je změněn na Ser a Lys 1029 je změněn na Asn

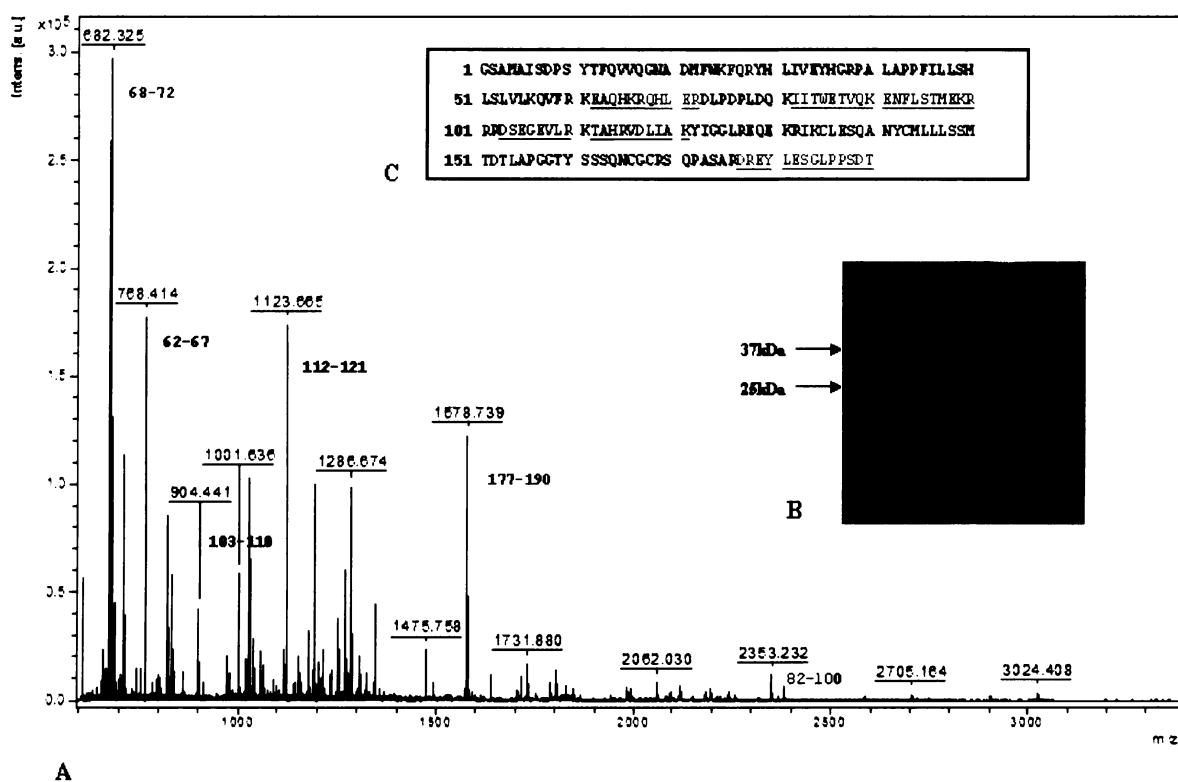
B. Lys 1029 je změněn na Asn

#### 4.2.2.3. Příprava fúzních proteinů TRPM5

TRPM5 CT a jeho mutantní formy byly exprimovány jako fúzní proteiny s histidinovou kotvou na N-konci. Proteiny se dobře exprimovaly (Obr. 17) a netvořily agregáty. Pro úplnou identifikaci jsme fúzní proteiny ověřily metodou Western Blot a MALDI TOF (Obr. 18) (RNDr. Miroslav Šulc PhD., MBÚ AVČR, Laboratoř Charakterizace molekulárních struktur).



Obr.17: Ukázka SDS-PAGE gelu s peptidem C-konce TRPM5, nanášeno sedm frakcí po niklové chromatografii



Obr. 18: MALDI TOF hmotnostního spektrum tryptických peptidů (A) proteinového proužku z SDS-PAGE (B), které potvrdilo přítomnost peptidů konstruktů C-konce TRPM5 s pokrytím sekvence 86% (C). Ostatní signály m/z náležejí tryptickým peptidům proteinu thioredoxinu, který byl v konstruktu exprimován společně s C-koncem TRPM5 jako fúzní protein.

#### 4.2.3. Vazebné studie CaM na N- a C-koncových peptidech TRPM5

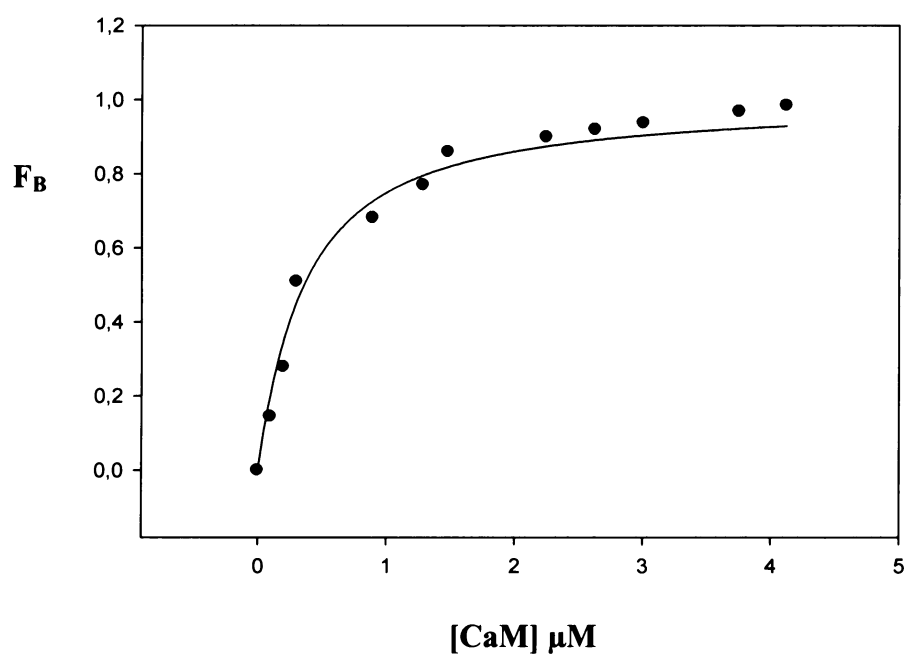
TRPM5 kalmodulin vazebná místa jsme identifikovali na základě výsledků z Calmodulin Target Database. Byly nalezeny tři pravděpodobná místa pro vazbu kalmodulinu, jedno na N-konci a dvě na C-konci TRPM5. Peptidy těchto tří kalmodulin

vazebných míst a mutantní peptidy N-koncového místa byly objednány od firmy GenScript. Všechny peptidy byly označeny na N-konci fluorescenčně FITC. Mutantní formy peptidů byly navrženy na základě již identifikovaných motivů v souladu s pozicí hydrofóbních aminokyselinových zbytků. TRPM5 NT peptid koresponduje s kalmodulin vazebným motivem 1-5-10, TRPM5 CT CaM1 peptid s 1-8-14 motivem a TRPM5 CT CaM2 se nejvíce podobá motivu 1-8 (atypický motiv podobný 1-8-14 motivu) (podle Calmodulin Target Database).

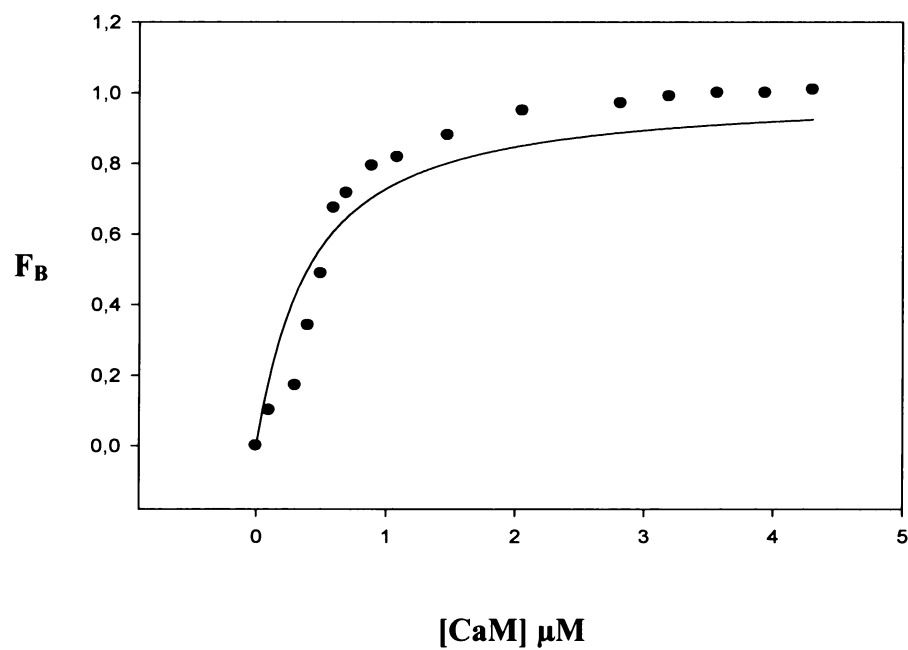
#### **4.2.3.1. Měření vazby CaM pomocí anizotropie fluorescence**

Pomocí měření anizotropie fluorescence jsme identifikovali vazbu kalmodulinu na pravděpodobných kalmodulin vazebných doménách navržených peptidů TRPM5. Do křemenné kyvety s fluorescenčně značeným peptidem jsme titrovali postupně zvyšující se množství kalmodulinu. Byla zaznamenána hodnota anizotropie pro každou koncentraci kalmodulinu. Tyto hodnoty byly použity pro výpočet frakce navázaného kalmodulinu a disociačních konstant pro jednotlivé navržené peptidy. Titrační křivky měření N- a C-koncových peptidů jsou zobrazeny na Obr. 19, 20, 21. Hodnoty disociačních konstant pro jednotlivé peptidy jsou uvedeny v Tab. 2. Hodnoty disociačních konstant pro mutantní peptidy N-koncového kalmodulin vazebného místa TRPM5 NT L84A a TRPM5 NT R89A jsou uvedeny v Tab. 3.

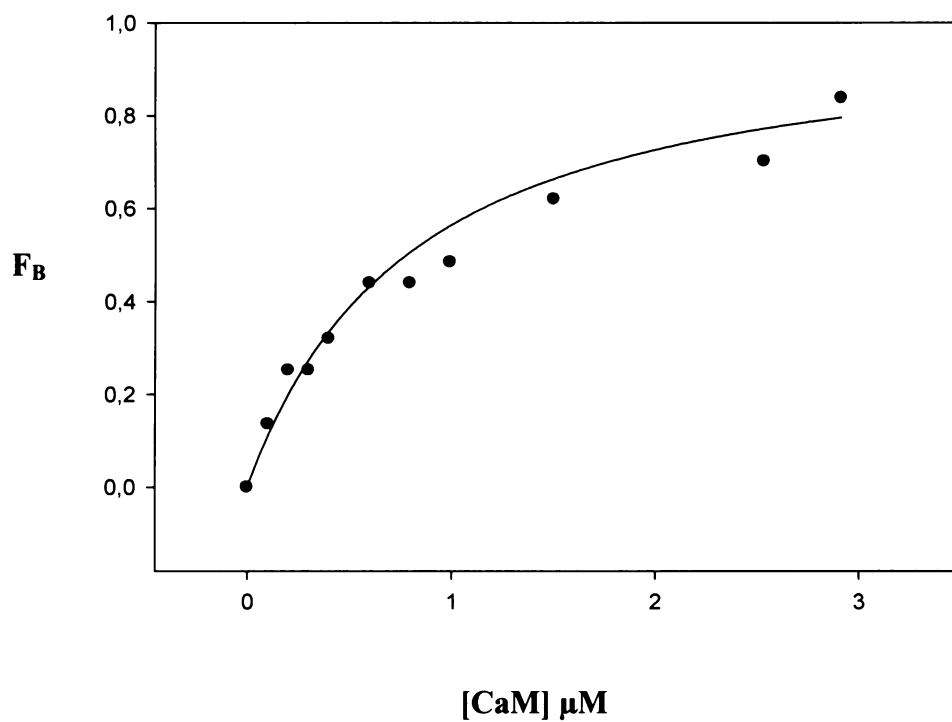
Porovnání hodnot disociačních konstant  $K_D$  mutantních konstruktů TRPM5 NT L84A a TRPM5 NT R89A s WT TRPM5 NT ukazuje, že bodové mutace L84A a R89A nemají vliv na vazbu kalmodulinu.



Obr. 19: Titrační křivka měření fluorescenční anizotropie N-koncového peptidu TRPM5 (R76-T105) (TRPM5 NT CaM)



Obr. 20: Titrační křivka měření fluorescenční anizotropie C-koncového peptidu TRPM5 (V1001-L1038) (TRPM5 CT CaM1)



Obr. 21: Titrační křivka měření fluorescenční anizotropie C-koncového peptidu TRPM5 (G1074-Q1097) (TRPM5 CT CaM2)

Peptid	Disociační konstanta $[\mu M]$
TRPM5 NT CaM	$0,39 \pm 0,05$
TRPM5 CT CaM1	$0,29 \pm 0,05$
TRPM5 CT CaM2	$0,65 \pm 0,10$

Tab. 2: Tabulka hodnot disociačních konstant pro N- a C-koncové peptidy TRPM5

Peptid	Disociační konstanta [ $\mu\text{M}$ ]
TRPM5 NT WT	$0,39 \pm 0,05$
TRPM5 NT L84A	$0,35 \pm 0,05$
TRPM5 NT R89A	$0,40 \pm 0,05$

Tab. 3: Tabulka hodnot disociačních konstant pro WT TRPM5 NT a mutantní peptidy TRPM5 NT L84A a TRPM5 NT R89A

#### 4.2.4. Diskuze k práci II

TRPM5 iontový kanál se podílí na vnímání sladké, hořké a umami chuti (Zhang et al., 2003). Patří mezi TRP kanály, které jsou regulovány zvýšenou intracelulární koncentrací  $\text{Ca}^{2+}$  iontů (Hofmann et al., 2003; Liu and Liman, 2003). Na mechanismu aktivace se může podílet přímá vazba těchto kationtů na intracelulární části receptoru či může docházet k regulaci receptoru pomocí nějakého  $\text{Ca}^{2+}$  vazebného proteinu.

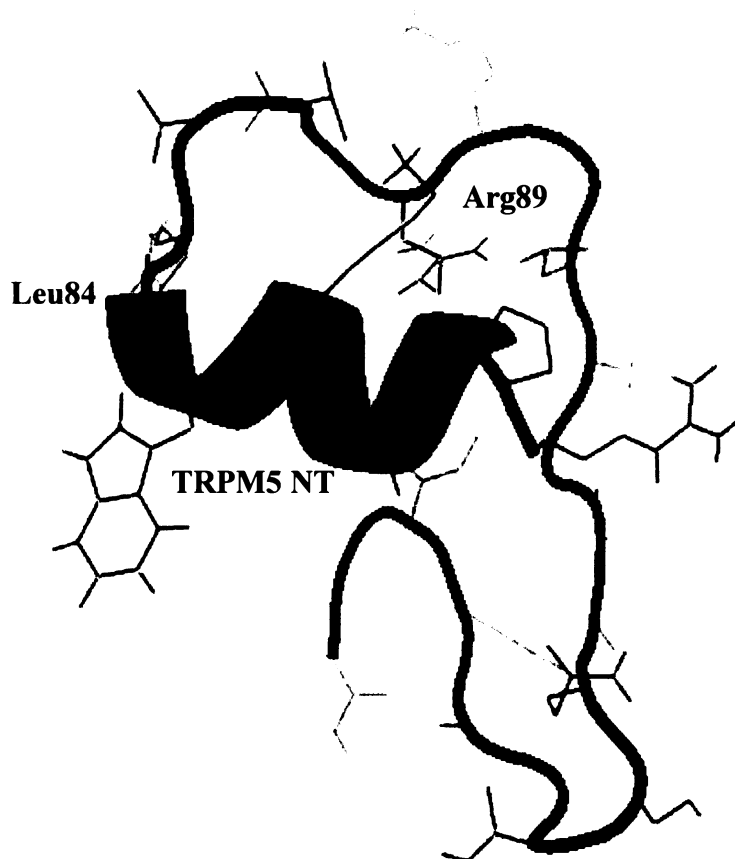
Moje diplomová práce je součástí projektu, kterým je identifikace kalmodulin vazebných míst a charakterizace aminokyselin důležitých pro vazbu kalmodulinu na intracelulárních koncích TRPM5.

Zatím nebyla publikována lokalizace žádného kalmodulin vazebného místa TRPM5. Podle dostupných informací o kalmodulin vazebných motivech dle Calmodulin Target Database TRPM5 obsahuje tři vazebné motivy pro kalmodulin, jeden na N-konci a dva na C-konci. Naše výsledky z měření anizotropie fluorescence tento předpoklad potvrzují. Všechny tři pravděpodobná místa TRPM5 váží signifikantně kalmodulin. Dle hodnot disociačních konstant je zřejmé, že kalmodulin se váže nejlépe na C-intracelulárním konci CaM1 (V1001-L1038) TRPM5. Disociační hodnoty ostatních kalmodulin vazebných motivů nejsou signifikantně odlišné, proto usuzujeme, že vazebná schopnost všech třech vazebných míst je podobná.

Mutantní peptidy ke každému ze tří kalmodulin vazebných motivů byly navrženy na základě již identifikovaných motivů v souladu s pozicí hydrofóbních aminokyselinových zbytků. TRPM5 NT peptid koresponduje s kalmodulin vazebným motivem 1-5-10, TRPM5 CT CaM1 peptid s 1-8-14 motivem a TRPM5 CT CaM2 se nejvíce podobá motivu 1-8 (atypický motiv podobný 1-8-14 motivu) (podle Calmodulin Target Database). Naše výsledky ukazují, že bodové mutace L84A a R89A N-koncového kalmodulin vazebného místa nemají vliv na vazbu kalmodulinu.

Naší laboratoří byl sestaven homologní počítačový model (program *Modeller*) kalmodulin vazebného místa TRPM5 na N-konci. Model kalmodulin vazebného motivu TRPM5 NT byl vytvořen na základě podobnosti se strukturou ankyrinové domény myšího TRPV6 (Phelps et al., 2008) (Obr. 22). Typickým rysem kalmodulin vazebné domény je  $\alpha$ -helikální uspořádání, které bylo nalezeno u mnoha kalmodulin vazebných proteinů (Rhoad and Friedberg, 1997). Vytvořený model zaujímá z části také  $\alpha$ -helikální strukturu. Mutované aminokyseliny L84A a R89A, které podle výsledků disociačních konstant

nemají vliv na vazbu kalmodulinu, nejsou lokalizovány podle našeho modelu v  $\alpha$ -helikální struktuře (Leu84 na konci  $\alpha$  helixu), možná právě proto jejich mutace neovlivňují vazbu kalmodulinu. Toto je pouhý předpoklad, pro další závěry je nutné, aby byly charakterizovány i ostatní aminokyseliny, které jsou umístěny v  $\alpha$ -helikální struktuře i v jejím okolí.



Obr. 22: Homologní počítačový model kalmodulin vazebného motivu TRPM5 NT (zeleně) s vyznačenou lokalizací mutovaných aminokyselin Leu 84, Arg 89 (červeně)

Fragment H1018-Q1036 (C-konec) byl označen Calmodulin Target Database za nejpravděpodobnější kalmodulin vazebné místo TRPM5, což bylo našimi výsledky potvrzeno. Pomocí mutagenese jsme vytvořili osm mutantních forem tohoto místa a dostatečné množství fúzních proteinů, které budou v rámci našeho projektu dále



analyzovány pomocí měření anizotropie fluorescence. Budou charakterizovány i mutantní peptidy zbývajících kalmodulin vazebných míst.

Bylo publikováno, že TRPM5 je přímo aktivován zvýšenou koncentrací intracelulárních  $\text{Ca}^{2+}$  kationů (Hofmann et al., 2003; Liu and Liman, 2003), naše práce navíc odhalila možnost vazby kalmodulinu. Možnost regulace pomocí tohoto proteinu byla mnoha autory diskutována a však nikdy plně potvrzena (Hofmann et al., 2003; Nilius et al., 2004; Pedersen et al., 2005). Do jaké míry je aktivace TRPM5 ovlivněna přímou vazbou  $\text{Ca}^{2+}$  kationtů či vazbou kalmodulinu na receptor není prozatím objasněno.

## 5. SOUHRN

Charakterizovali jsme 35 aminokyselin dlouhý segment C-konce TRPV1 receptoru, který interaguje s kalmodulinem. Tato oblast zaujímá  $\alpha$ -helikální sekundární strukturu.

Identifikovali jsme atypický kalmodulin vazebný motiv TRPV1. Na vazbě kalmodulinu na TRPV1 se podílejí aminokyselinové zbytky Val 769, Arg 771, Arg 785, Lys 788 a Arg 797. Nejdůležitějším zbytkem pro interakci kalmodulinu s receptorem je Arg 785, jehož mutace nejvíce ovlivnila vazbu CaM. Pouze jeden jediný hydrofóbní zbytek byl prokázán jako esenciální pro vazbu CaM.

Připravili jsme osm mutantních forem kalmodulin vazebného místa C-konce (H1018-Q1036) pomocí mutagenese řízené oligonukleotidem a vytvořili jsme dostatečné množství fúzních proteinů pro měření vazby kalmodulinu pomocí anizotropie fluorescence.

Identifikovali jsme kalmodulin vazebná místa receptoru TRPM5. Receptor obsahuje jedno CaM vazebné místo na N- konci (R76-T105) a dvě na C-intracelulárním konci (V1001-L1038 a G1074-Q1097). Podle hodnot disociačních konstant je zřejmé, že kalmodulin se váže nejlépe na C-intracelulárním konci V1001-L1038.

Bodové mutace L84A a R89A kalmodulin vazebného místa na N-konci (R76-T105) nemají vliv na vazbu kalmodulinu.

## 6. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

Ahern GP (2003). Activation of TRPV1 by the satiety factor oleoylethanolamide. *J Biol Chem* 278:30429–30434

Ahern GP, Brooks IM, Miyares RL, Wang XB (2005). Extracellular cations sensitize and gate capsaicin receptor TRPV1 modulating pain signaling. *J Neurosci* 25:5109–5116

Babes A, Amuzescu B, Krause U, Scholz A, Flonta ML, Reid G (2002). Cooling inhibits capsaicin-induced currents in cultured rat dorsal root ganglion neurones. *Neurosci Lett* 317:131–134

Bandell M, Dubin AE, Petrus MJ, Orth A, Mathur J, Hwang SW, Patapoutian A (2006). High-throughput random mutagenesis screen reveals TRPM8 residues specifically required for activation by menthol. *Nat Neurosci* 9:493-500

Benedikt J, Vyklický L, Toušová K, Vlachová V (2005). TRP ion channels: Molecular sensors in the nervous system. *Psychiatrie Suppl* 3:6-11

Bezencon C, le Coutre J, Damak S (2007). Taste-signaling proteins are coexpressed in solitary intestinal epithelial cells. *Chem Senses* 32:41-49

Bhave G, Hu HJ, Glauner KS, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS, Gereau RW 4th (2003). Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proc Natl Acad Sci USA* 100:12480–12485

Bhave G, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS, Gereau RW 4th (2002). cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. *Neuron* 35:721–731

Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288:306-313

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816-824

Cesare P, Moriondo A, Vellani V, McNaughton PA (1999). Ion channels gated by heat. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:7658-7663

Cheney RE, Mooseker MS (1992). Unconventional myosins. *Curr Opin Cell Biol* 4:27-35

Chou MZ, Mtui T, Gao YD, Kohler M, Middleton RE (2004). Resiniferatoxin binds to the capsaicin receptor (TRPV1) near the extracellular side of the S4 transmembrane domain. *Biochemistry* 43: 2501–2511

Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI, Chao MV, Julius D (2001). Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from Ptd(4,5)P<sub>2</sub> mediated inhibition. *Nature* 411:957-962

Clapham DE (1995). Calcium signaling. *Cell* 80:259-268

Clapham DE (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426:517-524

Cosens DJ, Manning A (1969). Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 224:285–287

Crivici A, Ikura M (1995). Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 24:85-116

Damann N, Voets T, Nilius B (2008). TRPs in our senses. *Curr Biol* 18:880-889

Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, Hughes SA, Rance K, Grau E, Harper AJ, Pugh PL, Rogers

DC, Bingham S, Randall A, Sheardown SA (2000). Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405:183-187

Dawbarn D, Harmar AJ, Pycock CJ (1981). Intranigral injection of capsaicin enhances motor activity and depletes nigral 5-hydroxytryptamine but not substance P. *Neuropharmacology* 20:341-346

Denker SP, Barber DL (2002). Ion transport proteins anchor and regulate the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 14:214-220

Docherty RJ, Yeats JC, Bevan S, Boddeke HW (1996). Inhibition of calcineurin inhibits the desensitization of capsaicin evoked currents in cultured dorsal root ganglion neurones from adult rats. *Pflugers Arch* 431:828-837

Engelke M, Friedrich O, Budde P, Schafer C, Niemann U, Zitt C, Jungling E, Rocks O, Luckhoff A, Frey J (2002). Structural domains required for channel function of the mouse transient receptor potential protein homologue TRP1beta. *FEBS Lett* 523:193-199

Enklaar T, Esswein M, Oswald M, Hilbert K, Winterpacht A, Higgins M, Zabel B, Prawitt D (2000). Mtr1, a novel biallelically expressed gene in the center of the mouse distal chromosome 7 imprinting cluster, is a member of the Trp gene family. *Genomics* 67:179-187

Estacion M, Sinkins WG, Schilling WP (2001). Regulation of *Drosophila* transient receptor potential-like (TrpL) channels by phospholipase C-dependent mechanisms. *J Physiol* 530:1-19

Ferguson KM, Lemmon MA, Schlessinger J, Sigler PB (1995). Structure of the high affinity complex of inositol trisphosphate with a phospholipase C pleckstrin homology domain. *Cell* 83:1037-1046

Fonfria E, Murdock PR, Cusdin FS, Benham CD, Kelsell RE, McNulty S (2006). Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family. *J Recept Signal Transduct Res.* 26:159-178

Garcia-Martinez C, Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, Merino JM, Ferrer-Montiel A (2000). Identification of an aspartic residue in the P-loop of the vanilloid receptor that modulates pore properties. *J Biol Chem* 275:32552–32558

Garcia-Sanz N, Fernandez-Carvajal A, Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, Fajardo-Sanchez E, Fernandez-Ballester G, Ferrer-Montiel A (2004). Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor. *J Neurosci* 24:5307-5314

Gavva NR, Bannon AW, Surapaneni S, Hovland DN Jr, Lehto SG, Gore A, Juan T, Deng H, Han B, Klionsky L, Kuang R, Le A, Tamir R, Wang J, Youngblood B, Zhu D, Norman MH, Magal E, Treanor JJ, Luis JC (2007). The vanilloid receptor TRPV1 is tonically activated in vivo and involved in body temperature regulation. *J Neurosci* 27:3366-3374.

Gavva NR, Klionsky L, Qu Y, Shi L, Tamir R, Edenson S, Zhang TJ, Viswanadhan VN, Toth A, Pearce LV, Vanderah TW, Porreca F, Blumberg PM, Lile J, Sun Y, Wild K, Luis JC, Treanor JJ (2004). Molecular determinants of vanilloid sensitivity in TRPV1. *J Biol Chem* 279:20283–20295

Gilbert D, Funk K, Dekowski B, Lechler R, Keller S, Mohrlen F, Frings S, Hagen V (2007). Caged capsaicins: New tools for the examination of TRPV1 channels in somatosensory neurons. *Chembiochem* 8:89-97

Gordon SA, Zagotta WN, Gordon SE (2008). Mechanism of Ca<sup>2+</sup>-dependent desensitization in TRP channels. *Channels* 16:125-129

Grimm C, Kraft R, Sauerbruch S, Schultz G, Harteneck C (2003). Molecular and functional characterization of the melastatin-related cation channel TRPM3. *J Biol Chem* 278:21493-21501

Gryčová L, Lánský Z, Friedlová E, Obšilová V, Janoušková H, Obšil T, Teisinger J (2008). Ionic interactions are essentials for TRPV1 C-terminus binding to calmodulin. *Biochem Biophys Res Commun* 375:680-683

Gwanyanya A, Sipido KR, Vereecke J, Mubagwa K (2006). ATP and PIP2 dependence of the magnesium-inhibited, TRPM7-like cation channel in cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 291:627-635

Hellwig N, Albrecht N, Harteneck C, Schultz G, Schaefer M (2005). Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits. *J Cell Sci* 118:917-928

Hofmann T, Chubanov V, Gudermann T, Montell C (2003). TRPM5 is a voltage-modulated and Ca(2+)-activated monovalent selective cation channel. *Curr Biol* 13:1153-1158

Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, Tognetto M, Petros TJ, Krey JF, Chu CJ, Miller JD, Davies SN, Geppetti P, Walker JM, Di Marzo V (2002). An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:8400–8405

Hwang SW, Cho H, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Jung J, Cho S, Min KH, Suh YG, Kim D, Oh U (2000). Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6155–6160

Ikura, M (1996). Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *Trends Biochem Sci* 21:14-17.

Ikura M, Clore GM, Gronenborn AM, Zhu G, Klee CB, Bax A (1992). Solution structure of a calmodulin-target peptide complex by multidimensional NMR. *Science* 256:632-638.

Inoue K, Koizumi S, Fuziwara S, Denda S, Denda M (2002). Functional vanilloid receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 291:124-129

Jahnel R, Dreger M, Gillen C, Bender O, Kurreck J, Hucho F (2001). Biochemical characterization of the vanilloid receptor 1 expressed in a dorsal root ganglia derived cell line. *Eur J Biochem* 268:5489–5496

Jia Y, McLeod RL, Hey JA (2005). TRPV1 receptor: a target for the treatment of pain, cough, airway disease and urinary incontinence. *Drug News Perspect* 18:165–171

Jin X, Touhey J, Gaudet R (2006). Structure of the N-terminal ankyrin repeat domain of the TRPV2 ion channel. *J Biol Chem* 281:25006-25010

Jordt SE, Julius D (2002). Molecular basis for species-specific sensitivity to “hot” chili peppers. *Cell* 108:421–430

Jordt SE, McKemy DD, Julius D (2003). Lessons from peppers and peppermint: the molecular logic of thermosensation. *Curr Opin Neurobiol* 13:487–492

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

Jung J, Lee SY, Hwang SW, Cho H, Shin J, Kang YS, Kim S, Oh U (2002). Agonist recognition sites in the cytosolic tails of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem* 277: 44448-44454

Jung J, Shin JS, Lee SY, Hwang SW, Koo J, Cho H, Oh U (2004). Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. *J Biol Chem* 279:7048–7054

Kwak J, Wang MH, Hwang SW, Kim TY, Lee SY, Oh U (2000). Intracellular ATP increases capsaicin-activated channel activity by interacting with nucleotide-binding domains. *J Neurosci* 20: 8298-8304

Launay P, Fleig A, Perraud AL, Scharenberg AM, Penner R, Kinet JP (2002). TRPM4 is a Ca<sup>2+</sup>-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. *Cell* 109:397-407



Lee J, Cha SK, Sun TJ, Huang CL (2005). PIP<sub>2</sub> activates TRPV5 and releases its inhibition by intracellular Mg<sup>2+</sup>. *J Gen Physiol* 126:439-451

Lee N, Chen J, Sun L, Wu S, Gray KR, Rich A, Huang M, Lin JH, Feder JN, Janovitz EB, Levesque PC, Blonar MA (2003). Expression and characterization of human transient receptor potential melastatin 3. *J Biol Chem* 278:20890-20897

Liapi A, Wood JN (2005). Extensive co-localization and heteromultimer formation of the vanilloid receptor-like protein TRPV2 and the capsaicin receptor TRPV1 in the adult rat cerebral cortex. *Eur J Neurosci* 22:825-834

Li SW, Westwick J, Poll CT (2002). Receptor-operated Ca<sup>2+</sup> influx channels in leukocytes: a therapeutic target? *Trends Pharmacol Sci* 23:63-70

Liman ER (2007). TRPM5 and taste transduction. *Handb Exp Pharmacol* 179:287-298

Lishko PV, Procko E, Jin X, Phelps CB, Gaudet R (2007). The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron* 54:905-918

Liu B, Qin F (2005). Functional control of cold- and menthol-sensitive TRPM8 ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Neurosci* 25:1674-1681

Liu D, Liman ER (2003). Intracellular Ca<sup>2+</sup> and the phospholipid PIP<sub>2</sub> regulate the taste transduction ion channel TRPM5. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:15160-15165

Liu D, Zhang Z, Liman ER (2005). Extracellular acid block and acid-enhanced inactivation of the Ca<sup>2+</sup>-activated cation channel TRPM5 involve residues in the S3-S4 and S5-S6 extracellular domains. *J Biol Chem* 280:20691-20699

Lopshire JC, Nicol GD (1998). The camp transduction cascade mediates the prostaglandin E2 enhancement of the capsaicin-elicited current in rat sensory neurons: whole cell and single-channel studies. *J Neurosci* 18:6081-6092

Mandadi S, Numazaki M, Tominaga M, Bhat MB, Armati PJ, Roufogalis BD (2004). Activation of protein kinase C reverses capsaicin-induced calcium-dependent desensitization of TRPV1 ion channels. *Cell Calcium* 35:471–478

Macpherson LJ, Geierstanger BH, Viswanath V, Bandell M, Eid SR, Hwang S, Patapoutian A (2005). The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. *Curr Biol* 15:929-934

McCleverty CJ, Koesema E, Patapoutian A, Lesley SA, Kreusch A (2006). Crystal structure of the human TRPV2 channel ankyrin repeat domain. *Protein Sci* 15:2201-2206

McKemy DD, Neuhauser WM, Julius D (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416:52-58

McLatchie LM, Bevan S (2001). The effects of pH on the interaction between capsaicin and the vanilloid receptor in rat dorsal root ganglia neurons. *Br J Pharmacol* 132:899-908

McLaughlin S, Murray D (2005). Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature* 438:605-611

Mohapatra DP, Nau C (2003). Desensitization of capsaicin activated currents in the vanilloid receptor TRPV1 is decreased by the cyclic AMP-dependent protein kinase pathway. *J Biol Chem* 278:50080–50090

Monteilh-Zoller MK, Hermosura MC, Nadler MJ, Scharenberg AM, Penner R, Fleig A (2003). TRPM7 provides an ion channel mechanism for cellular entry of trace metal ions. *J Gen Physiol* 121:49-60

Montell C (2005). The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* 2005:re3

Montell C, Rubin GM (1989). Molecular characterization of the *Drosophila trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2:1313–1323

Moran MM, Xu H, Clapham DE (2004). TRP ion channels in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 14:362-369

Nilius B, Mahieu F, Prenen J, Janssens A, Owsianik G, Vennekens R, Voets T (2006). The Ca<sup>2+</sup>-activated cation channel TRPM4 is regulated by phosphatidylinositol 4,5-biphosphate. *EMBO J* 25:467-478

Nilius B, Prenen J, Droogmans G, Voets T, Vennekens R, Freichel M, Wissenbach U, Flockerzi V (2003). Voltage dependence of the Ca<sup>2+</sup>-activated cation channel TRPM4. *J Biol Chem* 278:30813-30820

Nilius B, Prenen J, Tang J, Wang C, Owsianik G, Janssens A, Voets T, Zhu MX (2004). Regulation of the Ca<sup>2+</sup> sensitivity of the nonselective cation channel TRPM4. *J Biol Chem* 280:6423-6433

Nilius B, Talavera K, Owsianik G, Prenen J, Droogmans G, Voets T (2005). Gating of TRP channels: a voltage connection? *J Physiol* 567:35-44

Numazaki M, Tominaga T, Takeuchi K, Murayama N, Toyooka H, Tominaga M (2003). Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8002–8006

Numazaki M, Tominaga T, Toyooka H, Tominaga M (2002). Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase C and identification of two target serine residues. *J Biol Chem* 277:13375–13378

Patapoutian A, Peier AM, Story GM, Viswanath V (2003). ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat Rev Neurosci* 4:529-539

Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B (2005). TRP channels: An overview. *Cell Calcium* 38:233-252

Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A (2002). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 108:705-715

Perez CA, Huang L, Rong M, Kozak JA, Preuss AK, Zhang H, Max M, Margolskee RF (2002). A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells. *Nat Neurosci* 5:1169-1176

Phelps CB, Huang RJ, Lishko PV, Wang RR, Gaudet R (2008). Structural analyses of the ankyrin repeat domain of TRPV6 and related TRPV ion channels. *Biochemistry* 47: 2476-2484

Phillips A, Bull A, Kelly LE (1992). Identification of a *Drosophila* gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the *trp* phototransduction gene. *Neuron* 8: 631-642

Phillips E, Reeve A, Bevan S, McIntyre P (2004). Identification of species-specific determinants of the action of the antagonist capsazepine and the agonist PPAHV on TRPV1. *J Biol Chem* 279:17165–17172

Pingle SC, Matta JA, Ahern GP (2007). Capsaicin receptor: TRPV1 a promiscuous TRP channel. *Handb Exp Pharmacol* 179:155-171

Prawitt D, Enklaar T, Klemm G, Gartner B, Spangenberg C, Winterpacht A, Higgins M, Pelletier J, Zabel B (2000). Identification and characterization of MTR1, a novel gene with homology to melastatin (MLSN1) and the *trp* gene family located in the BWS-WT2 critical region on chromosome 11p15.5 and showing allele-specific expression. *Hum Mol Genet* 9:203-216

Prawitt D, Monteilh-Zoller MK, Brixel L, Spangenberg C, Zabel B, Fleig A, Penner R (2003). TRPM5 is a transient Ca<sup>2+</sup>-activated cation channel responding to rapid changes in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:15166-15171

Premkumar LS, Qi ZH, Van Buren J, Raisinghani M (2004). Enhancement of potency and efficacy of NADA by PKC mediated phosphorylation of vanilloid receptor. *J Neurophysiol* 91:1442–1449

Ramsey IS, Delling M, Clapham DE (2006). An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol* 68:619-647

Rathee PK, Distler C, Obreja O, Neuhuber W, Wang GK, Wang SY, Nau C, Kress M (2002). PKA/AKAP/VR-1 module: A common link of Gs-mediated signaling to thermal hyperalgesia. *J Neurosci* 22:4740–4745

Rhoads AR, Friedberg F (1997). Sequence motifs for calmodulin recognition. *FASEB J* 11:331-340

Rohacs T (2007). Regulation of TRP channels by PIP<sub>2</sub>. *Pflugers Arch* 453:753-762

Rohacs T, Lopes CM, Michailidis I, Logothetis DE (2005). PIP<sub>2</sub> regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat Neurosci* 8:626-634

Rosenbaum T, Gordon-Shaag A, Munari M, Gordon SE (2004). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin. *J Gen Physiol* 123:53–62

Ross RA (2003). Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol* 140:790-801

Runnels LW, Yue L, Clapham DE (2002). The TRPM7 channel is inactivated by PIP<sub>2</sub> hydrolysis. *Nat Cell Biol* 4:329-336

Schiffman SS, Sattely-Miller EA, Graham BG, Bennett JL, Booth BJ, Desai N, Bishay I (2000). Effect of temperature, pH, and ions on sweet taste. *Physiol Behav* 68:469-481

Sedwick SG, Smargon SJ (1999). The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem Sci* 24:311-316

Smith JA, Davis CL, Burgess GM (2000). Prostaglandin E2-induced sensitization of bradykinin-evoked responses in rat dorsal root ganglion neuron is mediated by cAMP-dependent protein kinase A. *Eur J Neurosci* 12:3250-3258

Smith GD, Gunthorpe MJ, Kelsell RE, Hayes PD, Reilly P, Facer P, Wright JE, Jerman JC, Walhin JP, Ooi L, Egerton J, Charles KJ, Smart D, Randall AD, Anand P, Davis JB (2002). TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature* 418:186–190

Sugiura T, Tominaga M, Katsuya H, Mizumura K (2002). Bradykinin lowers the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1. *J Neurophysiol* 88:544–548

Szallasi A, Blumberg PM, Annicelli LL, Krause JE, Cortright DN (1999). The cloned rat vanilloid receptor VR1 mediates both R-type binding and C-type calcium response in dorsal root ganglion neurons. *Mol Pharmacol* 56:581–587

Talavera K, Yasumatsu K, Voets T, Droogmans G, Shigemura N, Ninomiya Y, Margolskee RF, Nilius B (2005). Heat activation of TRPM5 underlies thermal sensitivity of sweet taste. *Nature* 438:1022-1025

Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D (1998). The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21:531–543

Tominaga M, Tominaga T (2005). Structure and function of TRPV1. *Pflugers Arch* 451:143–150

Tominaga M, Wada M, Masu M (2001). Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6951–6956

Toušová K, Vyklický L, Sušánková K, Benedikt J, Vlachová V (2005). Gadolinium activates and sensitizes the vanilloid receptor TRPV1 through the external protonation sites. *Mol Cell Neurosci* 30:207–217

Trost C, Marquart A, Zimmer S, Philipp S, Cavalie A, Flockerzi V (1999). Ca<sup>2+</sup>-dependent interaction of the trpl cation channel and calmodulin. *FEBS Lett* 451:257-263

Varnai P, Rother KI, Balla T (1999). Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent membrane association of the Bruton's tyrosine kinase pleckstrin homology domain visualized in single living cells. *J Biol Chem* 274:10983-10989

Vass Z, Nuttall AL, Coleman JK, Miller JM (1995). Capsaicin-induced release of substance P increases cochlear blood flow in the guinea pig. *Hear Res* 89:86–92

Vellani V, Mapplebeck S, Moriondo A, Davis JB, McNaughton PA (2001). Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *J Physiol* 534:813-825

Vetter SW, Leclerc E (2003). Novel aspects of calmodulin target recognition and activation. *Eur J Biochem* 270:404-414

Vyklický L, Lyfenko A, Kuffler DP, Vlachová V (2003). Vanilloid receptor TRPV1 is not activated by vanilloids applied intracellularly. *Neuroreport* 14:1061-1065

Walker RG, Willingham AT, Zuker CS (2000). A *Drosophila* mechanosensory transduction channel. *Science* 287:2229-2234

Wang C, Hu HZ, Colton CK, Wood JD, Zhu MX (2004). An alternative splicing product of the murine trpv1 gene dominant negatively modulates the activity of TRPV1 channels. *J Biol Chem* 279:37423–37430

Wang H, Woolf CJ (2005). Pain TRPs. *Neuron* 46:9-12

Welch JM, Simon SA, Reinhart PH (2000). The activation mechanism of rat vanilloid receptor 1 by capsaicin involves the pore domain and differs from the activation by either acid or heat. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:13889–13894

Xu H, Blair NT, Clapham DE (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 XZ, Moebius F, Gill DL, Montell C (2001). Regulation of melastatin, a TRP-related protein, through interaction with a cytoplasmic isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10692-10697

Yap KL, Kim J, Truong K, Sherman M, Yuan T, Ikura M (2000). Calmodulin target database. *J Struct Funct Genomics* 1:8-14

Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Mueller KL, Cook B, Wu D, Zuker CS, Ryba NJ (2003). Coding of sweet, bitter and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* 112:293-301

Zhang Z, Okawa H, Wang Y, Liman ER (2005). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate rescues TRPM4 channels from desensitization. *J Biol Chem* 280:39185-39192

Zhang Z, Zhao Z, Margolskee R, Liman E (2007). The transduction channel TRPM5 is gated by intracellular calcium in taste cells. *J Neurosci* 27:5777-5786

Zhu X (2005). Multiple roles of calmodulin and other Ca<sup>2+</sup>-binding proteins in the functional regulation of TRP channels. *Pflungers Arch* 451:105-115

Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D, Hogestatt ED (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400:452s-457