

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta  
Katedra fyziologie živočichů



Bakalářská práce

**Mechanismy aktivace iontových kanálů na primárních  
aferentních senzoričkých neuronech**

Filip Touška

Školitel: RNDr. Viktorie Vlachová, DrSc.

Praha, 2008

## **Abstrakt**

Iontové kanály zajišťující převod vnějších podnětů různých modalit na elektrickou aktivitu neuronů jsou důležitou součástí sensorického systému, který informuje organismus o aktuálním stavu vnějšího prostředí a umožňuje jim čelit případnému nebezpečí. Molekulárně biologické techniky teprve v nedávné době umožnily studovat funkci těchto specializovaných proteinů ve vztahu k jejich struktuře a poznat tak jejich fyziologickou úlohu a možnosti jejich farmakologického ovlivnění. Cílem práce je formou literární rešerše zpracovat souhrnný přehled současných poznatků o funkčních a strukturálních vlastnostech iontových kanálů, jež jsou specificky aktivovány sensorickými podněty různých modalit (teplo, chlad, tlak, algogenní látky), a uvést tyto poznatky v souvislost s novými možnostmi využití elektrofyziologických, molekulárně biologických a fluorescenčních technik při jejich studiu.

**Klíčová slova:** iontové kanály, sensorické neurony, mechanismy aktivace, TRPV1, TRPA1

## **Abstract**

The transduction ion channels play an important role in the detection of environmental stimuli that occur primarily at the peripheral terminals of specialized sensory neurons. Only recently, molecular biological techniques have provided new tools for studying the structure of these specialized transduction ion channels in relation to their function and to understand more deeply their pharmacology and physiological roles. The aim of this bachelor thesis is to give an overview of recent evidence regarding the functional and structural properties of ion channels that are activated by sensory stimuli of different modalities (noxious heat, cold, pressure, algogens) and to summarize recent findings in the field of the development of new electrophysiological, molecular biological and fluorescence approaches that are currently revealing more information on how these channels function.

**Key words:** ion channels, sensory neurons, activation mechanisms, TRPV1, TRPA1

## **Poděkování**

Rád bych poděkoval RNDr. Viktorii Vlachové, DrSc. a RNDr. Janu Krůškovi, Ph.D. za jejich obdivuhodnou práci, motivaci a cenné rady, bez kterých by tato práce nikdy nevznikla. V neposlední řadě také všem členům oddělení buněčné neurofyzologie Fyziologického ústavu AV ČR, v.v.i. za vytváření skvělého pracovního prostředí.

# Obsah

Obsah .....	3
Úvod.....	4
Obecná charakteristika TRP iontových kanálů .....	5
Struktura TRP iontových kanálů .....	5
TRP kanály jako teplotní senzory .....	6
Mechanismy aktivace vaniloidního receptoru TRPV1 .....	7
Aktivace TRPV1 vaniloidy .....	7
Aktivace TRPV1 sníženým pH.....	9
Teplotní aktivace TRPV1 receptoru a její souvislost s napět'ovou aktivací .....	10
Struktura TRPV1.....	11
Mechanismus desenzitizace.....	13
Senzitizace TRPV1 zánětlivými mediátory .....	15
Mechanismy aktivace TRPA1 receptoru.....	16
TRPA1 je aktivován kovalentní modifikací cysteinových zbytků.....	16
TRPA1 je přímo aktivován $Ca^{2+}$ ionty .....	18
Modulace TRPA1 endogenními látkami .....	19
Funkce TRPA1 jako teplotního senzoru .....	20
Mechanosenzorická funkce TRPA1 .....	20
TRPA1 je napět'ové závislý.....	21
Perspektivy dalšího studia mechanismů aktivace TRP iontových kanálů .....	23
Seznam literatury .....	25
Příloha .....	32

# Úvod

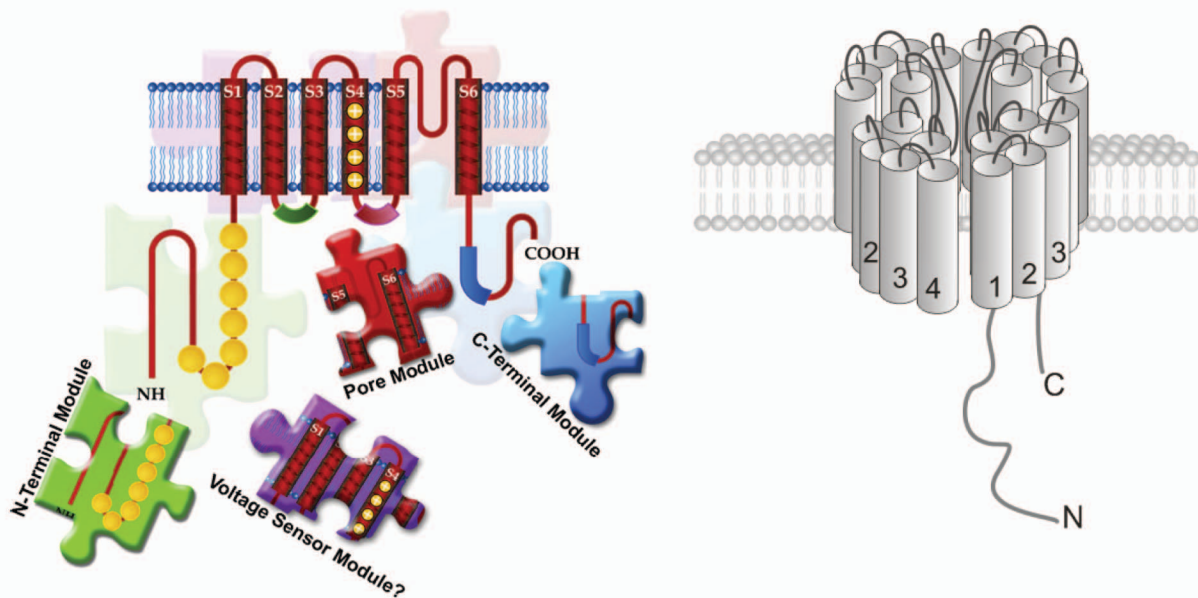
Primární aferentní senzory se podílejí na integraci a přenosu informace z periferie do centrálního nervového systému. Organismus musí být schopen rozeznat podněty škodlivé od neškodlivých a náležitě na ně reagovat. Na molekulární úrovni se to děje pomocí iontových kanálů, které jsou lokalizovány na plazmatické membráně volných nervových zakončení a jsou odpovědné za přeměnu podnětů z okolního prostředí na elektrickou aktivitu neuronů. Každý podnět (například mechanický, teplotní nebo chemický) je svým působením specifický a aktivuje konkrétní iontové kanály. Významnou skupinou receptorů podílejících se na integraci okolních podnětů je rodina TRP (**t**ransient **r**eceptor **p**otential) iontových kanálů. Obsahuje více jak 30 zástupců, kteří jsou aktivováni mechanicky, osmoticky, teplotně i řadou extracelulárních a intracelulárních chemických ligandů a druhých posílů. Identifikace mechanismů, kterými k jejich aktivaci dochází, může pomoci k objasnění příčin různých patofyziologických stavů a k jejich efektivní léčbě (například chronické bolesti).

Tato práce si klade za cíl shrnout poznatky o mechanismech aktivace a regulace iontových kanálů na vybraných zástupcích rodiny TRP receptorů: vanilodním (kapsaicinovým) receptorem podtypu 1, TRPV1, jenž je specificky exprimován na senzorych neuronech zadních kořenů míšních a trigeminálních gangliích a patří zatím k nejlépe prostudovaným TRP kanálům, a ankyrinovým TRPA1 receptorem, jehož úloha na primárních nociceptivních neuronech byla identifikována teprve v nedávné době. Aktivační a regulační mechanismy těchto polymodálních iontových kanálů jsou komplexní děje, které se často navzájem zásadním způsobem ovlivňují a doplňují. Obzvláště jejich funkce v širokém kontextu *in vivo* je v současné době intenzivně studována a v řadě aspektů zůstává nejasná. Souhrn vlastností těchto dvou zástupců iontových kanálů je v předložené bakalářské práci zaměřen na souvislost funkce ve vztahu k molekulární struktuře a uvádí směry dalšího výzkumu.

# Obecná charakteristika TRP iontových kanálů

## Struktura TRP iontových kanálů

TRPV1 a TRPA1 kanály jsou tvořeny 4 homomerními podjednotkami, z nichž každá má 6 transmembránových segmentů (S1-S6) struktury  $\alpha$ -helixu a cytoplazmaticky orientované N- a C-terminální části (obr. 1). Pór iontového kanálu je vytvářen doménami S5, hydrofobní kličkou (tzv. P-loop) a S6. Modul póru všech TRP iontových kanálů patří mezi nejvíce konzervované oblasti, což nasvědčuje tomu, že pro tyto kanály zřejmě existují společné principy selektivity, propustnosti a blokujících účinků některých nekompetitivních inhibitorů (např. ruteniové červeně). Naproti tomu hydrofilní N- a C-koncové části jsou u všech TRP receptorů nejméně konzervované, a proto se předpokládá, že obsahují funkční domény, jež určují specifické vlastnosti jednotlivých podtypů receptorů.



**Obr. 1.** Rozlišení jednotlivých domén TRP receptoru a homologní uspořádání iontového kanálu. Vlevo: N-konec receptoru s vyznačenými ankyrinovými doménami (žlutá kolečka), první intracelulární klička mezi S2 a S3 se zeleně vyznačenou částí vazebného místa pro vaniloidy, pozitivně nabitá 4. transmembránová doména, jejíž úloha v napěťové aktivaci TRPV1 a TRPA1 receptorů není dosud prokázána, modul póru iontového kanálu tvořený S5-P-S6 doménami (Latorre et al., 2007). Vpravo: Topologické uspořádání čtyř receptorových podjednotek vytvářejících iontový kanál. N a C konec je vyznačen pouze u jedné podjednotky.

Potkaní TRPV1 receptor (rTRPV1) je protein o velikosti 95 kDa, který je kódován komplementární DNA o velikosti 2 514 nukleotidů, což představuje 838 aminokyselin (Caterina et al., 1997). Aminový (N-) konec receptoru je tvořen 432 aminokyselinovými zbytky. Obsahuje oblasti bohaté

na prolin a šest ankyrinových domén, které receptor spojují s cytoskeletem a pravděpodobně několika malými intracelulárními peptidy, z nichž nejvýznamnější úlohu hraje kalmodulin (funkční úloha těchto domén je uvedena níže). Kratší řetězec s karboxylovou skupinou (C konec) je tvořen 154 aminokyselinami a obsahuje konzervovanou tzv. TRP doménu v blízkosti šestého transmembránového segmentu.

TRPA1 protein je tvořen 1125 aminokyselinami u potkaního izotopu (~128 kDa). N-koncová doména TRPA1 je v porovnání s ostatními TRP zástupci velká (716 aminokyselin) a obsahuje 18 ankyrinových domén. Na rozdíl od tradičního členění napěťově nebo chemicky aktivovaných iontových kanálů podle způsobu aktivace, TRP kanály jsou klasifikovány podle homologie primárních aminokyselinových sekvencí (Montell, 2005). Příčinou je nejen jejich polymodalita, různorodost biofyzikálních vlastností a množství aktivačních a regulačních mechanismů, ale především skutečnost, že fyziologická úloha těchto receptorů dosud není často známa, a pouze se předpokládá, že jejich strukturální podobnost je podkladem existence společných mechanismů aktivace. Receptory TRPV1 a TRPA1 patří mezi charakteristickou skupinu iontových kanálů, které jsou mj. specificky aktivovány změnami okolní teploty. Tato vlastnost nebyla nalezena u jiných typů iontových kanálů a z hlediska možného fyziologického významu jsou proto intenzivně studovány mechanismy tohoto ojedinělého typu aktivace.

### ***TRP kanály jako teplotní senzory***

Vnímání okolní teploty je děj společný všem savcům a dochází k němu prostřednictvím primárních aferentních sensorických neuronů ganglií zadních kořenů míšních a trigeminálních ganglií. Tato dráha je shodná s nociceptivní, vždyť rozeznat „příjemné teplo“ od „škodlivého“ je jedním ze základních fyziologických potřeb, bez které by organismus nemohl fungovat. Existují důkazy, že za tento mechanismus teplotní citlivosti mohou zodpovídat někteří zástupci rodiny TRP kanálů, jež pokrývají teplotní spektrum od chladu pod 8 °C až po teplo nad 52 °C, kdy už dochází k denaturaci proteinů: Jedná se o 4 receptory z podrodiny TRPV (vanilloid) receptorů, které detekují teplo: TRPV4 >25 °C, TRPV3 >31 °C, TRPV1 >43 °C, TRPV2 >52 °C a dva zástupce podrodin TRPM (melastatin) a TRPA (ankyrin), které detekují chlad: TRPM8 <28 °C a TRPA1 <18 °C (pro přehled viz např. (Bandell et al., 2007; Dhaka et al., 2006; Story et al., 2003)).

# Mechanismy aktivace vaniloidního receptoru TRPV1

## *Aktivace TRPV1 vaniloidy*

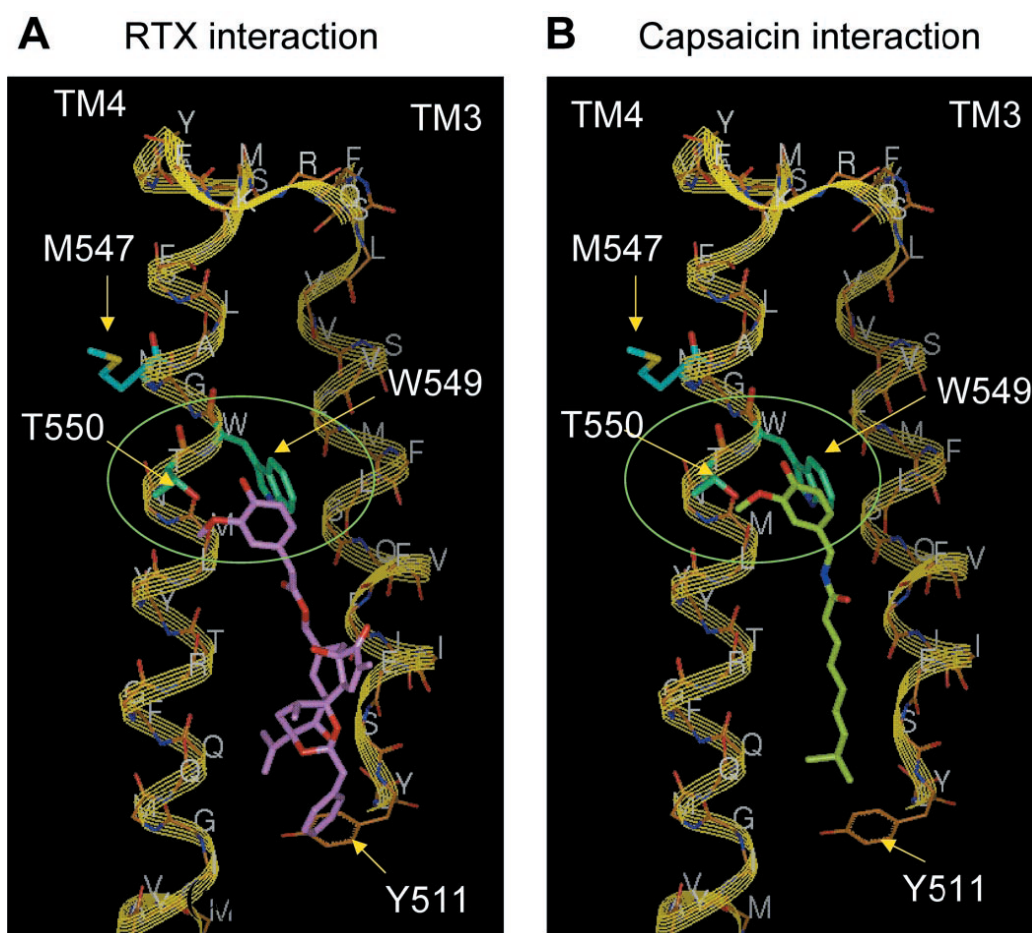
Charakteristickým rysem TRPV1 kanálu je jeho schopnost aktivace vaniloidy, odtud také název vaniloidní receptor (Caterina et al., 1997). Nejznámější z vaniloidů je pálivá složka z čili paprik – kapsaicin. Jiným důležitým zástupcem vaniloidních látek, které aktivují TRPV1 receptor, je ultrapotentní analog kapsaicinu – resiniferatoxin. TRPV1 je aktivován endogenními ligandy uvolňovanými během poškození tkáně – např. anandamidem (Di Marzo et al., 1996), N-arachidonyldopaminem, N-oleoyldopaminem a produkty lipooxygenáz (Starowicz et al., 2007).

Molekulární identifikace vaniloidního receptoru TRPV1 v různých živočišných druzích umožnila nejen zajímavý evoluční pohled na možnou fyziologickou úlohu tohoto receptoru. Porovnání primárních struktur ortologních receptorů umožnilo rovněž získat velmi důležitou informaci o funkčně významných oblastech uplatňujících se v detekci vnějších podnětů různých modalit a určit vazebné místo pro vaniloidy (Caterina et al., 1997; Correll et al., 2004; Gavva et al., 2004; Hayes et al., 2000; Jordt and Julius, 2002; Kuffler et al., 2002; Phelps et al., 2005; Savidge et al., 2002). Ukázalo se, že ne všechny ortology kapsaicinového receptoru TRPV1 jsou stejně citlivé ke kapsaicinu. Například ptačí TRPV1 není citlivý na kapsaicin ani resiniferatoxin a tomu odpovídá i značná divergence aminokyselinové sekvence v oblasti vazebného místa (Jordt and Julius, 2002). Králičí TRPV1 vykazuje pouze zbytkovou citlivost k vaniloidům (Gavva et al., 2004). Je tomu tak i přes vysokou homologii například s potkaním či lidským izotypem. U králičího izotypu je zachován tyrosin 511, který je pro aktivaci vaniloidy nezbytný, ale pro plnou aktivaci je třeba záměna minimálně osmi dalších aminokyselin (Jordt and Julius, 2002). Bylo prokázáno, že lipofilní molekula kapsaicinu interaguje s TRPV1 v oblasti rozhraní receptoru s lipidovou dvojvrstvou. Y511 v oblasti první intracelulární kličky potkaního TRPV1 receptoru se účastní interakce s aromatickou homovanillyl skupinou kapsaicinu (mezi třetí a čtvrtou transmembránovou doménou) a dalšími aminokyselinovými zbytky serinem (S512) a argininem (R491), jež vytvářejí s kapsaicinem vodíkové můstky (Gavva et al., 2004; Jordt and Julius, 2002) (obr. 2). Pro vazbu vaniloidů se také ukázala být důležitá fosforylace proteinového komplexu pomocí kinázy CaMKII (Jung et al., 2004). Pro rozpoznání ligandu je pravděpodobně nezbytná přítomnost záporně nabitého glutamátu (E761) na C-konci receptoru a pozitivně nabitého argininu (R114) na N-konci (Jung et al., 2002). Vazby kapsaicinu a resiniferatoxinu se zřejmě také účastní dva aminokyselinové zbytky ve čtvrté



transmembránové doméně: polární T550 a nepolární M547 (Gavva et al., 2004). Mezi potkaním a lidským TRPV1 receptorem existují rozdíly v citlivosti k vaniloidům, na nichž by se mohl podílet aminokyselinový zbytek v pozici 547: methionin u potkana, kdežto leucin u člověka (Chou et al., 2004).

Příčina chybějící vaniloidní citlivosti u ptáků byla interpretována z evolučního hlediska jako výhoda jak pro ptáky, tak pro rostliny. Rostlina se chrání před spásáním býložravci a díky ptákům, kteří ztrátou citlivosti mají o potravní zdroj navíc, můžou být její semena dále roznášena (Tewksbury and Nabhan, 2001).



**Obr. 2.** Předpokládané vazebné místo TRPV1 receptoru pro resiniferatoxin (RTX, A) a kapsaicin (B) (Gavva et al., 2004).

V poslední době se stále více ukazuje komplexita a konzervovaný mechanismus aktivace TRP kanálů. Exogenní látky, které aktivují TRPA1 kanál, pálivé složky česneku, hořčice, cibule nebo skořice, aktivují také TRPV1 (Macpherson et al., 2005; Macpherson et al., 2006; Salazar et al., 2008). Tyto látky mohou kovalentně modifikovat cysteinové aminokyselinové zbytky proteinu a tím modulovat jeho aktivitu.

## ***Aktivace TRPV1 sníženým pH***

Další mechanismus, kterým lze aktivovat TRPV1 receptor, je zvýšená koncentrace protonů (Caterina et al., 1997). Infuze acidifikovaného fyziologického roztoku, stejně jako aplikace roztoku kapsaicinu, způsobuje intenzivní pálivou bolest (Steen and Reeh, 1993) a ke snížení koncentrace protonů dochází při infekci, zánětu nebo ischemii, což vede k bolesti a hyperalgesii. Myši s chybějícím genem pro TRPV1 vykazují zhoršenou citlivost jak ke kapsaicinu, tak k lokální acidifikaci (Caterina et al., 2000). Tyto skutečnosti vedly k názoru, že aktivace TRPV1 receptoru sníženým pH může představovat další fyziologicky významný mechanismus aktivace tohoto receptoru *in vivo*. Aktivaci TRPV1 protony můžeme rozdělit na 2 stupně podle intenzity. Mírná acidifikace má za následek senzitivizaci ostatních podnětů (chemické nebo teplotní odpovědi), ale sama o sobě aktivaci kanálu nevyvolá. Silná acidifikace (pod pH 6) vyvolá aktivaci TRPV1 sama o sobě (Tominaga et al., 1998). Tyto jevy jsou zprostředkovány dvěma různými mechanismy. Při mírné acidifikaci dochází k potenciaci vazby kapsaicinu alosterickou modulací a stabilizaci otevření kanálu (Ryu et al., 2003). V tomto procesu se zásadním způsobem uplatňují aminokyselinové zbytky E600 na extracelulární straně 5. transmembránové domény a E648 na kličce mezi selektivním filtrem a S6 (Jordt et al., 2000). Tyto aminokyseliny se také společně s E636 a D646 podílejí na aktivaci kapsaicinem, aniž by měly vliv na citlivost receptoru k protonům nebo teple (Welch et al., 2000). Mechanismus přímé aktivace protony je zprostředkován odlišnými aminokyselinovými zbytky. Jedno místo je v oblasti póru, T633, a druhé na extracelulární kličce mezi S3 a S4 - V538. Mutace každého z nich snižuje proud vyvolaný protony, nemá však vliv na aktivaci kapsaicinem nebo teplem. Oba zbytky pravděpodobně zprostředkovávají otevírání póru iontového kanálu po navázání protonu pomocí hydrofobních interakcí a jsou součástí strukturní domény specifické pro aktivaci protony (Ryu et al., 2007).

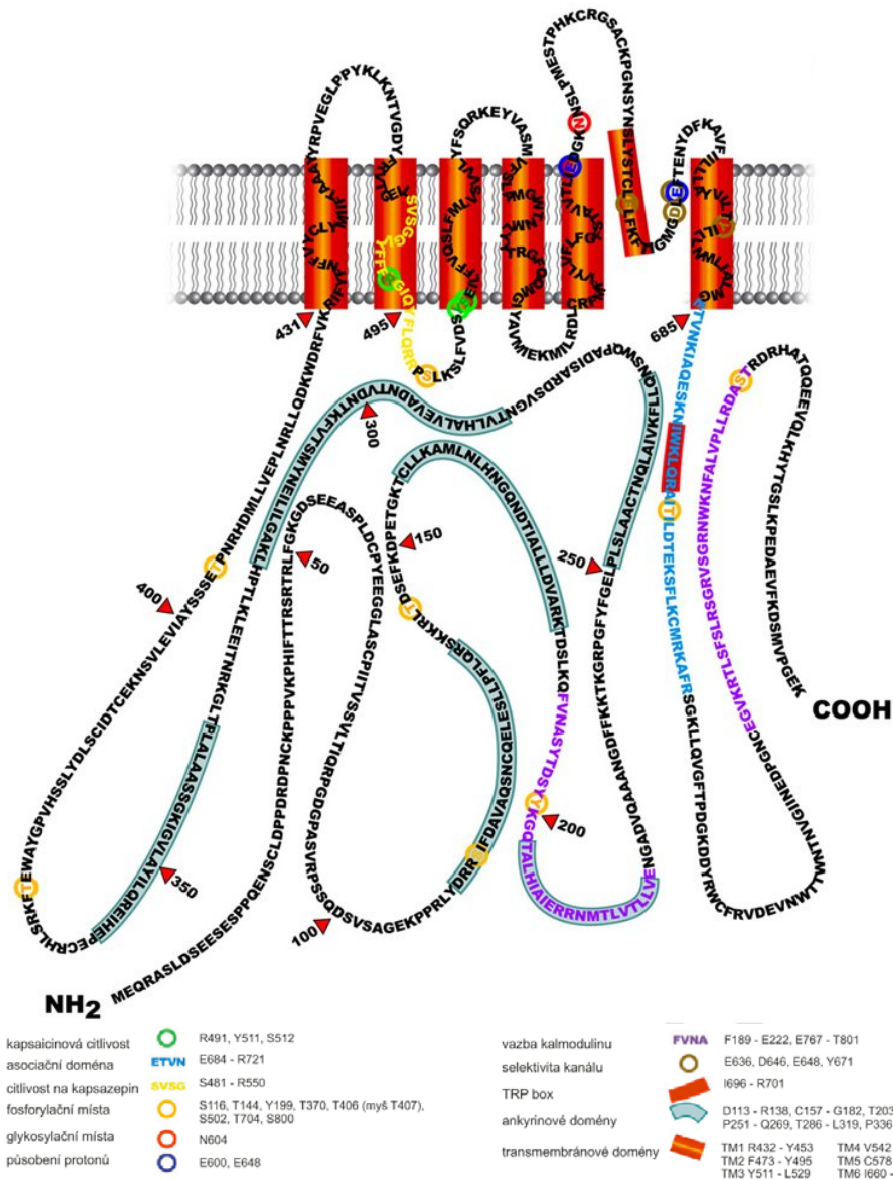
TRPV1 je neselektivní kationtový kanál a kromě  $\text{Ca}^{2+}$  iontů propouští také  $\text{Na}^+$  ionty v poměru 10:1. Tento poměr je dynamicky regulován v závislosti na koncentraci kapsaicinu a délce jeho působení (Chung et al., 2008). Hodnota extracelulární koncentrace  $\text{Na}^+$  rovněž ovlivňuje hladinu intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$ , a to tak, že pokles extracelulární koncentrace  $\text{Na}^+$  stimuluje vzestup intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ . Neutralizace kyselých aminokyselin, E600, E648 a D646, které jsou nezbytné při aktivaci protony, má za následek snížení odpovědi způsobenou nízkou koncentrací extracelulárních  $\text{Na}^+$  (Ohta et al., 2008).  $\text{Na}^+$  tedy zřejmě fungují jako negativní regulátory TRPV1 receptorů a pravděpodobně interagují s místy, která jsou jinak zodpovědná za aktivaci protony, a blokují tak další aktivaci kanálu. Ve fyziologických podmínkách může tento mechanismus hrát inhibiční úlohu při aktivaci TRPV1 receptorů vyvolané bolestivými podněty.

## *Teplotní aktivace TRPV1 receptoru a její souvislost s napět'ovou aktivací*

Přesný mechanismus teplotní aktivace TRP receptorů zůstává stále nejasný. V úvahu připadaly tři alternativy vedoucí k otevření póru. První možnost předpokládala, že změna teploty vede k produkci a vazbě ligandů, které následně otevírají kanál. V druhém případě se uvažovalo o teplotně závislé strukturní změně proteinového komplexu iontového kanálu, která by přímo vedla k aktivaci iontového kanálu. Třetí hypotéza vycházela z možnosti, že iontový kanál je aktivován strukturními, teplotně závislými změnami lipidové dvojvrstvy, které by kanál mechanicky otevřely (Clapham, 2003). Mechanismus teplotní aktivace TRP receptorů byl v nedávné době uveden v souvislost s napět'ovou aktivací, protože bylo zjištěno, že termosenzitivní receptory lze aktivovat depolarizací membránového potenciálu (Voets et al., 2004a). Například nejlépe prozkoumaný chladový receptor TRPM8, mezi jehož ligandy patří mimo jiné chladivá látka mentol, je aktivován nejen teplotami pod 28 °C (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002), ale také depolarizačním napětím. Při změně polarity dochází k jeho inaktivaci (Voets et al., 2004a). Napět'ovou citlivost vykazuje také nejlépe prozkoumaný zástupce TRP kanálů aktivovaných teplem: TRPV1 s prahovou hodnotou 43 °C při klidovém membránové potenciálu a teplotní závislostí  $Q_{10} > 20$  (Caterina et al., 1997). Při depolarizačním napětí dochází k výraznému posunu hodnoty aktivace směrem k nižším teplotám. Konkrétně při aplikaci +100 mV dochází k aktivaci již při pokojové teplotě (poloviční účinné napětí  $V_{1/2} = 150$  mV), zatímco při hyperpolarizačním napětí -100 mV zůstává hodnota teplotní aktivace nezměněna (Gunthorpe et al., 2000). Naopak při zvýšení teploty ze 17 °C na 40 °C se sníží hodnota  $V_{1/2}$  o 200 mV, tedy na hodnotu -50 mV, která více odpovídá fyziologickým podmínkám. U obou kanálů, TRPV1 a TRPM8, je tedy aktivace teplotou a napětím na sobě závislá. Navíc byla prokázána v izolovaných terčících a tento způsob aktivace tedy zřejmě nezávisí na signalizačních molekulách. Na druhou stranu to nemusí být pravidlem pro všechny termo-TRP kanály. TRPV4 například v izolovaných terčících teplotně aktivovatelný není (Chung et al., 2003; Watanabe et al., 2002).

TRP kanály se svojí strukturou nejvíce podobají napět'ově závislým draslíkovým kanálům ( $K_v$ ), a proto se mezi nimi hledají strukturálně – funkční souvislosti (obr. 4). Na rozdíl od  $K_v$  kanálů je však napět'ová závislost TRP kanálů slabá. U draslíkového kanálu je napět'ový modul jasně rozpoznán na S4 transmembránovém segmentu, kde se nachází pozitivně nabitě argininy, které jsou odpovědné za otevírání kanálu. U TRPV1 se na S4 podjednotce nachází arginin pouze jeden. Tento aminokyselinový zbytek je u TRPV podrodiny konzervován, přičemž napět'ová závislost byla potvrzena pouze u některých zástupců. To naznačuje, že za napět'ovou závislost může být zodpovědná jiná struktura nebo mechanismus než u draslíkového kanálu (Latorre et al., 2007).

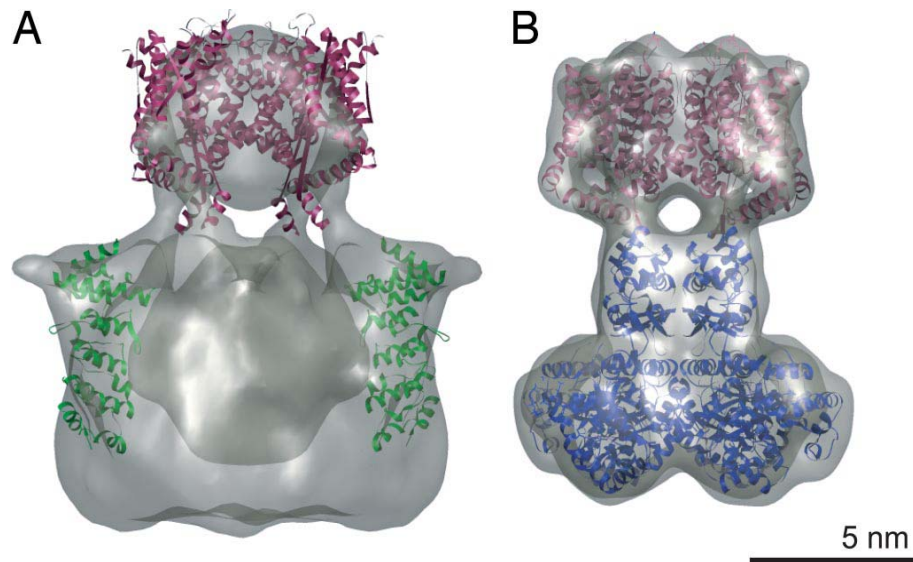
## Struktura TRPV1



**Obr. 3.** Schematické znázornění topologického uspořádání TRPV1 receptoru potkana s vyznačením strukturálně/funkčně významných domén, převzato z práce (Latorre et al., 2007).

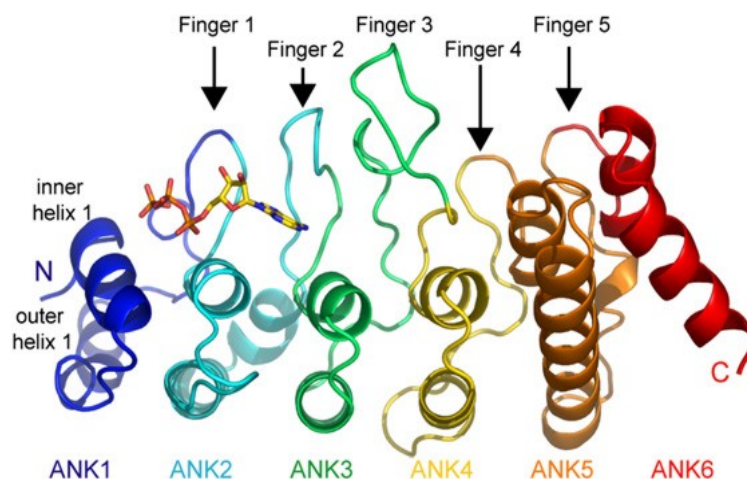
Představy o struktuře TRPV1 receptoru vycházely do nedávné doby jen z funkčních studií a z homologního modelování na základě strukturní podobnosti s draslíkovými kanály (Ferrer-Montiel et al., 2004; Owsianik et al., 2006a). V loňském roce byla vykrytalizována charakteristická část N-terminální domény, tzv. ARD struktura (ankyrin repeat domain), (Lishko et al., 2007). Zatím nejpřesnější model TRPV1 receptoru byl zcela nedávno vytvořen pomocí kryoelektronové

mikroskopie (Moiseenkova-Bell et al., 2008) (obr. 4). Model byl rekonstruován fitováním krystalu strukturně podobného Kv1.2 kanálu a krystalu TRPV1-ARD do TRPV1 struktury získané pomocí kryoelektronové mikroskopie. I když rozlišení tohoto modelu (19 Å) je velice hrubé, poskytuje informaci o 2 zřetelných doménách. Otevřená struktura znázorňuje oba cytoplazmatické konce a kompaktní struktura transmembránové domény (obr. 4A).



**Obr. 4.** A: Model proteinového komplexu TRPV1 získaný kryoelektronovou mikroskopií v rozlišení 19 Å. B: Pro srovnání strukturně podobný Kv kanál. V cytoplazmatické oblasti TRPV1 receptoru je patrné uspořádání N- a C- konců podjednotek vytvářející prostorný interní vestibul, obdobný 3D struktuře některých draslíkových kanálů a iontových kanálů aktivovaných cyklickými nukleotidy (CNG).

N – konec TRPV1 receptoru se nachází stejně jako C – konec na cytosolické straně plazmatické membrány. Je tvořen 431 aminokyselinami z celkových 838 u potkaního izotypu. Obsahuje 6 ankyrinových domén, které mají významnou regulační úlohu a leží v oblasti 101-364. Ankyrin je oligomer se 33 aminokyselinovými zbytky, které tvoří 2 antiparalelní alfa helixy spojené tzv. *finger loop* motivem. Je cílem hned několika signálních molekul, které se významně podílejí na regulaci funkce kanálu. Látky, které prokazatelně interagují s ARD jsou kalmodulin (CaM), fosfatidylinositol bisfosfát (PIP<sub>2</sub>) a adenosin trifosfát (ATP). Uplatňují se v mechanismech senzitivace a desenzitivace TRPV1 receptoru.

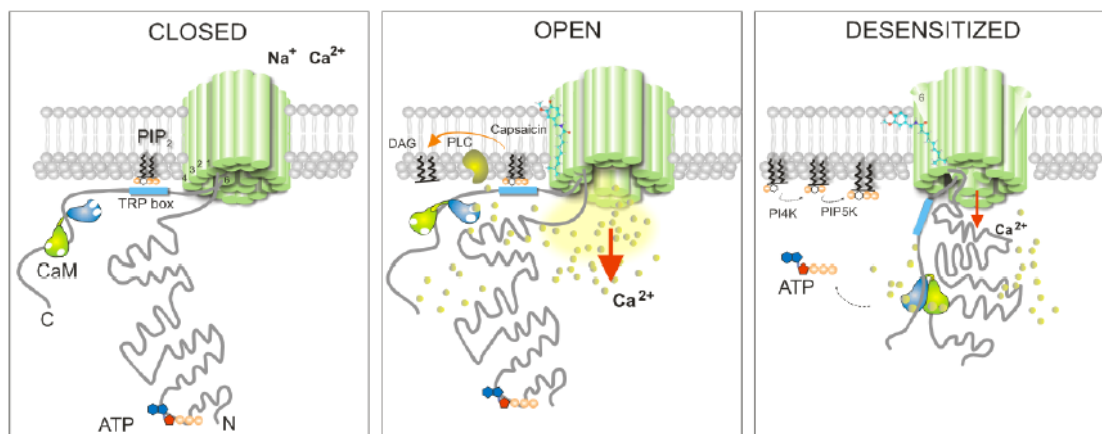


**Obr. 5.** Ankyrinová doména TRPV1 kanálu s navázanou molekulou ATP (Lishko et al., 2007).

### ***Mechanismus desenzitizace***

Komplex CaM-Ca<sup>2+</sup> se váže na N-terminální konec mezi aminokyseliny 189-222, snižuje pravděpodobnost otevření kanálu, a tím se podílí na jeho desenzitizaci a tachyfyaxi (Rosenbaum et al., 2004). O vazebné místo s ním kompetuje ATP, který svým navázáním způsobuje naopak resenzitizaci proteinového komplexu. TRPV1 je pravděpodobně také resenzitizován prostřednictvím membránového fosfatidyl inozitol bisfosfátu (PIP<sub>2</sub>), i když je otázkou zdali resenzitizaci způsobuje přímým navázáním nebo nepřímo prostřednictvím resyntézy ATP (Lishko et al., 2007) (Liu et al., 2005; Stein et al., 2006). Jiná studie naopak podporuje úlohu PIP<sub>2</sub> jako inhibitoru TRPV1 (Prescott and Julius, 2003) a ukazuje se, že regulační úloha PIP<sub>2</sub> *in vivo* představuje složitější mechanismus, jenž souvisí s buněčným kontextem (Klein et al., 2008; Lukacs et al., 2007; Rohacs and Nilius, 2007). Při aktivaci TRPV1 kanálu kapsaicinem dochází již v průběhu prvních několika vteřin k procesu desenzitizace (snížení odpovědi v přetrvávající přítomnosti agonisty) a tento děj nastává pouze v přítomnosti extracelulárního Ca<sup>2+</sup>. Mechanismus kapsaicinem vyvolané desenzitizace se zřejmě uplatňuje v procesech, kdy je využívána tato látka v klinické praxi pro snížení intenzity některých bolestivých stavů. Při aktivaci TRPV1 vaniloidy dochází k průchodu Ca<sup>2+</sup> iontů pórem iontového kanálu a následnému spuštění řady signalizačních kaskád. V relativně krátkém čase (1 minuta) po aplikaci kapsaicinu dochází ke změnám ve struktuře cytoplazmatické membrány a následně i v celé buňce. Po delší expozici dochází k cytotoxickým efektům, které nakonec vedou k buněčné smrti – apoptóze. Tento proces může tedy v rámci několika hodin eliminovat nociceptivní neurony exprimující TRPV1 a tento efekt je společný všem vaniloidům (Olah et al., 2001).

Proces desenzitizace TRPV1 receptoru je v současné době předmětem intenzivního studia a jeho objasnění může značným způsobem napomoci v pochopení celého procesu vnímání bolesti. Pravděpodobný se zdá být model, kdy v klidovém stavu je na TRPV1-ARD navázán senzitivizační ligand. Po aktivaci dojde ke zvýšení hladiny  $\text{Ca}^{2+}$ , které aktivuje kalmodulin, ten se naváže na svoje vazebné místo a z důvodů sterické interakce vytlačí molekulu senzitivizujícího ligandu – v tomto modelu ATP (obr. 6).



**Obr. 6.** Model mechanismu desenzitizace vaniloidního receptoru TRPV1: vápenaté ionty se po průchodu pórem otevřeného iontového kanálu vážou na kalmodulin (CaM) a komplex CaM- $\text{Ca}^{2+}$  kompetuje o vazebné místo pro senzitivizační ligand adenosin trifosfát (ATP). Konformační změna způsobená vazbou CaM- $\text{Ca}^{2+}$  na ARD doménu N-konce receptoru oslabí interakci proximální části C-konce s membránovým lipidem PIP<sub>2</sub> (ten je s přispěním vápenatých iontů dále enzymaticky degradován), což vede ke snížení afinity receptoru pro vaniloidy (Lishko et al., 2007; Novakova-Tousova et al., 2007; Vyklický et al., 2008).

Kromě vazby kalmodulinu na N-terminální konec  $\text{Ca}^{2+}$  – závislým způsobem na oblast (189-222) byla potvrzena také  $\text{Ca}^{2+}$  – nezávislá vazba kalmodulinu na C-konci TRPV1 kanálu, konkrétně na oblast 767-800 (Numazaki et al., 2003). Toto zjištění nahrává hypotéze, že desenzitizace TRPV1 může odrážet konformační změny celého komplexu iontového kanálu. Po aktivaci TRPV1 dojde k navázání  $\text{Ca}^{2+}$  iontů na kalmodulin, který je v nativním stavu navázán na C-konci. Zároveň dojde k nahrazení navázaného ATP na N-konci právě tímto komplexem  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulinu a tím k přiblížení obou konců, což by vedlo ke konformační změně celého komplexu včetně zúžení vlastního póru kanálu a tím k horší propustnosti pro procházející ionty a k inaktivaci kanálu (Lishko et al., 2007). ATP je sice v cytosolu chelátován divalentními kationty, čímž je inhibováno jeho navázání na TRPV1-ARD, ale koncentrace nechelátovaného ATP je cca 0.3-0.7 mM, což by pro vazbu na ARD mohlo postačovat. Vzhledem k tomu, že TRPV1 je neselektivní kationtový kanál, procházejí jím monovalentní i divalentní kationty včetně  $\text{Mg}^{2+}$ . Zvýšená koncentrace  $\text{Mg}^{2+}$  vychelatuje zbývající ATP, tím se uvolní vazebné místo pro kalmodulin a může dojít k interakci C a N konce.

Membránový PIP<sub>2</sub> kompetuje s CaM na C-konci podobným způsobem, jako kompetuje o vazebné místo ATP s CaM na N-konci (Kwon et al., 2007). Alternativní model desenzitizace předkládá možnost, že při vysoké intracelulární hladině je membránový PIP<sub>2</sub> navázán na konzervovanou doménu proximální části cytoplazmatického C-konce přiléhajícího k S6 (tzv. TRP box, viz obr. 3). Aktivace receptoru, tj. zvýšená hladina Ca<sup>2+</sup>, vede k aktivaci fosfolipázy C, jež hydrolyzuje PIP<sub>2</sub>, čímž snižuje jeho senzitivizační účinek. Ca<sup>2+</sup>-CaM se naváže na ARD stejně jako CaM na uvolněné vazebné místo na C-konci a způsobí následnou inaktivaci kanálu.

### ***Senzitizace TRPV1 zánětlivými mediátory***

Při zánětu nebo poranění dochází na primárních aferentních sensorických neuronech k výrazné změně v citlivosti k teplotním a mechanickým podnětům. Při tomto jevu se uplatňuje polymodalita TRPV1 receptoru a alosterický charakter mechanismů jeho aktivace. Výsledkem může být aktivace kanálu i při fyziologických teplotách, což může ve fyziologickém kontextu přispívat k zánětlivé nebo chronické bolesti. Při zánětu či poškození tkáně je vylučována řada mediátorů, které vlastnosti TRPV1 kanálu ovlivňují. Jsou to například: bradykinin, NGF, protony nebo prostaglandiny. Bradykinin je hlavní zánětlivý mediátor, který je uvolňován při tkáňovém poškození (Manning et al., 1991). Způsobuje hyperalgesii a senzitivizuje TRPV1 receptor. Účinek bradykininu je zprostředkován dvěma metabotropními receptory (G – protein coupled receptor = GPCR) B1 a B2 (Pesquero et al., 1996). Při senzitivizaci TRPV1 se uplatňuje především B2 receptor, který aktivuje značné množství metabolických drah. Mimo jiné aktivuje PLCβ, která hydrolyzuje PIP<sub>2</sub> na IP3 (inozitol trifosfát) a DAG (diacylglycerol). DAG dále aktivuje proteinkinázu C (PKC), mezi jejíž substráty patří také TRPV1 kanál (Julius and Basbaum, 2001). Dále aktivuje fosfolipázy A2 a D, řadu dalších kináz a fosfatáz, což vede například k aktivaci MAP kinázové dráhy a změnám v genové expresi (Couture et al., 2001).

Na proteinovém komplexu TRPV1 se nacházejí místa, která jsou cílem kináz a fosfatáz, jež se podílejí na řadě důležitých modulačních aktivit (obr. 3). Mezi nejvýznamnější funkce PKC při modulaci TRPV1 patří fosforylace S502 a S800, což vede k senzitivizaci kanálu (Bhave et al., 2003). Proteinkináza A (PKA) fosforyluje TRPV1 na šesti specifických místech, nejdůležitější z nich jsou S116 a S502 (Bhave et al., 2002).

Jiným mediátorem silně ovlivňujícím aktivitu TRPV1 receptoru je nervový růstový faktor (NGF).



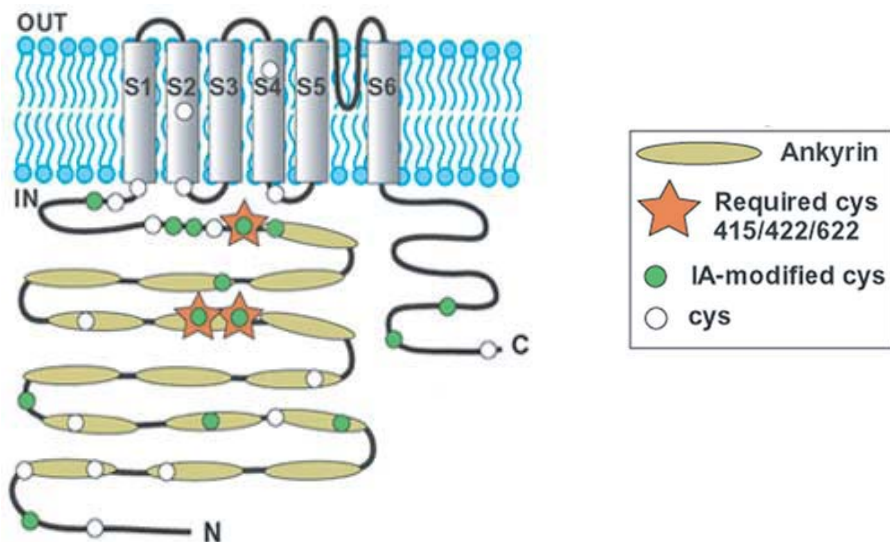
Jeho navázání na TrkA receptor způsobuje aktivaci Src kinázové a PI3 (fosfoinositid-3) kinázové dráhy. Proteinkináza typu Src fosforyluje tyrosin Y200 u hTRPV1 (Y199 u rTRPV1) z oblasti začátku ankyrinové domény a aktivuje signální kaskádu, která vede ke zvýšenému směřování TRPV1 k membráně (Zhang et al., 2005). Zvýšení počtu TRPV1 receptorů v plazmatické membráně má tak za následek zvýšení aktivity a signálu zprostředkovaného TRPV1 receptory.

Mezi lipidové mediátory stimulující TRPV1 patří také prostaglandiny, které jsou generovány v reakci na zánět a škodlivou stimulaci (Bley et al., 1998). Na neuronech ganglií zadních kořenů míšních se nacházejí dva typy metabotropních receptorů, jež jsou aktivovány prostaglandiny, které navozují teplotní přecitlivělost. Jsou to EP receptor pro prostaglandin PGE2 a IP receptor pro PGI2. Knock-out jednoho z těchto genů vede ke snížení vnímání bolesti i snížení teplotní přecitlivělosti. Obzvláště je zřejmá souvislost s TRPV1 kanálem a PGE2-indukovanou teplotní přecitlivělostí experimentálních myší, která při knock-out TRPV1 prakticky vymizí (Moriyama et al., 2005). Signální dráhy, které se při tomto mechanismu uplatňují jsou PKC-signální dráha a cAMP/PKA signální dráha. Obě tyto dráhy spouští kaskádu fosforylací, které vedou k senzitivizaci TRPV1 proteinového komplexu.

## **Mechanismy aktivace TRPA1 receptoru**

### ***TRPA1 je aktivován kovalentní modifikací cysteinových zbytků***

Spektrum látek, které chemicky aktivují TRPA1 receptor, je rozsáhlé. Většinou jde o exogenní organické molekuly, které působí dráždivě nebo vyvolávají bolest. Jsou to například komponenty wasabi, křenu, marihuany, česneku, skořice, hořčice, zázvoru, hřebíčku nebo dráždivé látky jako například složka slzného plynu – akrolein (Garcia-Anoveros and Nagata, 2007). Vlastnost, kterou má řada těchto látek společnou je jejich schopnost vázat se na TRPA1 receptor kovalentní modifikací cysteinových zbytků (tab. 1). Tím dojde ke konformační změně proteinového komplexu receptorových podjednotek, která vede k aktivaci iontového kanálu (Hinman et al., 2006; Macpherson et al., 2007). Z celkového počtu 31 cysteinových zbytků přítomných na TRPA1 receptoru byly identifikovány tři cysteiny (C415, C422 a C622), které jsou nezbytné pro aktivaci kovalentně modifikujícími látkami, jako jsou hořčičný olej nebo skořicový aldehyd (obr. 8).



**Obr. 8.** Topologie TRPA1 kanálu s vyznačenými cysteinovými zbytky, které byly identifikovány jako nezbytné pro aktivaci (Macpherson et al., 2007).

Table 1 | Cysteine-modifying properties of TRPA1 agonists.

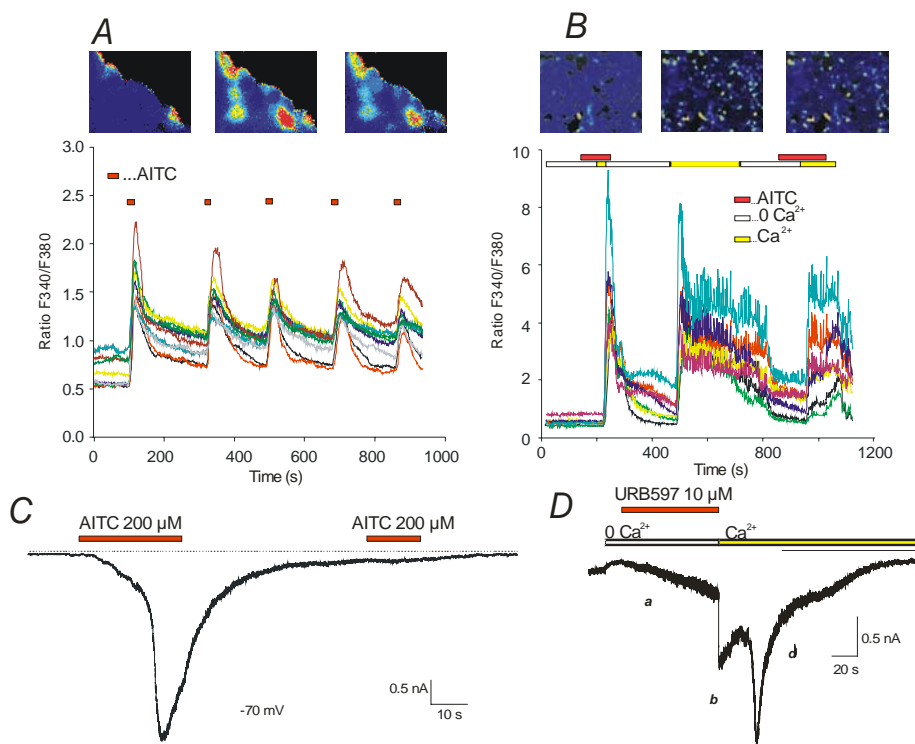
TRPA 1 agonist	Structure	EC <sub>50</sub>	Inactive analogue structure
Cinnamaldehyde (CA)		19.0 mM	
Super cinnamaldehyde (SC)		0.8 mM	
SC alkyne (SCA)		0.1 mM	
Acrolein		5 mM*	
Pentenal		5 mM*	
Mustard oil (MO)		33.5 mM	
Mustard oil alkyne (MOA)		18.4 mM	
Iodoacetamide (IA)		357 mM	
Iodoacetamide alkyne (IA A)		134 mM	
MTSEA		1.58 mM	

**Tab.1.** Příklady vybraných agonistů aktivující TRPA1 kanál kovalentní modifikací cysteinových zbytků (Macpherson et al., 2007).

## TRPA1 je přímo aktivován $Ca^{2+}$ ionty

Role vápenatých iontů je pro aktivaci a regulaci TRPA1 receptoru zásadní. Extracelulární vápenaté ionty zesilují proudy vyvolané alylisoithiokyanátem (AITC), indukují desenzitaci a tachyfyaxi po opakovaných aplikacích a bez jejich přítomnosti k plné aktivaci kanálu nedojde (Jordt et al., 2004; Nagata et al., 2005)(obr. 9).

Na N-konci proteinu byl identifikován  $Ca^{2+}$ -vazebný motiv, takzvaná EF-hand CBD doména (D468-L480) (Doerner et al., 2007). Ukázalo se, že samotné  $Ca^{2+}$  ionty dostačují pro aktivaci TRPA1 v heterologním expresním systému, a že leucin na pozici 474 je nezbytný pro potenciaci i aktivaci vyvolanou AITC nebo icilinem. Pravděpodobně je za to zodpovědná právě EF-hand CBD vazebná doména, která navázáním  $Ca^{2+}$  iontů na šest specifických interakčních míst vyvolá konformační změnu receptoru dostatečnou k otevření iontového kanálu. K počátečnímu průniku  $Ca^{2+}$  iontů k EF - hand CBD doméně může docházet skrz spontánně otevřené TRPA1 kanály, což vede k následné potenciaci dalšího vstupu vápníku otevřením dalších TRPA1 kanálů. Vzhledem k tomu, že TRPA1 je koexprimován s TRPV1, dochází pravděpodobně k modulaci  $Ca^{2+}$ - závislé aktivace TRPA1 také vlivem vstupu vápníku do buňky skrze TRPV1 kanály. Oba kanály se tak mohou navzájem doplňovat a modulovat. Jakou úlohu tento mechanismus hraje v širokém kontextu *in vivo* systému vyžaduje další studie.



**Obr. 9.** Aktivační kinetika TRPA1 receptoru je zásadním způsobem určována extracelulární

koncentrací vápníku. A: Poměrové měření hladiny intracelulárního vápníku pomocí fluorescenční sondy Fura2 při opakované aktivaci TRPA1 kanálů vyvolané aplikací AITC na HEK293T buňky transfekované hTRPA1 receptorem. B: Role  $Ca^{2+}$  iontů je zásadní pro potenciaci odpovědi indukovaných AITC. C: Proud měřený elektrofyziologicky technikou patch clamp v konfiguraci „whole-cell“ při aplikaci AITC za přítomnosti 1 mM  $Ca^{2+}$ . Druhá aplikace o 10 vteřin později již nevyvolá žádnou odpověď, což je důsledkem desenzitizace TRPA1 receptorů. D: Přítomnost extracelulárního vápníku vede k potenciaci a aktivaci TRPA1. (a) V nepřítomnosti  $Ca^{2+}$  vyvolává URB597 (agonista TRPA1 receptoru) pouze pomalou a neúplnou aktivaci. (b) Přidání  $Ca^{2+}$  vede k potenciaci následované aktivační fází (c), která je následovaná fází inaktivační (d).

### ***Modulace TRPA1 endogenními látkami***

Při patofyziologických stavech dochází v organismu k produkci řady látek, které senzitivizují a modulují aktivitu nociceptivních receptorů. Po identifikaci jednoho z aktivačních mechanismů TRPA1 receptoru, kovalentní modifikace cysteinů, logicky vyvstala otázka, které endogenní látky by mohly představovat přirozené aktivátory TRPA1 působící stejným mechanismem na primárních nociceptivních neuronech. Záhy bylo identifikováno několik látek, které by mohly tuto úlohu zastávat: např.  $H_2O_2$ , 4 - hydroxynonenal (4 - HNE), nebo prostaglandin 15d - PGJ2 (Andersson et al., 2008). Všechny tyto látky zvyšují extracelulární hladinu vápníku o cca 50% na neuronech, které jsou citlivé na kapsaicin, a mají zřejmě důležitou roli *in vivo*. Pokusy na myších s knock-outovaným TRPA1 ukázaly, že nociceptivní působení  $H_2O_2$ , PGJ2 a 4-HNE je zprostředkováno výhradně TRPA1 receptory (Andersson et al., 2008; Trevisani et al., 2007), avšak přesný mechanismus, kterým k tomu dochází, zůstává stále nejasný.

Při modulaci TRPA1 se také uplatňuje  $PIP_2$ . Jeho modulační funkce je však také diskutována a dosavadní studie poskytují často protikladné výsledky a interpretace.  $PIP_2$  inhibuje TRPA1 kanál v kontextu celé buňky i ve vytržených membránových terčících (Kim et al., 2008). To potvrzuje interpretaci studie s termotaxí larev octomilek (viz. funkce TRPA1 jako teplotního senzoru) a hypotézy, že snížená koncentrace membránového  $PIP_2$  (například PLC indukovanou degradací  $PIP_2$ ) by mohla vést k aktivaci kanálu (Kim et al., 2008). Jiná studie naopak potvrdila roli  $PIP_2$  spolu s  $Mg^{2+}$ -ATP jako pozitivního modulátoru TRPA1 při desenzitizaci (Dai et al., 2007). Tyto studie naznačují, že  $PIP_2$  má zřejmě více modulačních účinků a objasnění jeho úlohy v aktivaci TRPA1 bude vyžadovat další podrobné studium.

## ***Funkce TRPA1 jako teplotního senzoru***

Fyziologická funkce TRPA1 receptoru v mechanismech detekce teplotních podnětů je i přes značné badatelské úsilí stále kontroverzní. Několik studií teplotní aktivaci TRPA1 (pod 17 °C) potvrdilo (Story et al., 2003), jiné laboratoře tento způsob aktivace nepotvrdily (Jordt et al., 2004). Možné vysvětlení by mohla poskytnout studie na larvách octomilek, které pro svůj optimální vývoj preferují teplotu 18 °C a dokáží rozlišit i velmi malé teplotní rozdíly (1 °C). U termo - TRP kanálů dosud nebyla potvrzena schopnost detekce přímo na této teplotní hladině. Nabízí se otázka, zdali za detekci těchto „nebolestivých“ teplot je zodpovědná právě rodina TRPA kanálů. Studie termotaxe larev octomilky naznačují, že tomu tak zřejmě může být. Jedině knock - out TRPA1 genu ze 13 zástupců TRP receptorů identifikovaných u larev octomilky způsobil jejich neschopnost najít si pro svůj vývoj optimální místo o teplotě 18 °C (Kwon et al., 2008). Fenotyp TRPA1<sup>-/-</sup> dokázal rozlišit stejně jako wild type 18 °C od hladiny v rozmezí 14 - 16 °C a dokázal to i v intervalu 26 - 32 °C, i když v menší míře. Wild type TRPA1 byl nezbytný pouze pro rozlišovací schopnost v rozmezí 18 - 24 °C. Tyto výsledky však nejsou v souladu s dosavadní evidencí: V heterologních expresních systémech byly naměřeny rozdílné hodnoty aktivace dTRPA1. Například u CHO buněk je práh aktivace dTRPA1 < 27 °C a u oocytů (*Xenopus*) < 24-29 °C (Viswanath et al., 2003). Možným vysvětlením je nepřímá aktivace TRPA1 prostřednictvím metabotropních receptorů spřažených s G proteiny. V poslední době se objevila studie poukazující na funkci TRPA1 jako chladového receptoru na nervu vagu (Fajardo et al., 2008). Studená teplota aplikovaná na nervus vagus spouští obranné mechanismy a vede k termoregulaci.

To je další důkaz, že TRPA1 je teplotně aktivovaný receptor, ale jakým mechanismem k tomu dochází, není jasné. Rozdílné výsledky studií o teplotní aktivaci zatím naznačují, že TRPA1 je aktivován jak přímým působením (jako reakce na škodlivé podněty), tak nepřímým mechanismem.

## ***Mechanosenzorická funkce TRPA1***

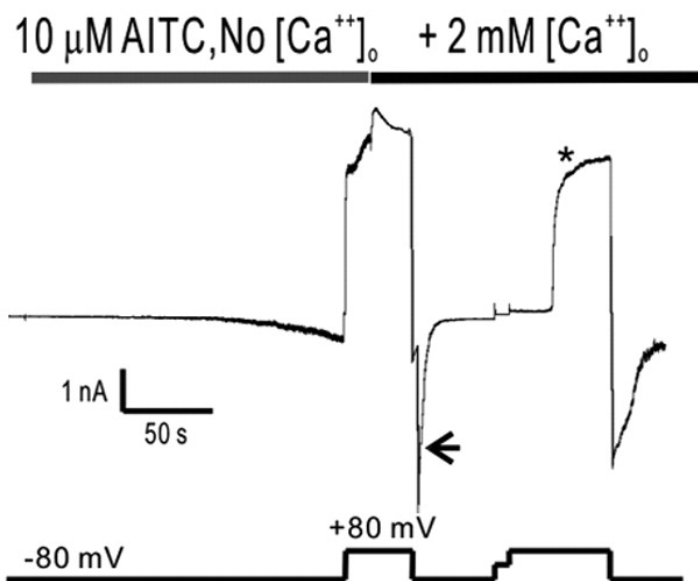
Zdali se TRPA1 podílí na mechanotransdukci, případně jakým způsobem k tomu dochází, je dalším otazníkem týkajícím se funkce tohoto receptoru. Jeho exprese byla potvrzena na vláskových buňkách vnitřního ucha, kde dochází k transformaci vibrací z vnějšího prostředí na elektrický impulz a jeho přenos do centrálního nervového systému (Corey et al., 2004; Nagata et al., 2005). Přesný mechanismus tohoto procesu není znám, a proto se uvažovalo o možné úloze TRPA1. Knock - out TRPA1 genu jednoznačně neprokázal zhoršené transdukční vlastnosti vláskových

buněk u pokusných zvířat (Bautista et al., 2006; Kwan et al., 2006), projevila se však zhoršená vnímavost k bolestivým podnětům aplikovaným na kůži (Kwan et al., 2006). Mechanosenzorickou funkci TRPA1 kanálu potvrzuje i aktivace hypertonickým roztokem (Zhang et al., 2008). To může mít zásadní význam při některých patofyziologických stavech. Například zvýšená osmolarita (400 mOsmol/l) může být důsledkem diabetu, což je dostatečná hodnota pro aktivaci TRPA1 (McDonnell et al., 2005). Objasnění mechanismu aktivace TRPA1 by proto mohlo mít velký význam při léčbě projevů této nemoci, jež je často doprovázena chronickou bolestí.

Zdali je hypertonický roztok agonista či částečný agonista a jakým mechanismem tímto způsobem k aktivaci dochází, zůstává otázkou. Citlivost TRPA1 k mechanickým podnětům potvrzuje i studie na primárních aferentních senzoričských neuronech. Neurony, které exprimovaly TRPA1 kanály (tj. byly citlivé na skořicový aldehyd), měly při navozeném zánětu snížen teplotní i mechanický práh. U neuronů, které neprokazovaly citlivost ke skořicovému aldehydu, došlo pouze ke snížení prahu teplotní aktivace, nikoliv prahu aktivace mechanické (Dunham et al., 2008).

### ***TRPA1 je napět'ové závislý***

Mechanismus aktivace TRPA1 je, podobně jako je tomu u některých dalších TRP kanálů, napět'ově závislý. S přítomností extracelulárních  $\text{Ca}^{2+}$  iontů a při hodnotě membránového potenciálu  $-80$  mV vykazuje časový průběh aktivace TRPA1 kanálu několik jasně odlišitelných fází. Po aplikaci agonisty dochází k pomalému nástupu aktivace, která je postupně stále silnější (potenciace) a po dosažení maxima začne klesat (inaktivace). Poté trvá nějaký čas (řádově desítky sekund) než je kanál opět aktivovatelný a následující aplikace již nevyvolají plnou aktivaci (tachyfylaxe) (obr. 9C). Garcia-Anoveros a spol. (2007) prokázali, že změna membránového potenciálu má na tuto aktivační charakteristiku významný vliv. Aplikace  $2$  mM  $\text{Ca}^{2+}$  iontů při  $-80$  mV způsobí otevření TRPA1 kanálu. Pokud při jeho otevření dojde k depolarizaci, nedojde k inaktivaci a kanál zůstane otevřen. Naopak, když dojde k inaktivaci kanálu při  $-80$  mV a poté je buňka depolarizována, cca po třiceti sekundách se kanál znovu sám otevře (obr. 10). Za fyziologických podmínek by se tento děj mohl uplatňovat tak, že v případě neškodlivého podnětu by nedošlo k dosažení požadované hodnoty depolarizace a kanály by se zavřely. K potenciaci by mohlo podle uvedeného modelu docházet po navázání  $\text{Ca}^{2+}$  na specifické místo v póru či jiném místě, což by mělo za následek inaktivaci kanálu. Roli tohoto specifického místa může hrát právě nedávno identifikovaná EF-hand CBD doména popsaná výše v textu.



**Obr.10.** Aplikace AITC bez přítomnosti externího  $Ca^{2+}$  vyvolá otevření TRPA1 kanálu bez plné aktivace. Přidání  $Ca^{2+}$  způsobí rychlou aktivaci. Změna membránového potenciálu z  $-80mV$  na  $+80mV$  (šipka) vyvolá inaktivaci. Kanály, které byly při  $-80mV$  inaktivovány se po změně polarity cca po 30 s znovu otevřou (hvězdička).

## Perspektivy dalšího studia mechanismů aktivace TRP iontových kanálů

Oblast vnitřního póru TRP iontových kanálů, která je tvořena čtyřmi S5-P-S6 proteinovými úseky receptorových podjednotek, je nejvíce konzervovanou doménou. Lze tedy předpokládat, že tato oblast bude určovat základní a univerzální vlastnosti iontového kanálu, jako jsou selektivita, propustnost a mechanismus otvírání/zavírání (tzv. gating). Funkční rozdíly mezi jednotlivými receptory by mohly být tak zajišťovány rozdíly mezi jejich cytoplazmatickými konci. Skutečně, v případě oblasti póru TRPV1 receptoru není například pochyb o podobnosti konzervované sekvence TIGMGD v oblasti hydrofobní kličky (P-loop) s aminokyselinovým úsekem TI/VGYGD, jenž má prokazatelně úlohu selektivního filtru u draselných kanálů (KcsA, Shaker, MthK, GIRK) (Ferrer-Montiel et al., 2004; Garcia-Martinez et al., 2000). Tato doména obsahuje negativní aminokyselinové zbytky (D646, E648, E651), které vytvářejí na vnější části vestibulu póru tetramerního TRPV1 kanálu negativní prstenec koordinující propustnost a průchod kladně nabitých iontů (Owsianik et al., 2006a; Owsianik et al., 2006b; Voets et al., 2004b). Je také pravděpodobné, že krátká konzervovaná  $\alpha$ -helikální doména v oblasti hydrofobní kličky vnějšího póru (L630-F640 v případě TRPV1) může hrát univerzální úlohu v mechanismech otvírání/zavírání TRP iontových kanálů (Myers et al., 2008), což oslabuje současné hypotézy vycházející z předpokladu, že tuto úlohu zastává vnitřní oblast helixu 6. transmembránové domény. Naproti tomu nedávné studie prokazují, že i malé rozdíly v aminokyselinové sekvenci vnitřní oblasti S6 teplotně aktivovaných TRP iontových kanálů mohou mít dalekosáhlý funkční význam a že v procesu otvírání/zavírání se doména S6 významně uplatňuje (Grandl et al., 2008; Susankova et al., 2007).

Mechanismy aktivace teplotně citlivých TRP iontových kanálů ještě zdaleka není možné považovat za objasněné. Snaha porozumět molekulární podstatě aktivace TRP receptorů není jen prestižní výzvou současné strukturální biologie, ale především nezbytným předpokladem k hledání farmakologických přístupů k selektivnímu ovlivnění (Garcia-Anoveros and Nagata, 2007; Gaudet, 2008). Na rozdíl od jiných ligandem otvíraných receptorů je proces polymodální aktivace TRP kanálů natolik „alosterický“, že ani případná znalost struktury celého proteinového komplexu na atomární úrovni nebude zřejmě postačující pro vysvětlení mnoha fyziologických účinků. Některé nejnovější strukturálně-funkční studie např. poukazují na možnou interakci obou cytoplazmatických konců v průběhu aktivace a následné desenzitizace TRPV1 receptoru (Gaudet, 2008; Jung et al., 1999; Jung et al., 2002; Lishko et al., 2007; Novakova-Tousova et al., 2007). Tato interakce může



zodpovídat za změny v procesu otvírání iontového kanálu a současně ovlivňovat vazebné místo pro agonistu (pro přehledný článek viz také přílohu (Vyklíčky et al., 2008)). Uvedená hypotéza je v současné době předmětem podrobné studie, jež využívá molekulárně biologické, elektrofyziologické a fluorescenční přístupy a jejíž výsledky mohou mít širší význam pro obecné pochopení dosud neznámých mechanismů, které zodpovídají za aktivaci TRP iontových kanálů.

## Seznam literatury

- Andersson DA, Gentry C, Moss S, Bevan S (2008). Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J Neurosci* **28**, 2485-2494.
- Bandell M, Macpherson LJ, Patapoutian A (2007). From chills to chilis: mechanisms for thermosensation and chemesthesis via thermoTRPs. *Curr Opin Neurobiol* **17**, 490-497.
- Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, Yamoah EN, Basbaum AI, Julius D (2006). TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* **124**, 1269-1282.
- Bhave G.W, Zhu H, Wang DJ, Brasier G, Oxford S, Gereau R. (2002) cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. *Neuron*. **35**:721-31.
- Bhave G, Hu HJ, Glauner KS, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS, Gereau RWt (2003). Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12480-12485.
- Bley KR, Hunter JC, Eglen RM, Smith JA (1998). The role of IP prostanoid receptors in inflammatory pain. *Trends Pharmacol Sci* **19**, 141-147.
- 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.
- 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.
- Chung MK, Guler AD, Caterina MJ (2008). TRPV1 shows dynamic ionic selectivity during agonist stimulation. *Nat Neurosci* **11**, 555-564.
- Chung MK, Lee H, Caterina MJ (2003). Warm temperatures activate TRPV4 in mouse 308 keratinocytes. *J Biol Chem* **278**, 32037-32046.
- Clapham DE (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature* **426**, 517-524.
- Corey DP, Garcia-Anoveros J, Holt JR, Kwan KY, Lin SY, Vollrath MA, Amalfitano A, Cheung EL, Derfler BH, Duggan A, Geleoc GS, Gray PA, Hoffman MP, Rehm HL, Tamasauskas

- D, Zhang DS (2004). TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature* **432**, 723-730.
- Correll CC, Phelps PT, Anthes JC, Umland S, Greenfeder S (2004). Cloning and pharmacological characterization of mouse TRPV1. *Neurosci Lett* **370**, 55-60.
- Couture RM, Harrisson RM, Vianna F (2001). Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol.* **429**:161-76.
- Dai Y, Wang S, Tominaga M, Yamamoto S, Fukuoka T, Higashi T, Kobayashi K, Obata K, Yamanaka H, Noguchi K (2007). Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. *J Clin Invest* **117**, 1979-1987.
- Dhaka A, Viswanath V, Patapoutian A (2006). Trp ion channels and temperature sensation. *Annu Rev Neurosci* **29**, 135-161.
- Di Marzo V, De Petrocellis L, Sepe N, Buono A (1996). Biosynthesis of anandamide and related acylethanolamides in mouse J774 macrophages and N18 neuroblastoma cells. *Biochem J* **316 (Pt 3)**, 977-984.
- Doerner JF, Gisselmann G, Hatt H, Wetzel CH (2007). Transient receptor potential channel A1 is directly gated by calcium ions. *J Biol Chem* **282**, 13180-13189.
- Dunham JP, Kelly S, Donaldson LF (2008). Inflammation reduces mechanical thresholds in a population of transient receptor potential channel A1-expressing nociceptors in the rat. *Eur J Neurosci* **27**, 3151-3160.
- Fajardo O, Meseguer V, Belmonte C, Viana F (2008). TRPA1 channels mediate cold temperature sensing in mammalian vagal sensory neurons: pharmacological and genetic evidence. *J Neurosci* **28**, 7863-7875.
- Ferrer-Montiel A, Garcia-Martinez C, Morenilla-Palao C, Garcia-Sanz N, Fernandez-Carvajal A, Fernandez-Ballester G, Planells-Cases R (2004). Molecular architecture of the vanilloid receptor. Insights for drug design. *Eur J Biochem* **271**, 1820-1826.
- Garcia-Anoveros J, Nagata K (2007). TRPA1. *Handb Exp Pharmacol*, 347-362.
- 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.
- Gaudet R (2008). TRP channels entering the structural era. *J Physiol*, 0: jphysiol.2008.155812v155811.
- 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, Louis JC, Treanor JJ (2004). Molecular determinants of vanilloid sensitivity in TRPV1. *J Biol Chem* **279**, 20283-20295.

- Grandl J, Hu H, Bandell M, Bursulaya B, Schmidt M, Petrus M, Patapoutian A (2008). Pore region of TRPV3 ion channel is specifically required for heat activation. *Nat Neurosci*.
- Gunthorpe MJ, Harries MH, Prinjha RK, Davis JB, Randall A (2000). Voltage- and time-dependent properties of the recombinant rat vanilloid receptor (rVR1). *J Physiol* **525 Pt 3**, 747-759.
- Hayes P, Meadows HJ, Gunthorpe MJ, Harries MH, Duckworth DM, Cairns W, Harrison DC, Clarke CE, Ellington K, Prinjha RK, Barton AJ, Medhurst AD, Smith GD, Topp S, Murdock P, Sanger GJ, Terrett J, Jenkins O, Benham CD, Randall AD, Gloger IS, Davis JB (2000). Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1. *Pain* **88**, 205-215.
- Hinman A, Chuang HH, Bautista DM, Julius D (2006). TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 19564-19568.
- Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Hogestatt ED, Meng ID, Julius D (2004). Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* **427**, 260-265.
- Jordt SE, Julius D (2002). Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. *Cell* **108**, 421-430.
- Jordt SE, Tominaga M, Julius D (2000). Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8134-8139.
- Julius D, Basbaum AI (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature* **413**, 203-210.
- Jung J, Hwang SW, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Kim WB, Kim D, Oh U (1999). Capsaicin binds to the intracellular domain of the capsaicin-activated ion channel. *J Neurosci* **19**, 529-538.
- 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.
- Kim D, Cavanaugh E, Simkin D (2008). Inhibition of Transient Receptor Potential A1 by Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Am J Physiol Cell Physiol*.
- Klein RM, Ufret-Vincenty CA, Hua L, Gordon SE (2008). Determinants of molecular specificity in phosphoinositide regulation: PI(4,5)P<sub>2</sub> is the endogenous lipid regulating TRPV1. *J Biol Chem*.
- Kuffler DP, Lyfenko A, Vyklicky L, Vlachova V (2002). Cellular mechanisms of nociception in the frog. *J Neurophysiol* **88**, 1843-1850.
- Kwan KY, Allchorne AJ, Vollrath MA, Christensen AP, Zhang DS, Woolf CJ, Corey DP (2006).

- TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron* **50**, 277-289.
- Kwon Y, Hofmann T, Montell C (2007). Integration of phosphoinositide- and calmodulin-mediated regulation of TRPC6. *Mol Cell* **25**, 491-503.
- Kwon Y, Shim HS, Wang X, Montell C (2008). Control of thermotactic behavior via coupling of a TRP channel to a phospholipase C signaling cascade. *Nat Neurosci*.
- Latorre R, Brauchi S, Orta G, Zaelzer C, Vargas G (2007). ThermoTRP channels as modular proteins with allosteric gating. *Cell Calcium* **42**, 427-438.
- 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, Zhang C, Qin F (2005). Functional recovery from desensitization of vanilloid receptor TRPV1 requires resynthesis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Neurosci* **25**, 4835-4843.
- Lukacs V, Thyagarajan B, Varnai P, Balla A, Balla T, Rohacs T (2007). Dual regulation of TRPV1 by phosphoinositides. *J Neurosci* **27**, 7070-7080.
- Macpherson LJ, Dubin AE, Evans MJ, Marr F, Schultz PG, Cravatt BF, Patapoutian A (2007). Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature* **445**, 541-545.
- 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.
- Macpherson LJ, Hwang SW, Miyamoto T, Dubin AE, Patapoutian A, Story GM (2006). More than cool: promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds. *Mol Cell Neurosci* **32**, 335-343.
- Manning DC, Raja SN, Meyer RA, Campbell JN (1991). Pain and hyperalgesia after intradermal injection of bradykinin in humans. *Clin Pharmacol Ther*. **50**:721-9.
- McDonnell CM, Pedreira CC, Vadamalayan B, Cameron FJ, Werther GA (2005). Diabetic ketoacidosis, hyperosmolarity and hypernatremia: are high-carbohydrate drinks worsening initial presentation? *Pediatr Diabetes* **6**, 90-94.
- McEachern AE, Shelton ER, Bhakta S, Obernolte R, Bach C, Zuppan P, Fujisaki J, Aldrich RW, Jarnagin K. (1991). Expression cloning of a rat B2 bradykinin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **88**:7724-8.
- 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.
- Moiseenkova-Bell VY, Stanciu LA, Serysheva, II, Tobe BJ, Wensel TG (2008). Structure of

- TRPV1 channel revealed by electron cryomicroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 7451-7455.
- Montell C (2005). The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* **2005**, re3.
- Moriyama T, Higashi T, Togashi K, Iida T, Segi E, Sugimoto Y, Tominaga T, Narumiya S, Tominaga M (2005). Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. *Mol Pain* **1**, 3.
- Myers BR, Bohlen CJ, Julius D (2008). A yeast genetic screen reveals a critical role for the pore helix domain in TRP channel gating. *Neuron* **58**, 362-373.
- Nagata K, Duggan A, Kumar G, Garcia-Anoveros J (2005). Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *J Neurosci* **25**, 4052-4061.
- Novakova-Tousova K, Vyklicky L, Susankova K, Benedikt J, Samad A, Teisinger J, Vlachova V (2007). Functional changes in the vanilloid receptor subtype 1 channel during and after acute desensitization. *Neuroscience* **149**, 144-154.
- 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 U S A* **100**, 8002-8006.
- Ohta T, Imagawa T, Ito S (2008). Novel gating and sensitizing mechanism of capsaicin receptor (TRPV1): tonic inhibitory regulation of extracellular sodium through the external protonation sites on TRPV1. *J Biol Chem* **283**, 9377-9387.
- Olah Z, Szabo T, Karai L, Hough C, Fields RD, Caudle RM, Blumberg PM, Iadarola MJ (2001). Ligand-induced dynamic membrane changes and cell deletion conferred by vanilloid receptor 1. *J Biol Chem* **276**, 11021-11030.
- Owsianik G, D'Hoedt D, Voets T, Nilius B (2006a). Structure-function relationship of the TRP channel superfamily. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **156**, 61-90.
- Owsianik G, Talavera K, Voets T, Nilius B (2006b). Permeation and selectivity of TRP channels. *Annu Rev Physiol* **68**, 685-717.
- 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.
- Pesquero, J.B., J.L. Pesquero, S.M. Oliveira, A.A. Roscher, R. Metzger, D. Ganten, and M. Bader. 1996. Molecular cloning & functional characterization of a mouse bradykinin B1 receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 224:281.
- Phelps PT, Anthes JC, Correll CC (2005). Cloning and functional characterization of dog transient receptor potential vanilloid receptor-1 (TRPV1). *Eur J Pharmacol* **513**, 57-66.
- Prescott ED, Julius D (2003). A modular PIP2 binding site as a determinant of capsaicin receptor

- sensitivity. *Science* **300**, 1284-1288.
- Rohacs T, Nilius B (2007). Regulation of transient receptor potential (TRP) channels by phosphoinositides. *Pflugers Arch* **455**, 157-168.
- 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.
- Ryu S, Liu B, Qin F (2003). Low pH potentiates both capsaicin binding and channel gating of VR1 receptors. *J Gen Physiol* **122**, 45-61.
- Ryu S, Liu B, Yao J, Fu Q, Qin F (2007). Uncoupling proton activation of vanilloid receptor TRPV1. *J Neurosci* **27**, 12797-12807.
- Salazar H, Llorente I, Jara-Oseguera A, Garcia-Villegas R, Munari M, Gordon SE, Islas LD, Rosenbaum T (2008). A single N-terminal cysteine in TRPV1 determines activation by pungent compounds from onion and garlic. *Nat Neurosci* **11**, 255-261.
- Savidge J, Davis C, Shah K, Colley S, Phillips E, Ranasinghe S, Winter J, Kotsonis P, Rang H, McIntyre P (2002). Cloning and functional characterization of the guinea pig vanilloid receptor 1. *Neuropharmacology* **43**, 450-456.
- Starowicz K, Nigam S, Di Marzo V (2007). Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. *Pharmacol Ther* **114**, 13-33.
- Steen KH, Reeh PW (1993). Sustained graded pain and hyperalgesia from harmless experimental tissue acidosis in human skin. *Neurosci Lett* **154**, 113-116.
- Stein AT, Ufret-Vincenty CA, Hua L, Santana LF, Gordon SE (2006). Phosphoinositide 3-kinase binds to TRPV1 and mediates NGF-stimulated TRPV1 trafficking to the plasma membrane. *J Gen Physiol* **128**, 509-522.
- Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A (2003). ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* **112**, 819-829.
- Susankova K, Ettrich R, Vyklicky L, Teisinger J, Vlachova V (2007). Contribution of the putative inner-pore region to the gating of the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel (TRPV1). *J Neurosci* **27**, 7578-7585.
- Tewksbury JJ, Nabhan GP (2001). Seed dispersal. Directed deterrence by capsaicin in chilies. *Nature* **412**, 403-404.
- 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.
- Trevisani M, Siemens J, Materazzi S, Bautista DM, Nassini R, Campi B, Imamachi N, Andre E,

- Patacchini R, Cottrell GS, Gatti R, Basbaum AI, Bunnett NW, Julius D, Geppetti P (2007). 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13519-13524.
- Viswanath V, Story GM, Peier AM, Petrus MJ, Lee VM, Hwang SW, Patapoutian A, Jegla T (2003). Opposite thermosensor in fruitfly and mouse. *Nature* **423**, 822-823.
- Voets T, Droogmans G, Wissenbach U, Janssens A, Flockerzi V, Nilius B (2004a). The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* **430**, 748-754.
- Voets T, Janssens A, Droogmans G, Nilius B (2004b). Outer pore architecture of a Ca<sup>2+</sup>-selective TRP channel. *J Biol Chem* **279**, 15223-15230.
- Vyklicky L, Novakova-Tousova K, Benedikt J, Samad A, Touska F, Vlachova V (2008). Calcium-dependent desensitization of vanilloid receptor TRPV1: a mechanism possibly involved in analgesia induced by topical application of capsaicin. *Physiol Res*.
- Watanabe H, Vriens J, Suh SH, Benham CD, Droogmans G, Nilius B (2002). Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *J Biol Chem* **277**, 47044-47051.
- 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 U S A* **97**, 13889-13894.
- Zhang X, Huang J, McNaughton PA (2005). NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *Embo J* **24**, 4211-4223.
- Zhang XF, Chen J, Faltynek CR, Moreland RB, Neelands TR (2008). Transient receptor potential A1 mediates an osmotically activated ion channel. *Eur J Neurosci* **27**, 605-611.



## Příloha

V příloze jsou uvedeny experimentální výsledky autora předložené bakalářské práce, které byly získány v rámci jeho studijního pobytu v oddělení buněčné neurofyziologie Fyziologického ústavu AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, Praha 4.

Příloha obsahuje:

1. Výsledky studia zaměřeného na a) charakterizaci aktivační kinetiky rekombinantních TRPV1 a TRPA1 iontových kanálů exprimovaných v HEK293T buňkách pomocí techniky měření intracelulárního vápníku fluorescenční sondou Fura2, b) ověření homomerní struktury iontových kanálů TRPV4 a TRPV6 pomocí techniky rezonančního přenosu excitační energie mezi fluorescenčně značenými podjednotkami receptorů. Tyto výsledky byly prezentovány formou plakátového sdělení na 6. mezinárodní konferenci České společnosti pro neurovědy, konané 19.-20.11. 2007 v Praze.
2. Přehledný článek publikovaný v odborném mezinárodním časopise *Physiological Research*, 57, Supplement 3, 2008, (<http://www.biomed.cas.cz/physiolres/pdf/prepress/1479.pdf>), který shrnuje současné poznatky týkající se buněčných a molekulárních mechanismů desenzitizace TRPV1 receptoru a na němž autor bakalářské práce spolupracoval.