

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemické a biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Štěpán Chvojka

**Teplotně aktivované TRP iontové kanály
v nociceptivních neuronech**

Thermally gated TRP channels in nociceptive neurons

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Viktorie Vlachová, DrSc.

Praha 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce, ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu

V Praze, 20.8.2013

Štěpán Chvojka.....

Poděkování:

Poděkování patří Mgr. Štěpáně Boukalové a RNDr. Viktorii Vlachové, DrSc. za jejich rady, pomoc a zejména trpělivost při vypracování bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat rodině za podporu a pochopení.

Obsah

Abstrakt	5
Abstract	5
Seznam použitých zkratk.....	6
Úvod	7
Nociceptivní neurony a nociceptory	8
Nocicepce – aktivace nociceptivních neuronů	8
TRP iontové kanály	10
Teplotně aktivované TRPV receptory	11
TRPV1	12
TRPV2.....	15
TRPV3.....	16
TRPV4.....	17
Teplotně aktivované TRPM receptory.....	21
TRPM8	21
TRPM3	22
Teplotně aktivovaný TRPA receptor.....	24
TRPA1	24
TRP kanály s dosud jen nepřímo prokázanou funkcí teplotních senzorů	27
TRPC5	27
TRPM5	27
Závěr.....	29
Seznam použité literatury:.....	30

Abstrakt

Transdukční iontové kanály zajišťují převod vnějších podnětů různých modalit na elektrickou aktivitu sensorických neuronů. Prostřednictvím těchto specializovaných proteinů je organismus informován o aktuálním stavu okolního prostředí a může tak reagovat na potenciální nebezpečí, které ohrožuje jeho integritu. Mimořádně důležitou úlohu v transdukcii tepelných podnětů zajišťují iontové kanály skupiny TRP (**t**ransient **r**eceptor **p**otential) receptorů, jejichž molekulární struktura byla v posledních patnácti letech identifikována a na něž se soustředila pozornost zejména v souvislosti se studiem mechanismů bolesti. Molekulárně biologické techniky umožnily studovat funkci těchto iontových kanálů ve vztahu k jejich struktuře, objasnit jejich fyziologickou úlohu a zjišťovat možnosti jejich farmakologického ovlivnění. Cílem práce je formou literární rešerše zpracovat souhrnný přehled současných poznatků o funkčních vlastnostech a možné fyziologické úloze specifické podskupiny savčích TRP iontových kanálů, které jsou specificky aktivovány teplotními podněty: teplem a chladem.

Klíčová slova: teplotlivé TRP iontové kanály, bolest, hyperalgie, nociceptory, genový knockout

Abstract

Transduction ion channels are gated in response to a variety of external stimuli and this process is critical for the proper functioning of sensory neurons. These specialized proteins enable the survival of any organism, which depends on having adequate information about the external environment. The thermosensitive TRP (transient receptor potential) ion channels, whose molecular structure has been identified during last decades, enable the transduction of thermal stimuli in primary nociceptive neurons. During the last decade, 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 physiological roles. The aim of this bachelor thesis is to give an overview of recent evidence regarding the functional and physiological properties of sensory-neuron specific mammalian TRP ion channels that are activated by thermal stimuli: heat and cold.

Key words: thermosensitive TRP ion channels, pain, hyperalgesia, nociceptors, gene knockout

Seznam použitých zkratek

15d-PGJ ₂	15-deoxy-delta-12,14-prostaglandin J2
2-APB	2-aminoethoxydifenylborát
4-HNE	4-hydroxynonenal
4 α -PDD	4 α -phorbol 12,13-didekanoát
ADH	antidiuretický hormon
AITC	allylisothiokyanát
ANKTM1	„ankyrin-like protein with transmembrane domains“
ATP	adenosintrifosfát
BAA	bisandrografolid A
CaM	kalmodulin
CFA	Freundovo kompletní adjuvans
CMR1	„cold mentol receptor“
CNS	centrální nervová soustava
DAG	1,2-diacylglycerol
dDVAP	1-desamino-8-D-arginin vasopresin
DKO	„double knockout“
DRG	„dorsal root ganglion“, ganglia zadních kořenů míšních
EET	epoxyeikosatrienová kyselina
IgG	imunoglobulin třídy G
IP3	inositol 1,4,5-trifosfát
KO	„knockout“
NGF	nervový růstový faktor
PGE2	prostaglandin E2
PI3K	fosfatidylinositol 3-kináza
PIP2	fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát
PIRT	„phosphoinositide-interacting regulator of TRP“
PLA2	fosfolipáza A2
PS	pregnenolon sulfát
TG	trigeminální ganglia
TRP	„transient receptor potential“
VRL-1	„vanilloid receptor-like 1 protein“

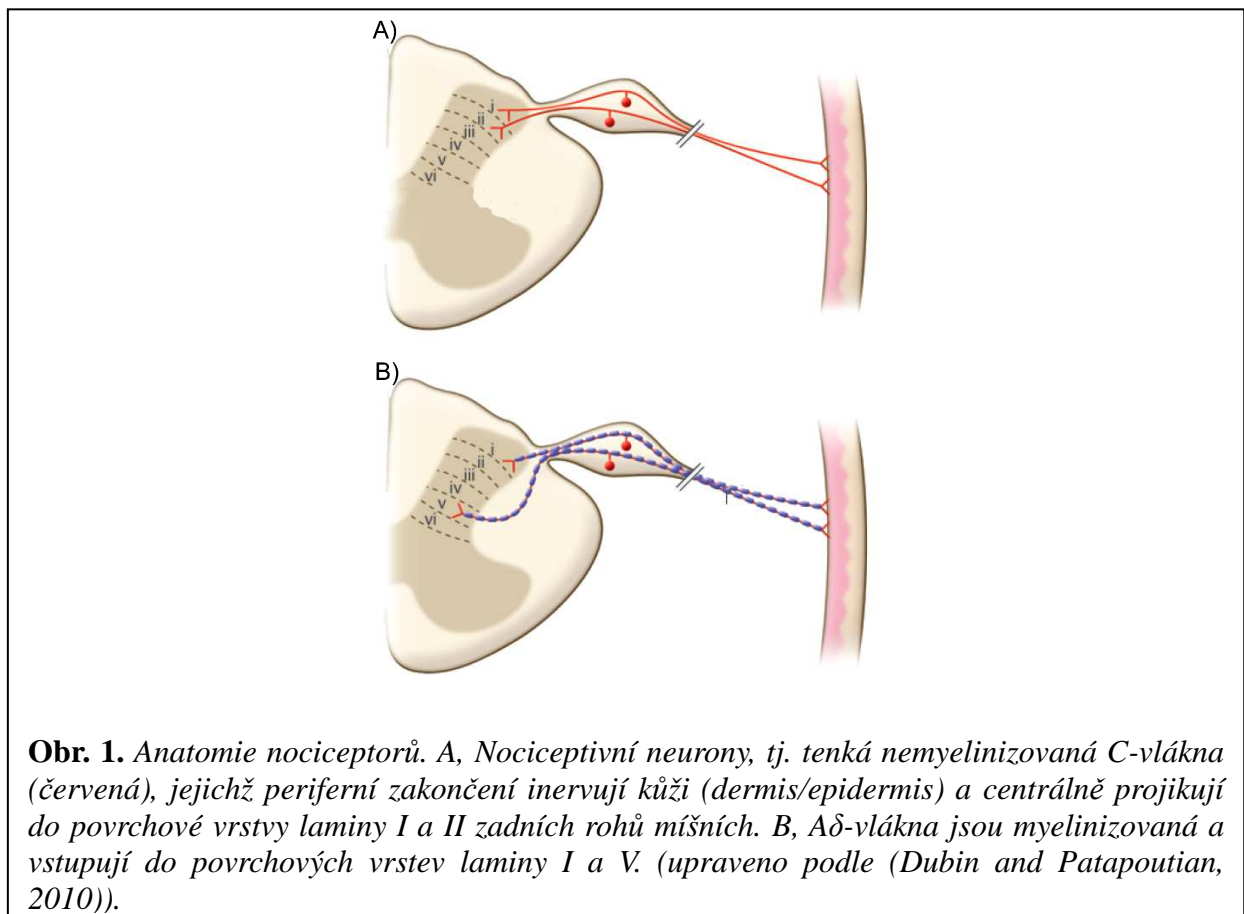
Úvod

Receptory, neboli biologické přijímače signálů, jsou důležitou součástí živých organismů, jejichž základní vlastností je citlivost vůči vnitřním a vnějším změnám. Speciální skupinou receptorů jsou nociceptory, které detekují škodlivé podněty a převádějí je na elektrický signál vedený senzoryckými neurony dále do vyšších mozkových center. Vlákna, kterými je tento signál veden, jsou buď malá neymelizovaná C vlákna, nebo středně velká myelinizovaná A δ vlákna. Těla senzoryckých neuronů inervujících obličej a hlavu jsou umístěna v trigeminálních a senzoryckých gangliích, zatímco těla senzoryckých neuronů inervujících zbytek těla se nachází v gangliích zadních kořenů míšních. Na konci minulého tisíciletí byl vyklonován první z řady teplotně aktivovaných iontových kanálů, které na nociceptorech představují transdukční molekuly zprostředkovávající přeměnu teplotních, mechanických a chemických podnětů na elektrický signál. Podtřída těchto teplotně aktivovaných receptorů se nazývá „transient receptor potential“, TRP. Předložená práce se soustředí na teplotně aktivované TRP iontové kanály a shrnuje jejich dosavadní zjištěné fyziologické funkce.

Nociceptivní neurony a nociceptory

Nocicepce – aktivace nociceptivních neuronů

Zatímco vysoce individuální rozdíly ve vnímání bolesti jsou závislé na subjektivním zpracování a abstrakci aferentních vstupů v centrálním nervovém systému, mezi podnětem a vjemem bolesti dochází k řadě objektivně rozpoznatelných a měřitelných elektrochemických dějů souhrnně nazývaných *nocicepce*. Vnější podněty vedou ke vzniku bolestivé signalizace u všech jedinců obdobným způsobem prostřednictvím specializovaných neuronů, tzv. nociceptorů. *Nociceptor* je primární aferentní sensorický neuron se specifickým nervovým zakončením, které umožňuje odlišit potenciálně poškozující podnět (tepelný, chemický a mechanický) od neškodného, a jenž dokáže tuto informaci zpracovat a dále předat do centrálního nervového systému (CNS). Primárními nociceptory, jimiž jsou některá nemyelinizovaná vlákna skupiny C a slabě myelinizovaná primární aferentní vlákna skupiny A δ , je v podobě impulzní aktivity převáděn signál do míchy a vyšších oddílů centrální nervové soustavy, kde je interpretován jako bolest.



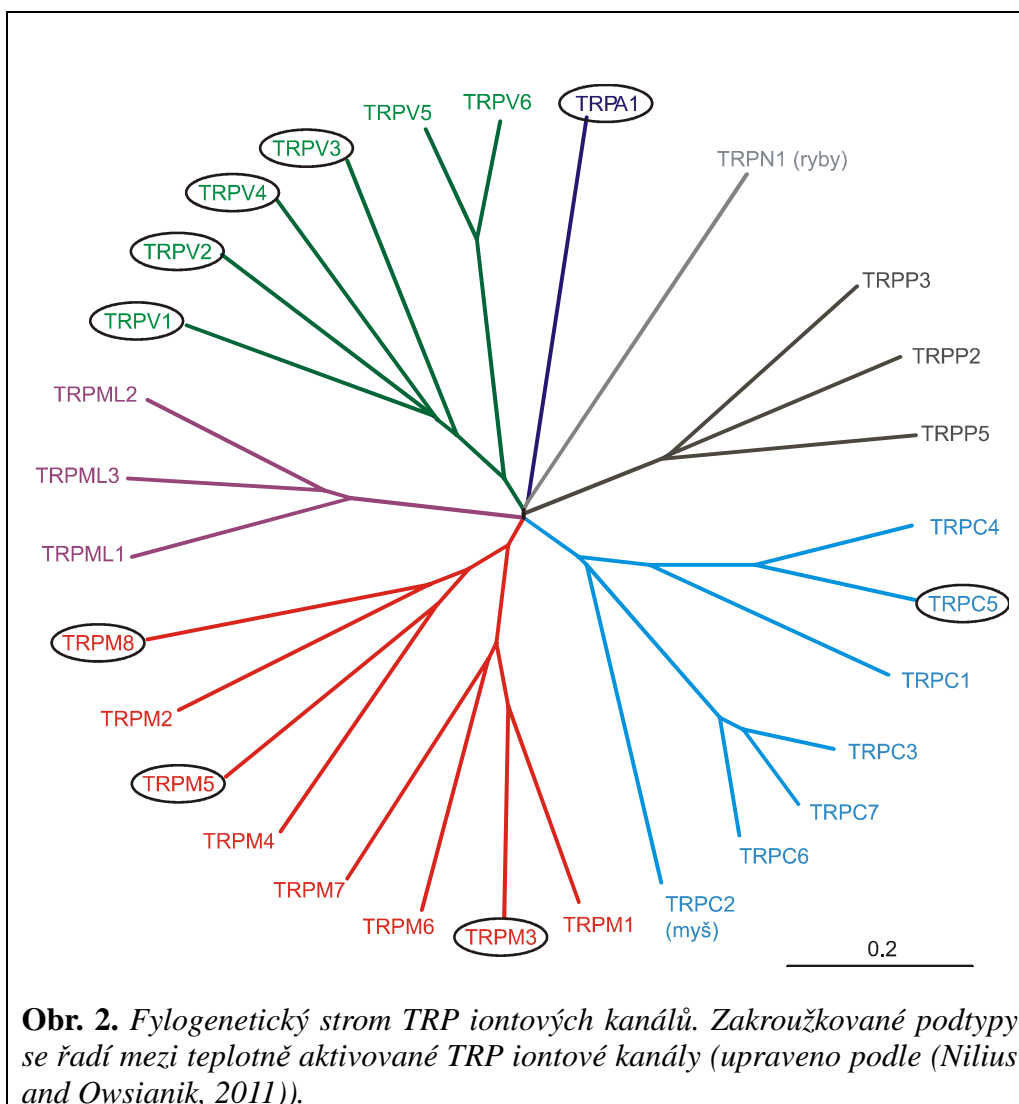
Obr. 1. Anatomie nociceptorů. A, Nociceptivní neurony, tj. tenká nemyelinizovaná C-vlákna (červená), jejichž periferní zakončení inervují kůži (dermis/epidermis) a centrálně projikují do povrchové vrstvy laminy I a II zadních rohů míšních. B, A δ -vlákna jsou myelinizovaná a vstupují do povrchových vrstev laminy I a V. (upraveno podle (Dubin and Patapoutian, 2010)).

Všichni živočichové včetně bezobratlých, jako jsou například červi nebo hmyz, vykazují obranné reakce podobné těm, které jsou u člověka provázeny bolestí. Zajištění převodu (transdukce) nocicepčních podnětů je zřejmě vývojově nejstarším obranným mechanismem, který představuje nezastupitelnou úlohu z hlediska zachování života a integrity vnitřního prostředí živočichů. Bolest může člověk vnímat různou měrou, ale vždy jde o nepříjemný vjem, který snižuje kvalitu života, a v některých případech je s ním dokonce neslučitelný. Od nepaměti bylo proto vynakládáno velké úsilí porozumět nervovým mechanismům zodpovídajícím za přenos podnětů, které vyvolávají u člověka bolest, zejména z hlediska vyhledávání nových přístupů, které by napomohly léčit chronické bolestivé stavy. V průběhu druhé poloviny minulého století bylo získáno mnoho cenných poznatků o mechanismech převodu nocicepčních podnětů na neuronech izolovaných z ganglií zadních kořenů míšních (DRG neuronů) a neuronech trigeminálních ganglií (TG) (pro přehled viz Szallasi and Blumberg, 1999).

Významným objevem, který zahájil současný směr výzkumu mechanismů nocicepce a bolesti, byla molekulární identifikace vaniloidního (kapsaicinového) receptoru TRPV1. Tento iontový kanál je specificky exprimován na membráně nociceptivních sensorických neuronů a zprostředkovává transdukcí řady bolestivých podnětů, včetně tepla, které je schopné poškodit organismus (Caterina *et al.*, 1997). V návaznosti na objev TRPV1 receptoru byla charakterizována řada dalších teplocitlivých TRP receptorů. Pro stanovení jejich významu ve vnímání tepla a jiných sensorických podnětů byly zásadní pokusy na myších s vyřazeným funkčním genem pro jednotlivé typy TRP iontových kanálů. V následujících kapitolách bude nejprve stručně charakterizována rodina TRP receptorů a poté uveden funkční význam jednotlivých teplocitlivých TRP iontových kanálů především z hlediska detekce sensorických podnětů.

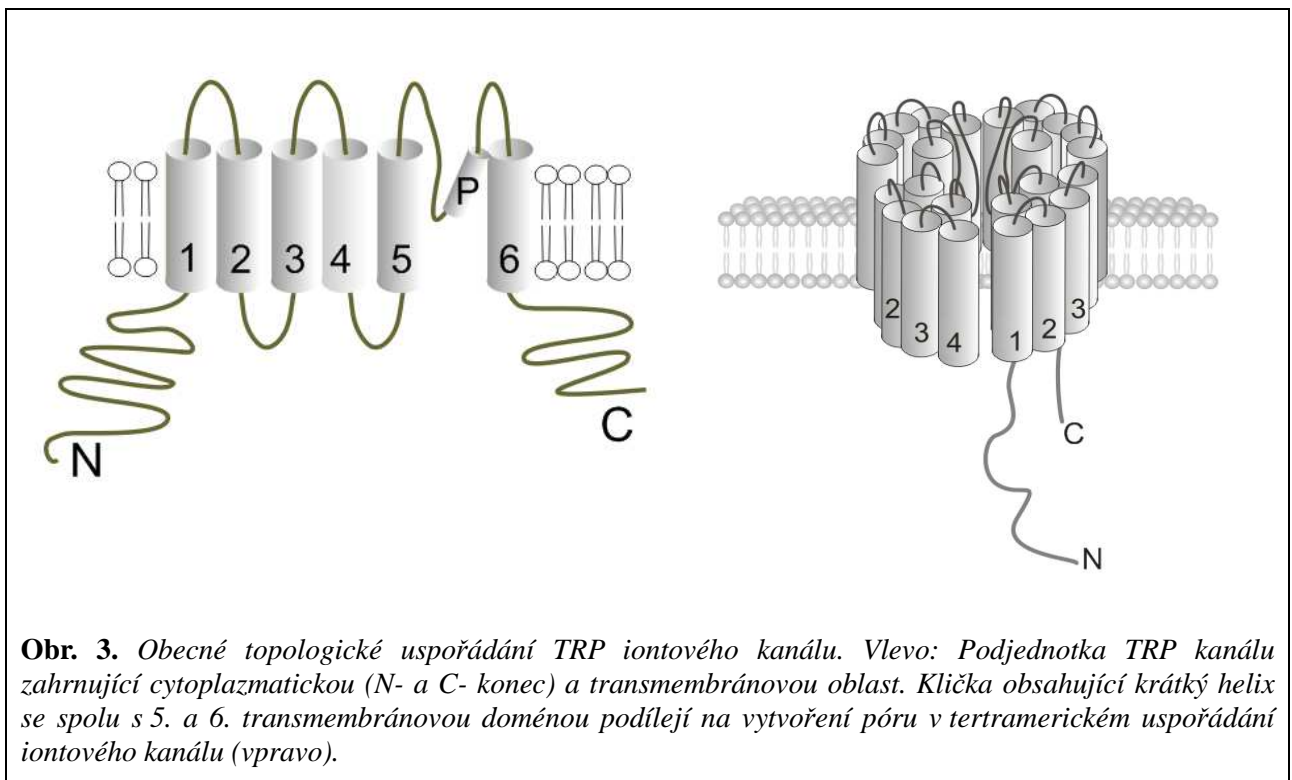
TRP iontové kanály

V současnosti je charakterizováno více než 30 členů savčí rodiny TRP iontových kanálů. Ty jsou dále rozděleny do šesti hlavních tříd podle sekvenční podobnosti: TRP ankyrinová (TRPA), TRP kanonická (TRPC), TRP melastatinová (TRPM), TRP mukolipinová (TRPML), TRP polycistinová (TRPP) a TRP vaniloidní (TRPV). TRP receptory jsou exprimovány v mnoha tkáních a typech buněk, kde jsou zapojeny do různých fyziologických procesů. Většinou jsou to neselektivní kationtové kanály v různé míře propustné pro Ca^{2+} . Mají různorodé aktivační mechanismy, mezi které patří navázání ligandu, reakce na změnu napětí nebo teploty. Jsou označovány jako polymodální receptory, protože jsou schopné odpovídat na tepelné, mechanické a chemické podněty (Nilius and Owsianik, 2011).



TRP receptory se skládají ze čtyř většinou identických podjednotek, z nichž každá obsahuje šest transmembránových domén (TM1–6) a intracelulárně uložený C- a N-konec. Mezi TM5 a TM6 je vytvořen centrální pór, který umožňuje prostup iontů skrz membránu buňky, zatímco TM1–4 společně s C- a N-koncem jsou regulačními doménami iontového kanálu.

Devět TRP iontových kanálů je teplotně aktivovaných a k jejich expresi dochází v primárních somatosenzorických neuronech. Každý z nich je aktivovaný specifickou teplotou a širokou řadou sloučenin, které jsou přítomné v potravě nebo v rostlinách vyskytujících se v přírodě.



Teplotně aktivované TRPV receptory

Podskupina vaniloidních TRP receptorů (TRPV) získala své jméno podle TRPV1 receptoru, který je aktivován některými látkami s vaniloidní skupinou (Caterina *et al.*, 1997). Dosud bylo objeveno šest podtypů TRPV receptorů (TRPV1–6). Vaniloidní TRP receptory se na základě sekvenční homologie, funkční podobnosti a propustnosti pro vápenaté ionty dělí do dvou podskupin – teplotlivé (TRPV1–4) a epitelální (TRPV5–6) TRPV receptory.

TRPV1

TRPV1 je neselektivní kationový kanál aktivovaný teplotou vyšší než 43 °C, zvýšenou koncentrací protonů ve vnějším prostředí i intracelulární alkalizací (Caterina *et al.*, 1997, Dhaka *et al.*, 2009, Tominaga *et al.*, 1998). Mezi agonisty TRPV1 receptoru se řadí některé přírodní sloučeniny s dráždivými účinky – kapsaicin, který je součástí pálivých chilli papriček, reziniferatoxin produkovaný pryšci, nebo některé komponenty jedu pavouků a medúz (Caterina *et al.*, 1997, Cuypers *et al.*, 2006, Siemens *et al.*, 2006). Důležitými endogenními aktivátory TRPV1 iontového kanálu jsou anandamid (N-arachidonoyletanolamin) a některé lipoxygenázové produkty (Hwang *et al.*, 2000, Trevisani *et al.*, 2002, Zygmunt *et al.*, 1999). TRPV1 je exprimován v myelinizovaných (A δ) a nemyelinizovaných (C) nociceptivních nervových vláknech neuronů zadních kořenů míšních, trigeminálních gangliích a jádrech bloudivého nervu (Caterina *et al.*, 2000, Helliwell *et al.*, 1998).

Aktivita TRPV1 je modulována různými intracelulárními signalizačními molekulami, jako jsou kalmodulin (CaM) či ATP. Kalmodulin se v komplexu s Ca²⁺ váže na cytozolický N-konec iontového kanálu a zprostředkovává tak desenzitizační účinky zvýšené intracelulární koncentrace vápenatých iontů. Naopak vazba ATP, který kompetuje o stejné interakční místo s CaM, vede k senzitivaci TRPV1 receptoru (Lishko *et al.*, 2007). Dalším regulátorem aktivity TRPV1 je zřejmě fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP2). Je však otázkou, zda se podílí na senzitivaci či inhibici TRPV1 receptoru. Některé výzkumné skupiny pozorovaly stimulační působení PIP2 na činnost TRPV1 iontového kanálu, jiné však jsou toho názoru, že přítomnost PIP2 v membráně snižuje aktivitu TRPV1 (Lukacs *et al.*, 2007, Prescott and Julius, 2003, Qin, 2007). V nejnovější studii byly zkoumány aktivační vlastnosti TRPV1 receptoru v arteficiálních membránách o definovaném složení. V nepřítomnosti PIP2 byl zaznamenán silný membránový proud zprostředkovaný TRPV1 receptory aktivovanými teplotou a kapsaicinem. V druhém pokusu byly do biochemicky definovaného systému přidány fosfolipidy a bylo pozorováno, jak se změní aktivační práh vyvolaný teplotou a kapsaicinem. V obou případech došlo k snížení citlivosti TRPV1. Tyto výsledky tudíž naznačují, že PIP2 inhibuje TRPV1 receptor snížením citlivosti k chemickým a teplotním podnětům (Cao *et al.*, 2013). Další otázkou je, v jakých místech PIP2 interaguje s kanálem. Předpokládalo se, že PIP2 se na receptor váže přes PIRT (phosphoinositide-interacting regulator of TRP), pomocnou podjednotku kanálu (Kim *et al.*, 2008). Nedávná studie ale účast PIRT na interakci s TRPV1 kanálem nepotvrdila. PIRT KO myši vykazovaly stejnou afinitu k PIP2 jako wild-type jedinci.

Autoři této práce předpokládají, že se PIP2 přímo váže na proximální část C-konce iontového kanálu (Ufret-Vincenty *et al.*, 2011). Nejnovější studie naznačuje interakci PIP2 přes proximální i distální C-konec kanálu a také přes N-konec, přičemž doména na N-konci a distální C-konec kanálu se překrývají s vazebným místem pro CaM (Grycova *et al.*, 2012). Zmíněná zjištění poukazují na významnou úlohu těchto domén v regulaci TRPV1 receptoru a jejich fyziologický význam je tedy nutné dále prozkoumat.

Řada zánětlivých mediátorů, jako jsou bradykinin, prostaglandiny či ATP, senzitivizují TRPV1 receptor skrze stimulaci intracelulárních signalizačních drah a následnou aktivaci nejrůznějších proteinkináz (Cesare and McNaughton, 1996, Moriyama *et al.*, 2005, Moriyama *et al.*, 2003, Vellani *et al.*, 2001). Do druhé později objevené třídy látek, které aktivují TRPV1 skrze intracelulární signalizační dráhu, patří nervový růstový faktor (NGF). Tento hormon se specificky váže na receptor TrkA, který je lokalizován na buněčném povrchu. TrkA patří do skupiny receptorových tyrozin kináz a při stimulaci NGF dochází k jeho autofosforylaci a následné aktivaci fosfatidylinositol 3-kinázy (PI3K). Efektorovým proteinem signalizační dráhy spouštěné NGF je tyrozin kináza Src, která fosforyluje TRPV1, což způsobí senzitivizaci receptoru a jeho přesun a zabudování do cytoplazmatické membrány (Zhang *et al.*, 2005).

Úloha TRPV1 v citlivosti k tepelným podnětům byla stanovena pomocí pokusů na myších s vyřazeným funkčním genem pro TRPV1 receptor (*Trpv1* KO). Použité behaviorální testy (teplé plotny, smáčení ocasu v teplé lázni) neukázaly výrazně odlišné chování u kontrolních a *Trpv1* KO myší. Zvýšená latence bolestivé odpovědi u *Trpv1* KO zvířat však byla pozorována při aplikaci teplot vyšších jak 50 °C. Byla testována také aktivita neuronů izolovaných z pokusných zvířat. Na rozdíl od neuronů wild-type zvířat nebyla u neuronů *Trpv1* KO myší zaznamenána zvýšená aktivita při stimulaci zvýšenou teplotou (~ 45 °C). Některé neurony projevily aktivitu až při značně vysokých teplotách (> 55 °C). U obou skupin myší byl také porovnáván počet a aktivita nemyelinizovaných C vláken, která jsou citlivá na teplo. Počet C vláken u *Trpv1* KO myší byl výrazně nižší a došlo u nich i k snížení frekvence výbojů v porovnání s kontrolními zvířaty. Z pokusů provedených na *Trpv1* KO myších vyplývá, že se TRPV1 receptor podílí na detekci nefyziologických teplot. Transdukcí bolestivého tepla však zajišťují zřejmě i další, dosud neznámé mechanismy (Caterina *et al.*, 2000, Davis *et al.*, 2000).

Kromě detekce akutního tepla má TRPV1 receptor důležitou roli také v rozvoji bolestivých stavů, kdy je posílena vnímavost vůči nociceptivním podnětům (hyperalgie). V roce 2000 byly publikovány dvě studie, které potvrdily význam TRPV1 receptoru při

rozvoji zvýšené bolestivosti vyvolané zánětem. Při testech byla u kontrolních myší zaznamenána výrazně snížená latence bolestivé odpovědi při stimulaci tepelnými podněty, pokud byl u zvířat předem vyvolán zánět aplikací karagenanu nebo Freundova kompletního adjuvans (CFA). Naproti tomu u *Trpv1* KO myší bylo snížení latence bolestivé odpovědi při zánětu mnohem nižší (Caterina *et al.*, 2000, Davis *et al.*, 2000). I další studie potvrzují úlohu TRPV1 ve vzniku zvýšené citlivosti vůči tepelným podnětům (tepelná hyperalgie). Například studie z roku 2005, kdy byl nejprve měřen teplotní práh nocifenzivní behaviorální odpovědi u myší, přičemž naměřené hodnoty se u *Trpv1* KO a kontrolních zvířat nelišily. Poté bylo u obou testovaných skupin myší navozeno mírné poranění způsobené opařením tlapky horkou vodou (51 °C). Za pokojové teploty se ani u jedné skupiny neprojevovalo spontánní nociceptivní chování, byl však zaznamenán pokles teplotního a mechanického prahu pro vznik nociceptivní odpovědi. Ve srovnání s kontrolními zvířaty však byla míra tepelné a mechanické hyperalgie u *Trpv1* KO myší významně nižší (Boleskei *et al.*, 2005). TRPV1 receptor se také zřejmě podílí na přecitlivosti vůči tepelným podnětům po poranění kůže. U *Trpv1* KO myší byla zaznamenána snížená citlivost na teplo po poranění kůže ve srovnání s kontrolními zvířaty (Banik and Brennan, 2009, Barabas and Stucky, 2013).

Podkladem tepelné hyperalgie zprostředkované TRPV1 receptory je pravděpodobně senzitivizace TRPV1 receptorů zánětlivými mediátory. Bylo zjištěno, že po aplikaci bradykininu či prostaglandinu E2 (PGE2) je heterologně exprimovaný TRPV1 receptor aktivovaný mnohem nižší teplotou prostředí (< 37 °C) a může reagovat již na mírné zvýšení teploty (Moriyama *et al.*, 2005, Sugiura *et al.*, 2002).

Úloha TRPV1 receptoru při rozvoji hyperalgie při různých patologických stavech je dobře doložena. V současné době jsou testovány různé látky působící na TRPV1 receptor, jež by mohly sloužit jako nový typ analgetických léků a které by mohly být využívány při léčbě patologických bolestivých stavů (Kort and Kym, 2012).

Byla zjišťována i role TRPV1 v citlivosti na mechanické podněty. U kontrolních i *Trpv1* KO myší však byly pozorovány stejné behaviorální odpovědi při mechanické stimulaci. TRPV1 receptor se tedy nepodílí na detekci mechanických podnětů (Caterina *et al.*, 2000). Zajímavé výsledky však přinesla novější studie. Ukázalo se, že při opakovaném a intenzivním mechanickém stimulu byl u *Trpv1* KO zvířat zaznamenán zvýšený počet ucuknutí tlapky v porovnání s kontrolními zvířaty. Mechanismus vzniku zvýšené citlivosti k mechanickým podnětům u *Trpv1* KO myší nebyl dosud ozřejměn (Walder *et al.*, 2012).

TRPV2

TRPV2, dříve nazývaný VRL-1, je z 50 % identický s TRPV1 receptorem. Na rozdíl od TRPV1 je však necitlivý k vaniloidním látkám a k jeho aktivaci dochází při vyšších teplotách prostředí ($> 52\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Caterina *et al.*, 1999). Kromě teploty může být TRPV2 aktivován osmotickým stresem či mechanickou stimulací (Caterina *et al.*, 1999, Muraki *et al.*, 2003). Mezi chemické agonisty TRPV2 iontového kanálu patří kanabinoidy, probenecid a 2-aminoetoxydifenylborát (2-APB), který však nepůsobí na lidskou formu TRPV2 receptoru (Bang *et al.*, 2007, Hu *et al.*, 2004, Neeper *et al.*, 2007, Qin *et al.*, 2008).

Skutečnost, že je TRPV2 receptor exprimován v sensorických neuronech a je aktivován zvýšenou teplotou okolního prostředí, vedla k předpokladu, že tento iontový kanál, spolu s TRPV1 receptory, zprostředkovává detekci bolestivého tepla (Caterina *et al.*, 1999). Tato domněnka však byla vyvrácena pokusy na myších s vyřazeným *Trpv2* genem (Park *et al.*, 2011). Teplotní citlivost *Trpv2* KO zvířat se nijak nelišila od kontrolních jedinců, a to ani za podmínek, kdy byl u myši uměle vyvolán zánět či byl mechanicky poškozen nervový systém. Citlivost na mechanické dráždění byla rovněž zachována v plné míře. Je tedy zřejmé, že přinejmenším u myši se TRPV2 receptor nepodílí na vnímání bolestivých tepelných a mechanických stimulů ani se neúčastí vzniku zánětlivé a neuropatické hyperalgie. Hlavní funkční význam TRPV2 receptoru je tedy třeba hledat mimo sensorický nervový systém.

Exprese TRPV2 iontového kanálu byla zjištěna v makrofázích, kde se podílí na mechanismu fagocytózy. Makrofágy, kterým byl TRPV2 receptor geneticky odstraněn, nebyly schopné vázat a pohltnout cizorodé částice. Účast TRPV2 na fagocytóze byla zjišťována na izolovaných makrofázích, které byly vystaveny imunoglobulinu třídy G (IgG) vázanému na latexových kuličkách. Makrofágy kontrolních zvířat pohltily mnohem více těchto částic ve srovnání s makrofágy izolovanými z *Trpv2* KO myši. Obdobný funkční deficit makrofágů *Trpv2* KO zvířat byl zaznamenán i při pokusech, kdy byly buňky inkubovány s patogenní bakterií *Listeria monocytogenes*. Kultivované makrofágy kontrolních zvířat jsou schopny tuto bakterii pohlcnout. Počet bakterií pohlčených makrofágy *Trpv2* KO myši však byl výrazně nižší. Postižená funkce makrofágů se projevuje i na úrovni celého organismu. Myši s vyřazeným genem pro TRPV2 receptor, kterým byla intraperitoneálně podána smrtelná dávka bakterie *L. monocytogenes*, umíraly signifikantně dříve než kontrolní myši (Link *et al.*, 2010).

Při stimulaci makrofágů imunokomplexy se v oblasti nově vytvářeného fagozómu začnou hromadit TRPV2 receptory. Bylo zjištěno, že přesun TRPV2 receptorů je regulován fosfatidylinositol 3-kinázou (PI3K), jejíž inhibice brání zabudování TRPV2 receptorů do vznikajícího fagozómu (Link *et al.*, 2010). Již dříve bylo ukázáno, že stimulace PI3K podněcuje zabudování TRPV2 iontových kanálů do plazmatické membrány (Kanzaki *et al.*, 1999). Předpokládá se, že hlavní role TRPV2 receptoru ve fagocytóze spočívá v navození depolarizace membrány makrofágu, jež slouží jako signál ke shlukování fagocytárních receptorů a vázání substrátu. Depolarizace membrány zprostředkovaná TRPV2 receptory byla prokázána pokusy s fluorescenčním barvivem, jehož intenzita vyzařování je závislá na membránovém potenciálu. U makrofágů kontrolních zvířat vystavených imunokomplexu byl zaznamenán pomalý nárůst fluorescence, což naznačuje, že došlo k depolarizaci membrány. U makrofágů izolovaných z *Trpv2* KO myši však byla pozorována mnohem nižší míra depolarizace po vystavení imunokomplexu (Link *et al.*, 2010).

TRPV3

Aktivita TRPV3 receptoru je v heterologním expresním systému stimulována již při fyziologických teplotách (aktivační práh 33–39 °C) a se stoupající teplotou dochází k zvyšování proudové odpovědi buněk exprimujících TRPV3 iontové kanály. Podobně jako jiné teplocitlivé TRP receptory je TRPV3 aktivován řadou rostlinných produktů - thymolem z tymiánu, karvakrolem z oregana, eugenolem z hřebíčku či kafrem z kafrovníku (Moqrich *et al.*, 2005, Xu *et al.*, 2006). Pokud jsou tyto látky aplikovány na jazyk, vyvolají u lidí pocit tepla. Syntetická látka 2-aminoetoxydifenylborát (2-APB), jež je společným aktivátorem TRPV1 a TRPV2 receptorů, působí stimulačně také na TRPV3 iontové kanály (Hu *et al.*, 2004). K expresi lidského TRPV3 iontového kanálu dochází v keratinocytech kůže, ale i v DRG a TG neuronech (Peier *et al.*, 2002, Smith *et al.*, 2002, Xu *et al.*, 2002).

Studie z roku 2005, která se zabývala charakterizací fenotypu myši s vyřazeným *Trpv3* genem, prokázala funkční význam TRPV3 receptoru ve vnímání bolestivých i nebolestivých tepelných podnětů. Bylo provedeno několik behaviorálních testů. V první sérii testů byly připraveny dvě plotny, jejichž teplotu bylo možné regulovat. V kontrolním pokusu byla na obou plotnách nastavena pokojová teplota. V tomto experimentálním uspořádání myši strávily v průměru stejnou dobu na obou plotnách. V dalším pokusu na jedné plotně zůstala pokojová teplota a na druhé bylo nastaveno 35 °C. Kontrolní zvířata většinu času strávila na místě

s fyziologickou teplotou 35 °C. U *Trpv3* KO myši byla preference pro teplejší plotnu méně výrazná. Při dalším testování byly myši umístěny na povrch, který byl rozdělen do 16 virtuálních zón se stoupající teplotou. U wild-type jedinců byl v krátkém časovém intervalu zaznamenán pohyb v oblastech s teplotou 30–38 °C na rozdíl od *Trpv3* KO myši, které nevykazovaly preferenci pro žádné teplotní rozmezí. Až po jedné hodině se pohyb *Trpv3* KO myši ustálil na srovnatelných teplotách jako u wild-type pokusných zvířat. Při poslední variantě testů byla u myši pozorována reakce na teploty, které jsou schopny poškodit organismus. U *Trpv3* KO myši bylo zaznamenáno výrazné postižení ve vnímání bolestivého tepla. Tyto výsledky potvrzují účast TRPV3 receptoru ve vnímání fyziologických i bolestivých teplot prostředí (Moqrich *et al.*, 2005).

U hlodavců není TRPV3 receptor exprimován v senzoričných neuronech a transdukcii tepelných podnětů pravděpodobně zprostředkovávají iontové kanály na membráně keratinocytů (Moqrich *et al.*, 2005). Aktivace TRPV3 receptoru vede k uvolnění chemických mediátorů (ATP, prostaglandin E2) z keratinocytů, které mohou následně stimulovat přilehlá nervová zakončení senzoričných neuronů (Huang *et al.*, 2008, Mandadi *et al.*, 2009).

Publikace z roku 2011 však popírá zásadní úlohu TRPV3 receptoru v teplotní citlivosti myši. Bylo zjištěno, že genetické odstranění TRPV3 má minimální dopad na vnímání bolestivého i nebolestivého tepla. Ani současné genetické vyřazení TRPV3 a TRPV4 iontových kanálů nevede u myši k zásadním behaviorálním změnám v reakci na tepelné podněty (Huang *et al.*, 2011). Odlišné výsledky těchto studií mohou být způsobené různým genetickým pozadím pokusných myši.

TRPV4

TRPV4 je neselektivní kationtový kanál ($P_{Ca}/P_{Na} = 6-10$), jehož primární sekvence je homologní se sekvencí TRPV1 receptoru přibližně ze 40 %. K jeho aktivaci dochází již při fyziologických teplotách (> 27 °C) (Delany *et al.*, 2001, Guler *et al.*, 2002). Mezi sloučeniny, které přímo aktivují TRPV4, patří syntetický ligand 4 α -forbol 12,13-didekanoát (4 α -PDD) a bisandrografolid A (BAA), komponenta extraktu právenky latnaté (*Andrographis paniculata*) užívané k léčbě infekčních onemocnění (Smith *et al.*, 2006, Watanabe *et al.*, 2002). Aktivace TRPV4 osmotickými a mechanickými podněty je závislá na fosfolipáze A2 (PLA2). PLA2 zprostředkovává uvolnění kyseliny arachidonové, která je nepřímým aktivátorem TRPV4. Pomocí cytochromu P450 epoxygenázy dojde k přeměně kyseliny arachidonové na

epoxyeikosatrienové kyseliny (EET), jako jsou 5,6-EET nebo 8,9-EET, jež jsou přímými aktivátory TRPV4 (Fernandes *et al.*, 2008, Vriens *et al.*, 2005, Watanabe *et al.*, 2003).

Exprese TRPV4 byla zaznamenána v ledvinách, plicích, slezině, endotelu, urotelu, placentě, varlotech, v tukové tkáni, dále v mozku, DRG neuronech, ve vnitřních i vnějších vláskových buňkách Cortiho orgánu, v Merkeleho buňkách a keratinocytech (Delany *et al.*, 2001, Chung *et al.*, 2003, Liedtke *et al.*, 2000, Peier *et al.*, 2002, Strotmann *et al.*, 2000, Wissenbach *et al.*, 2000). Exprese TRPV4 v mnoha orgánech poukazuje na významnou úlohu tohoto receptoru v různých buněčných procesech (Everaerts *et al.*, 2010).

V cirkumventrikulárních orgánech centrální nervové soustavy (CNS) je TRPV4 důležitým receptorem osmotického tlaku, což bylo prokázáno pokusy na myších s vyřazeným funkčním genem pro TRPV4. U testovaných myší byl pozorován příjem tekutin. Celková spotřeba tekutin u KO myší byla menší než celková spotřeba u kontrolních zvířat. V navazujícím pokusu byl testovaným myším injekčně aplikován hypertonický roztok. V nepřítomnosti TRPV4 receptoru byl u KO myší vystavených osmotickému stresu pozorován nižší příjem tekutin a oproti wild-type zvířatům se zvýšila i latence od aplikace roztoku po první napití. U KO myší došlo i k narušení sekrece antidiuretického hormonu (ADH), který řídí příjem a výdej vody v těle. V dalším pokusu byl myším infuzí aplikován dDVAP (1-desamino-8-D-arginin vasopresin), analog ADH, který u KO myší vyvolal hypotonicitu a vyšší příjem vody ve srovnání s wild-type jedinci (Liedtke and Friedman, 2003).

Studie z roku 2005 zkoumala úlohu TRPV4 receptoru v transdukcii osmotického tlaku a v rozvoji osmotické hyperalgie. Testovaným myším byl injekčně aplikován slabý (2%) a silný (10%) hypertonický roztok chloridu sodného (NaCl). Doba lízání a třepání tlapy byla po aplikaci 2% roztoku u *Trpv4* KO myší ve srovnání s wild-type zvířaty výrazně snížena. Aplikace silně hypertonického roztoku vyvolala u obou experimentálních skupin srovnatelnou odpověď, nocifenzivní chování při injekci 10% NaCl nebylo u *Trpv4* KO myší potlačeno. Předpokládá se tedy, že se TRPV4 receptory účastní detekce pouze mírného zvýšení osmotického tlaku. Obdobné výsledky byly získány i za podmínek, kdy byl u myší předem vyvolán zánět aplikací PGE2. Výsledky studie potvrzují úlohu TRPV4 receptoru v transdukcii osmotického tlaku a osmotické hyperalgie vyvolané mírným zvýšením osmotického tlaku (Alessandri-Haber *et al.*, 2005). Vnímání vyššího stupně hypertonicity je pravděpodobně zprostředkováno jinými mechanismy.

Zjištění, že TRPV4 receptor reaguje na osmotické podněty, napovídá, že by se mohl

účastnit také transdukce mechanických podnětů v sensorickém systému. Skutečně bylo prokázáno, že se neurony KO myši vyznačují sníženou citlivostí na mechanické podněty. U myši byla porovnávána elektrická aktivita sensorických neuronů po mechanickém podnětu. Jako mechanický stimul byla použita jehla, kterou bylo pícháno do lysé kůže myši. Výsledky ukázaly, že u *Trpv4* KO myši musel být použit výrazně vyšší tlak pro aktivaci neuronů ve srovnání s kontrolními zvířaty. U *Trpv4* KO myši byla také zaznamenána snížená frekvence výbojů neuronů při mechanické stimulaci (Suzuki *et al.*, 2003).

Další pokusy ukázaly, že se TRPV4 receptory podílí na vzniku mechanické hyperalgie. Kontrolní a *Trpv4* KO myši byly podrobeny von Frey testu, ve kterém se určuje práh pro vznik nociceptivního chování při aplikaci mechanických stimulů na tlapku pomocí nylonových vláken. Tento test byl proveden nejprve v kontrolních podmínkách a poté po aplikaci směsi látek vyvolávající zánět. V prvním případě nebylo u obou pozorovaných skupin myši zaznamenáno rozdílné chování. V druhém případě, po aplikaci zánětlivé směsi látek, došlo u kontrolních zvířat k zvýšení frekvence odtážení tlapek. Naopak, u *Trpv4* KO jedinců nebyl nociceptivní práh oproti kontrolním podmínkám posunut (Alessandri-Haber *et al.*, 2006).

Význam TRPV4 receptoru v citlivosti k tepelným podnětům a regulaci teploty u hlodavců byl zkoumán několika výzkumnými skupinami. V práci z roku 2005 byla v behaviorálních testech zjišťována teplotní preference pokusných zvířat. *Trpv4* KO myši dávaly přednost vyšší teplotě (34 °C), zatímco kontrolní zvířata se pohybovala v rozmezí 30–34 °C a jejich preference nebyly tak úzce vymezeny. V dalším pokusu byly ocasy myši ponořeny do vodní lázně s různě vysokou teplotou. Při teplotách 45–46 °C se u *Trpv4* KO myši projevila delší reakční latence ve srovnání s wild-type jedinci. Tyto výsledky tedy potvrzují roli TRPV4 receptoru v teplotní citlivosti (Lee *et al.*, 2005). V další studii byly při behaviorálních testech použity plotny s teplotami 35–50 °C oddělené od okolního prostředí překážkou, kterou musela pokusná zvířata překonat, aby z plotny unikla. V tomto experimentálním uspořádání byla u kontrolních i *Trpv4* KO myši pozorována stejná latence úniku. U myši se dále zkoumala odpověď neuronů při tepelné stimulaci. Citlivost neuronů u *Trpv4* KO myši byla výrazně nižší ve srovnání s kontrolními zvířaty. U *Trpv4* KO myši se neuronální aktivita projevila až při více jak 40 °C, zatímco u kontrolních zvířat již při 33 °C. Testováním byla zjišťována i hyperalgiecká odpověď vyvolaná teplotním stimulem. Myším byl injekčně vpraven karagenan, látka vyvolávající zánět, a poté byly myši umístěny na desky s různými teplotami. U kontrolních myši byla zaznamenána výrazně snížená latence oproti

výchozímu stavu, kdy u nich zánět nebyl vyvolán. Naproti tomu, *Trpv4* KO myši nevykazovaly rozdíl v latenci před a po aplikaci karagenanu. Autoři zmíněné studie předpokládají, že se TRPV4 receptory účastní detekce bolestivého tepla a mají důležitou roli ve vzniku tepelné hyperalgie (Todaka *et al.*, 2004).

V nedávné studii při pokusech s KO zvířaty však Huang a jeho kolegové účast TRPV4 receptoru při vzniku tepelné hyperalgie zpochybnili. Při prvním testování byli kontrolní i TRPV3^(-/-)/TRPV4^(-/-) (double knockout, DKO) zvířata vystavena tepelnému stimulu. U DKO byla zaznamenána nepatrně delší latence behaviorální odpovědi oproti kontrolním zvířatům. Poté bylo zvířatům aplikováno Freundovo kompletní adjuvans (CFA), směs antigenů vyvolávající zánět, a byla pozorována reakce myši na tepelný podnět. U obou experimentálních skupin zvířat došlo ke srovnatelnému snížení latence odpovědi. Tyto výsledky se neshodují s poznatky jiných studií, které potvrdily účast TRPV4 receptoru při rozvoji tepelné hyperalgie. Rozdílné výsledky mohou být způsobeny použitím pokusných myši s různým genetickým pozadím či rozdíly v metodice (Huang *et al.*, 2011).

Teplotně aktivované TRPM receptory

TRPM8

Po objevení teplem aktivovaných TRPV1 (Caterina *et al.*, 1997) a TRPV2 (Caterina *et al.*, 1999) receptorů bylo jen otázkou času, kdy dojde k identifikaci dalších teplotně aktivovaných receptorů. Předpokládalo se, že podobně, jako reagují na zvyšující se teplotu okolního prostředí TRPV1 a TRPV2, analogicky mohou existovat receptory, které jsou aktivovány chladem. V roce 2002 byl vyklonován a charakterizován nezávisle dvěma skupinami receptor aktivovaný chladem a látkami vyvolávajícími pocit chladu TRPM8 (dříve nazývaný CMR1 = cold menthol receptor). Tento protein o molekulové hmotnosti 130 kDa (McKemy *et al.*, 2002; Peier *et al.*, 2002) je exprimován v nociceptivních neuronech, ale také v játrech, močovém měchýři, či hladké svalovině cév. TRPM8 iontový kanál je přímo aktivován chladem v rozmezí 28–10 °C (McKemy *et al.*, 2002; Peier *et al.*, 2002). Mezi chemické aktivátory tohoto neselektivního kationtového ($P_{Ca}/P_{Na} = 1-3,3$) kanálu patří mentol, eukalyptol a syntetická látka icilin, která vykazuje velmi silný chladicí účinek (Chuang *et al.*, 2004). Je pravděpodobné, že tyto aktivační látky působí jako pozitivní alosterické modulátory, které umožňují otevření TRPM8 kanálu při vyšších teplotách. Aktivace TRPM8 mentolem a icilinem probíhá odlišnými mechanismy. Aktivace pomocí mentolu je nezávislá na intracelulárním pH, ale je inhibována intracelulární přítomností Ca^{2+} , zatímco aktivace prostřednictvím icilinu je inhibována nízkým pH a nepřítomností Ca^{2+} (Andersson *et al.*, 2004, Chuang *et al.*, 2004). TRPM8 je napětově řízený kanál aktivovaný silnou depolarizací membrány ($> +80$ mV), přičemž souhra mezi napětím a aktivací chladem je velice úzce spjata (Voets *et al.*, 2004).

V roce 2007 byly publikovány tři práce, které se pokusily charakterizovat fyziologickou úlohu TRPM8 receptoru pokusy na KO myších. Ve všech třech studiích *Trpm8* KO myši vykazovaly nedostatečnou odpověď při vystavení sníženým teplotám prostředí nebo při působení látky vyvolávající chlad, jako je icilin (Bautista *et al.*, 2007, Colburn *et al.*, 2007, Dhaka *et al.*, 2007). Byl pozorován behaviorální deficit KO myší, které nebyly schopné rozlišit mezi studeným a teplým povrchem. To naznačuje, že se TRPM8 podílí na rozpoznávání chladných teplot. Při aplikaci teplot pod bodem mrazu se však u myší projevilo normální nociceptivní chování, což poukazuje na existenci jiného receptoru umožňujícího detekci bolestivého chladu. Při aplikaci 2% formalínu, jenž je používán v experimentálních modelech pro vyvolání bolestivé reakce, se zjistilo, že TRPM8 zprostředkovává analgetický

účinek mírného chlazení (Dhaka *et al.*, 2007).

K detekci chladu by mohl přispívat nejen TRPM8, ale i TRPA1 receptor (Karashima *et al.*, 2009, Story *et al.*, 2003), přesná úloha těchto receptorů ve vnímání bolesti vyvolané chladem však zatím není zcela objasněna. V roce 2009 byla publikována práce autorů Karashima a spol., která na myších s vyřazeným funkčním genem pro TRPA1 receptor jednoznačně prokázala úlohu tohoto receptoru v detekci bolestivého chladu. Studie z roku 2010 však důležitou úlohu TRPA1 receptoru ve vnímání chladu nepotvrdila. U myší s dvojitou genovou inaktivací TRPM8^(-/-)/TRPA1^(-/-) bylo porovnáváno chování v teplém a studeném prostředí (Knowlton *et al.*, 2010). Zatímco wild-type myši dávaly přednost teplejšímu prostředí, DKO a *Trpm8* KO myši nevykazovaly žádné preference a reagovaly až při extrémně škodlivých teplotách. Na rozdíl od wild-type jedinců *Trpm8* KO myši se nevyhýbaly chladným povrchům, a dokonce prozkoumávaly povrchy s teplotou 5 °C. Při působení nocicepčních chladných teplot, icilinu nebo mentolu bylo pozorováno nociceptivní chování u *Trpa1* KO myší, nikoliv však u *Trpm8* KO myší a DKO. Tato studie prokázala, že za vnímání chladných nocicepčních teplot je zřejmě zodpovědný převážně TRPM8 receptor (Knowlton 2010). Transdukce bolestivého tepla však může být zprostředkována i jinými, doposud neznámými mechanismy.

TRPM3

TRPM3 receptor je převážně exprimován v buňkách pankreatu, kde se podílí na regulaci sekrece insulínu (Wagner *et al.*, 2008). V nervovém systému byla exprese TRPM3 zaznamenána v TG a DRG neuronech, což bylo potvrzeno také stimulací neuronů pomocí exogenní látky pregnenolon sulfátu (PS), specifického aktivátoru TRPM3. U čerstvě izolovaných TG a DRG neuronů kontrolních zvířat vyvolal PS vápníkový signál na rozdíl od neuronů *Trpm3* KO zvířat, kde tento signál byl výrazně nižší (Vriens *et al.*, 2011). Při testování této exogenní látky jako specifického aktivátoru TRPM3 receptorů byla myším podávána nejprve čistá voda a posléze voda s přidaným PS. U kontrolních zvířat byla zaznamenána výrazně snížená konzumace vody po přidání PS oproti *Trpm3* KO myším (Wagner *et al.*, 2008).

V nedávné době bylo zjištěno, že se TRPM3 iontový kanál účastní také detekce tepelných podnětů a má důležitý význam v nocicepci. Při testování odpovědi neuronů na tepelný podnět bylo pozorováno zvýšené množství intracelulárního Ca²⁺. Při teplotách 25–40

°C byl u TRPM3 zaznamenán rychlý nárůst intracelulárního Ca^{2+} . U TRPM3 se také projevuje synergický efekt mezi chemickým agonistou a tepelnými stimuly. Při aplikaci $10\mu\text{M}$ PS byl TRPM3 receptor aktivován již při nižších teplotách prostředí. Navíc vzestup teploty na $37\text{ }^\circ\text{C}$ zvýšil odpověď na PS. Také dva behaviorální pokusy potvrdily účast TRPM3 receptoru na vnímání tepla. V prvním testu na horkých plotnách s teplotami $52\text{--}58\text{ }^\circ\text{C}$ vykazovaly *Trpm3* KO myši výrazně zpožděnou behaviorální odpověď na rozdíl od wild-type zvířat. Pomocí jiného experimentu byla zjišťována teplotní preference kontrolních myší a myší s vyřazeným funkčním genem pro TRPM3 pro různé teploty prostředí. U obou pozorovaných skupin zvířat bylo zaznamenáno podobné chování, přičemž většinu času strávily v místech s teplotami $27\text{--}31\text{ }^\circ\text{C}$. Na rozdíl od kontrolních zvířat se však v prvních 30 minutách *Trpm3* KO myši pohybovaly na podložkách s teplotou mezi 31 a $45\text{ }^\circ\text{C}$. Předpokládá se tedy, že *Trpm3* KO myši preferují stejnou teplotu jako kontrolní zvířata, ale mají nižší schopnost vyvarovat se místům se zvýšenou teplotou, která může být pro organismus škodlivá.

Další pokusy prokázaly úlohu TRPM3 iontového kanálu v tepelné hyperalgézii. Kontrolním i *Trpm3* KO myším bylo aplikováno Freundovo kompletní adjuvans (CFA), směs antigenů vyvolávající zánět. Poté byly myši umístěny na desky o různých teplotách. Na studené desce se u obou skupin projevila reakce způsobená bolestivým chladem. Po umístění na teplou desku však byly reakce odlišné. U kontrolních zvířat byla v zánětlivých podmínkách zaznamenaná snížená latence behaviorální odpovědi, zatímco u *Trpm3* KO myší nikoliv. Všechny zmíněné výsledky tedy podporují účast TRPM3 receptoru ve vnímání tepla a při vzniku tepelné hyperalgie (Vriens *et al.*, 2011).

Teplotně aktivovaný TRPA receptor

TRPA1

TRPA1 receptor, dříve známý jako ANKTM1, je jediným členem ankyrinové podskupiny TRP iontových kanálů. N-konec TRPA1 receptoru obsahuje 18 ankyrinových repetitiv, podle nichž byl tento iontový kanál pojmenován (Jaquemar *et al.*, 1999). TRPA1 receptor je přítomen na membráně nociceptivních sensorických neuronů a jeho exprese se částečně překrývá s expresí TRPV1 iontového kanálu (Jordt *et al.*, 2004, Kobayashi *et al.*, 2005, Story *et al.*, 2003). Tento receptor je aktivovaný celou řadou elektrofilních reaktivních sloučenin, které kovalentně modifikují cysteinové zbytky na N-konci TRPA1, čímž je stimulováno otevření iontového kanálu (Hinman *et al.*, 2006). Mezi tyto látky se řadí přírodní sloučeniny AITC (v hořčicovém oleji, wasabi a křenu), alicin a diallyl disulfid (v česneku), cinnamaldehyd (ve skořici) a také syntetická látka akrolein (v slzném plynu). TRPA1 receptor však může být aktivován i standardním způsobem – reverzibilní interakcí agonisty se specifickým vazebným místem iontového kanálu. Například mentol, společný aktivátor TRPA1 a TRPM8 receptorů, pravděpodobně aktivuje iontový kanál vazbou do pórové oblasti. Při vytvoření mutací u lidského podtypu TRPA1 se ukázalo, že vazebným místem pro mentol je pravděpodobně TM5 doména. Po mutaci TM5 domény byla zaznamenána silně snížená odpověď na mentol (Xiao *et al.*, 2008). Fyziologické účinky mentolu jsou tedy pravděpodobně zprostředkovány jak TRPM8, tak TRPA1 iontovými kanály (Karashima *et al.*, 2007, Story *et al.*, 2003). Aktivita TRPA1 receptoru je modulována řadou endogenních látek, které se podílí na oxidačním stresu a vzniku zánětu, jako například bradykininem, 4-hydroxynonenalem, formalaldehydem, oxidem dusnatým, peroxidem vodíku, protony a 15d-PGJ₂ (Bandell *et al.*, 2004, McNamara *et al.*, 2007, Takahashi *et al.*, 2008, Trevisani *et al.*, 2007).

TRPA1 receptor je aktivovaný při nižších teplotách prostředí než TRPM8. Teplotní práh pro aktivaci TRPA1 přibližně odpovídá teplotnímu prahu pro vznik bolesti (~15°C) a předpokládá se, že by TRPA1 mohl být zodpovědný za vnímání bolesti vyvolané chladem (Davis and Pope, 2002, Story *et al.*, 2003). Názory jednotlivých výzkumných skupin ohledně fyziologické funkce TRPA1 ve vnímání chladu se však liší. Ve dvou studiích, jež se zabývaly charakterizací fenotypu *Trpa1* KO myší, nebyl zaznamenán žádný rozdíl v teplotní citlivosti geneticky modifikovaných a kontrolních zvířat (Bautista *et al.*, 2006, Knowlton *et al.*, 2010). Naopak v jiné studii byla u KO myší pozorována snížená behaviorální reakce při vystavení

působení chladu. Snížení citlivosti vůči chladu bylo větší u samic než samců, což je přičítáno vlivu pohlavních hormonů (Kwan *et al.*, 2006). I v další studii byly zaznamenány rozdíly v chování mezi wild-type a *Trpa1* KO zvířaty, které se však projeví až při velmi nízké teplotě chlazené podložky, na které byla teplotní citlivost myší testována. Vysvětlení zřejmě spočívá v tom, že v nervových zakončeních citlivých na chlad je mnohem vyšší teplota díky cirkulaci krve nebo izolačnímu účinku kůže oproti chladícím deskám (Karashima *et al.*, 2009).

Úloha TRPA1 ve vnímání akutního chladu tedy nebyla doposud plně prokázána. TRPA1 se ale pravděpodobně podílí na vzniku hypersenzitivity vůči chladu v podmínkách zánětu, kdy je aktivita TRPA1 stimulována zánětlivými mediátory. V heterologním expresním systému jsou TRPA1 receptory jen slabě aktivovány snížením teploty extracelulárního roztoku. Výrazná teplotní závislost TRPA1 se projeví až při současné stimulaci chemickými agonisty. Experimentálně bylo prokázáno, že i na úrovni celého organismu je citlivost ke chladným teplotám zprostředkovaná TRPA1 receptory pozorována pouze za podmínek, kdy je tento iontový kanál chemicky aktivován. Myším byl injekčně aplikován 4-hydroxynonenal (4-HNE), endogenní agonista TRPA1, a poté byly umístěny na desku s teplotou 0 °C. U *Trpa1* KO myší se nocifenzivní chování projevilo mnohem později než u kontrolních zvířat. Naopak, před aplikací 4-HNE obě experimentální skupiny myší nevykazovaly odlišné chování při vystavení chladnému prostředí (del Camino *et al.*, 2010). Tyto výsledky poukazují na důležitý význam TRPA1 receptorů při rozvoji zánětlivé bolesti. Již dříve bylo v behaviorálních testech prokázáno, že hyperalgie vyvolaná aplikací bradykininu nebo formaldehydu je signifikantně nižší u *Trpa1* KO myší v porovnání s kontrolními zvířaty (Bautista *et al.*, 2006, McNamara *et al.*, 2007). Inhibitory TRPA1 receptoru by tedy mohly sloužit jako účinné látky při léčbě zánětlivých bolestivých stavů u lidí.

Nejnovější studie z roku 2013 zjišťovala úlohu TRPA1 v mechanické přecitlivělosti myší po poranění kůže. Citlivost k mechanickým stimulům se po experimentálním navození kožního poranění výrazně zvýšila jak u kontrolních myší, tak u *Trpa1* KO jedinců. Skutečnost, že nebyl pozorován žádný rozdíl v odpovědích geneticky upravených zvířat oproti wild-type myším naznačuje, že TRPA1 receptor není univerzální molekulou, jež zprostředkovává vznik mechanické hyperalgie (Barabas and Stucky, 2013).

Expres TRPA1 receptoru není omezena pouze na senzorní neurony. Skutečnost, že je TRPA1 přítomen ve vláskových buňkách vnitřního ucha, vedla k domněnce, že by tento iontový kanál mohl být hledaným mechanicky aktivovaným receptorem sluchové dráhy

(Corey *et al.*, 2004). Tento předpoklad byl však vyvrácen pokusy na myších s vyřazeným genem pro TRPA1 receptor, jež nevykazovaly žádný sluchový defekt (Bautista *et al.*, 2006, Kwan *et al.*, 2006).

TRP kanály s dosud jen nepřímo prokázanou funkcí teplotních senzorů

TRPC5

TRPC5 receptor je pátým členem TRPC „kanonické“ podskupiny a patří mezi další teplotně aktivované iontové kanály. Jeho exprese byla zaznamenána v gangliích zadních kořenů míšních a v neuronech hipokampu. Teplotní citlivost TRPC5 receptoru se pohybuje v rozmezí 37–25 °C. Význam tohoto receptoru v detekci tepelných podnětů byl doposud zkoumán jen v jedné studii. Nejprve byly *Trpc5 KO* myši podrobeny behaviorálním pokusům. Po aplikaci bolestivých teplot i mechanických podnětů *Trpc5 KO* myši vykazovaly normální behaviorální odpovědi a jejich vnímání chladu bylo zachováno. V rámci zkoumání fenotypu *Trpc5 KO* myší byly porovnávány vlastnosti sensorických C-vláken. Ukázalo se, že *Trpc5 KO* zvířata mají mnohem méně neuronů citlivých na chlad a exprese TRPM8 receptoru je omezena. Je tudíž zřejmé, že vyřazení funkčního genu pro TRPC5 silně postihuje funkci sensorického nervového systému. Na úrovni celého organismu však může být pozorovaný defekt *Trpc5 KO* zvířat kompenzován jinými mechanismy. Autoři studie předpokládají, že se TRPC5 a TRPM8 receptory v periferních zakončeních společně podílí a doplňují na detekci chladu (Greka *et al.*, 2003, Zimmermann *et al.*, 2011).

TRPM5

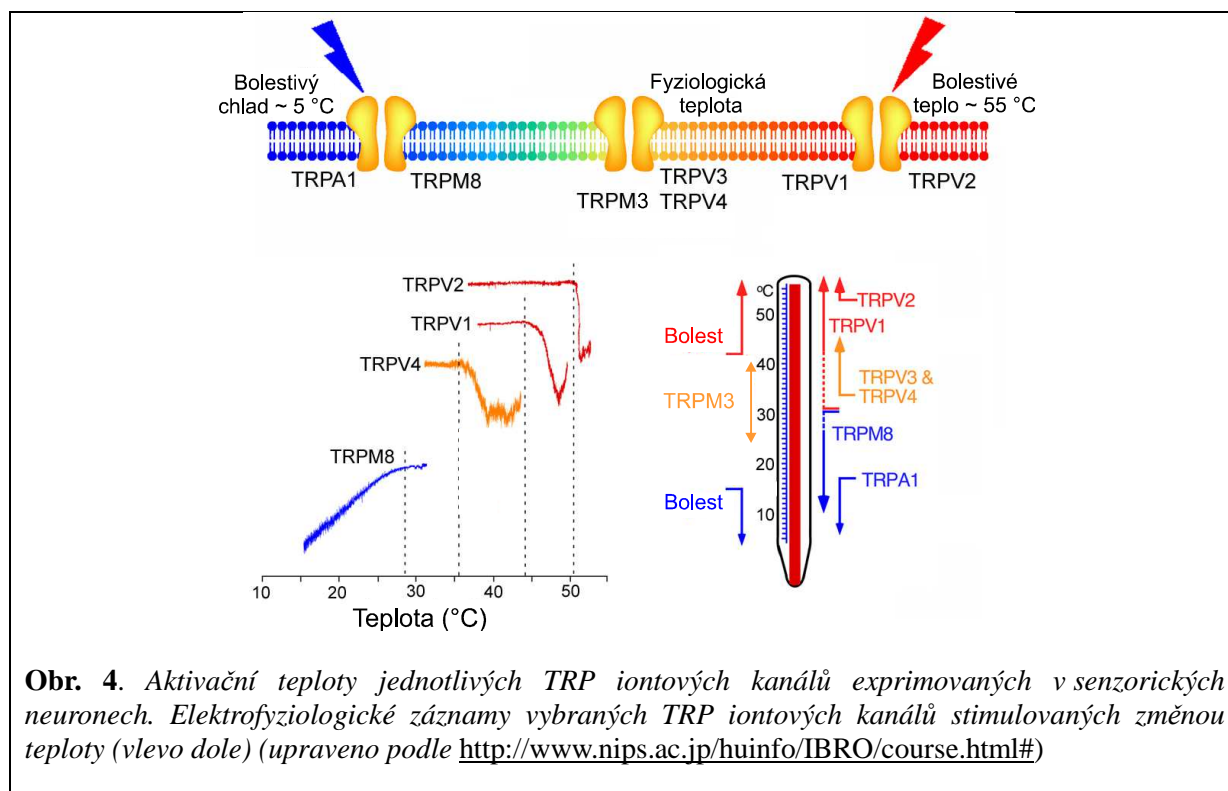
Chuť je jedním ze základních živočišných smyslů, jenž zajišťuje rozlišení mezi hodnotnou a výživově postradatelnou stravou. TRPM5 je neselektivní kationový kanál, který však není propustný pro divalentní kationy. Je vysoce exprimován v chuťových pohárcích jazyka, kde hraje důležitou roli ve vnímání sladké, hořké a umami chuti (Perez *et al.*, 2002, Zhang *et al.*, 2003). TRPM5 je zapojen do transdukční kaskády vnímání chuti, jež je stimulována prostřednictvím receptorů specifických pro jednotlivé typy podnětů a umístěných na membráně chuťových buněk. Receptory pro sladkou, hořkou a umami chuť jsou spřaženy s trimerními G-proteiny a po jejich aktivaci dochází k disociaci α podjednotky od $\beta\gamma$ podjednotky. Volné $\beta\gamma$ podjednotky následně aktivují fosfolipázu C- $\beta 2$, která hydrolyzuje fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP₂) na diacylglycerol (DAG) a inositol-1,4,5-trifosfát (IP₃). IP₃ aktivuje IP₃ receptor na membráně endoplazmatického retikula, což vede k uvolnění intracelulárních zásob vápenatých iontů do cytozolu. Bylo zjištěno, že TRPM5 receptory jsou aktivovány vápenatými ionty působícími z intracelulární strany membrány. Vzrůst

koncentrace vápenatých iontů v cytozolu chuťových buněk tudíž může stimulovat aktivitu TRPM5 receptorů. Předpokládá se, že depolarizace membrány navozená vstupem sodíkových iontů skrze TRPM5 iontové kanály umožní výlev neurotransmiterů na synapsi s primárním senzorickým neuronem (Liu and Liman, 2003).

Studie z roku 2005 ukazuje, že činnost TRPM5 je regulována teplotou prostředí (Talavera *et al.*, 2005). V heterologním expresním systému je TRPM5 receptor aktivován teplotami v rozmezí 15–35°C. Možný význam teplotní citlivosti TRPM5 receptorů ve vnímání chuti byl testován na pokusných myších, u nichž byla sledována aktivita nervu chorda tympani. Tento nerv inervuje přední část jazyka, kde se vyskytují chuťové buňky, které přednostně vnímají sladkou chuť. K stimulaci chorda tympani nervu byly použity dva cukry (sacharóza a glukóza) a dvě nekalorická sladidla (sacharín a SC45647). Tyto látky u kontrolních zvířat vyvolaly specifickou odpověď, která se zvyšovala se vzrůstající teplotou aplikovaného roztoku. Naopak u KO myší byla elektrická odpověď nervu chorda tympani značně snižena, při aplikaci SC45647 dokonce nebyla pozorována žádná odpověď. Předpokládá se tedy, že TRPM5 může napomáhat k lepšímu vnímání sladké chuti při vyšších teplotách. Samotné detekce zvýšených teplot prostředí se však tyto receptory pravděpodobně neúčastní, neboť nejsou exprimovány mimo tkáň spojené s detekcí chuti (Perez *et al.*, 2002).

Závěr

Tato práce je shrnutím současných vědomostí o teplotně aktivovaných TRP iontových kanálech. Od identifikace prvního teplocitlivého iontového kanálu v roce 1997 zaznamenal výzkum v této oblasti velký pokrok. Ukázalo se, že tyto iontové kanály nejsou pouze senzory teplot, ale účastní se také široké škály dalších fyziologických aktivit. Dnes už je známo 9 teplotně aktivovaných TRP iontových kanálů (TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM3, TRPM5, TRPM8, TRPA1, TRPC5), které jsou exprimovány v sensorických neuronech. Většina z nich působí jako smyslové receptory pro přírodní látky, jako jsou kapsaicin, mentol či hořčičný olej. Studie, ve kterých byly použity specifické inhibitory TRP receptorů nebo KO zvířata, ukázaly, že některé z těchto kanálů hrají důležitou roli ve vnímání bolesti, která je vyvolána extrémními teplotami, zánětem nebo poškozením tkáně. Předpokládá se tudíž, že použití farmakologických inhibitorů TRP iontových kanálů by mohlo mít terapeutický účinek na vnímání bolesti. Farmaka působící na TRP receptory by mohly sloužit jako nové účinné látky pro léčbu patologických bolestivých stavů. Některé funkční vlastnosti teplocitlivých TRP kanálů nejsou však zatím plně objasněny a mnoho otázek musí být ještě zodpovězeno v dalších studiích.



Seznam použité literatury:

Alessandri-Haber, N., O. A. Dina, E. K. Joseph, D. Reichling, and J. D. Levine. 2006. A transient receptor potential vanilloid 4-dependent mechanism of hyperalgesia is engaged by concerted action of inflammatory mediators. *J Neurosci* **26**:3864-3874.

Alessandri-Haber, N., E. Joseph, O. A. Dina, W. Liedtke, and J. D. Levine. 2005. TRPV4 mediates pain-related behavior induced by mild hypertonic stimuli in the presence of inflammatory mediator. *Pain* **118**:70-79.

Andersson, D. A., H. W. Chase, and S. Bevan. 2004. TRPM8 activation by menthol, icilin, and cold is differentially modulated by intracellular pH. *J Neurosci* **24**:5364-5369.

Bandell, M., G. M. Story, S. W. Hwang, V. Viswanath, S. R. Eid, M. J. Petrus, T. J. Earley, and A. Patapoutian. 2004. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* **41**:849-857.

Bang, S., K. Y. Kim, S. Yoo, S. H. Lee, and S. W. Hwang. 2007. Transient receptor potential V2 expressed in sensory neurons is activated by probenecid. *Neurosci Lett* **425**:120-125.

Banik, R. K., and T. J. Brennan. 2009. Trpv1 mediates spontaneous firing and heat sensitization of cutaneous primary afferents after plantar incision. *Pain* **141**:41-51.

Barabas, M. E., and C. L. Stucky. 2013. TRPV1, but not TRPA1, in primary sensory neurons contributes to cutaneous incision-mediated hypersensitivity. *Mol Pain* **9**:9.

Bautista, D. M., S. E. Jordt, T. Nikai, P. R. Tsuruda, A. J. Read, J. Poblete, E. N. Yamoah, A. I. Basbaum, and D. Julius. 2006. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* **124**:1269-1282.

Bautista, D. M., J. Siemens, J. M. Glazer, P. R. Tsuruda, A. I. Basbaum, C. L. Stucky, S. E. Jordt, and D. Julius. 2007. The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature* **448**:204-208.

Bolcskei, K., Z. Helyes, A. Szabo, K. Sandor, K. Elekes, J. Nemeth, R. Almasi, E. Pinter, G. Petho, and J. Szolcsanyi. 2005. Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. *Pain* **117**:368-376.

Cao, E., J. F. Cordero-Morales, B. Liu, F. Qin, and D. Julius. 2013. TRPV1 channels are intrinsically heat sensitive and negatively regulated by phosphoinositide lipids. *Neuron* **77**:667-679.

Caterina, M. J., A. Leffler, A. B. Malmberg, W. J. Martin, J. Trafton, K. R. Petersen-Zeit, M. Koltzenburg, A. I. Basbaum, and D. Julius. 2000. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* **288**:306-313.

- Caterina, M. J., T. A. Rosen, M. Tominaga, A. J. Brake, and D. Julius. 1999.** A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* **398**:436-441.
- Caterina, M. J., M. A. Schumacher, M. Tominaga, T. A. Rosen, J. D. Levine, and D. Julius. 1997.** The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**:816-824.
- Cesare, P., and P. McNaughton. 1996.** A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:15435-15439.
- Colburn, R. W., M. L. Lubin, D. J. Stone, Jr., Y. Wang, D. Lawrence, M. R. D'Andrea, M. R. Brandt, Y. Liu, C. M. Flores, and N. Qin. 2007.** Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. *Neuron* **54**:379-386.
- Corey, D. P., J. Garcia-Anoveros, J. R. Holt, K. Y. Kwan, S. Y. Lin, M. A. Vollrath, A. Amalfitano, E. L. Cheung, B. H. Derfler, A. Duggan, G. S. Geleoc, P. A. Gray, M. P. Hoffman, H. L. Rehm, D. Tamasauskas, and D. S. Zhang. 2004.** TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature* **432**:723-730.
- Cuypers, E., A. Yanagihara, E. Karlsson, and J. Tytgat. 2006.** Jellyfish and other cnidarian envenomations cause pain by affecting TRPV1 channels. *FEBS Lett* **580**:5728-5732.
- Davis, J. B., J. Gray, M. J. Gunthorpe, J. P. Hatcher, P. T. Davey, P. Overend, M. H. Harries, J. Latcham, C. Clapham, K. Atkinson, S. A. Hughes, K. Rance, E. Grau, A. J. Harper, P. L. Pugh, D. C. Rogers, S. Bingham, A. Randall, and S. A. Sheardown. 2000.** Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* **405**:183-187.
- Davis, K. D., and G. E. Pope. 2002.** Noxious cold evokes multiple sensations with distinct time courses. *Pain* **98**:179-185.
- del Camino, D., S. Murphy, M. Heiry, L. B. Barrett, T. J. Earley, C. A. Cook, M. J. Petrus, M. Zhao, M. D'Amours, N. Deering, G. J. Brenner, M. Costigan, N. J. Hayward, J. A. Chong, C. M. Fanger, C. J. Woolf, A. Patapoutian, and M. M. Moran. 2010.** TRPA1 contributes to cold hypersensitivity. *J Neurosci* **30**:15165-15174.
- Delany, N. S., M. Hurle, P. Facer, T. Alnadaf, C. Plumpton, I. Kinghorn, C. G. See, M. Costigan, P. Anand, C. J. Woolf, D. Crowther, P. Sanseau, and S. N. Tate. 2001.** Identification and characterization of a novel human vanilloid receptor-like protein, VRL-2. *Physiol Genomics* **4**:165-174.
- Dhaka, A., A. N. Murray, J. Mathur, T. J. Earley, M. J. Petrus, and A. Patapoutian. 2007.** TRPM8 is required for cold sensation in mice. *Neuron* **54**:371-378.
- Dhaka, A., V. Uzzell, A. E. Dubin, J. Mathur, M. Petrus, M. Bandell, and A. Patapoutian. 2009.** TRPV1 is activated by both acidic and basic pH. *J Neurosci* **29**:153-158.
- Dubin, A. E., and A. Patapoutian. 2010.** Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest* **120**:3760-3772.
- Everaerts, W., B. Nilius, and G. Owsianik. 2010.** The vanilloid transient receptor potential channel TRPV4: from structure to disease. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **103**:2-17.

- Fernandes, J., I. M. Lorenzo, Y. N. Andrade, A. Garcia-Elias, S. A. Serra, J. M. Fernandez-Fernandez, and M. A. Valverde. 2008.** IP3 sensitizes TRPV4 channel to the mechano- and osmotransducing messenger 5'-6'-epoxyeicosatrienoic acid. *J Gen Physiol* **131**:i2.
- Greka, A., B. Navarro, E. Oancea, A. Duggan, and D. E. Clapham. 2003.** TRPC5 is a regulator of hippocampal neurite length and growth cone morphology. *Nat Neurosci* **6**:837-845.
- Grycova, L., B. Holendova, L. Bumba, J. Bily, M. Jirku, Z. Lansky, and J. Teisinger. 2012.** Integrative binding sites within intracellular termini of TRPV1 receptor. *PLoS One* **7**:e48437.
- Guler, A. D., H. Lee, T. Iida, I. Shimizu, M. Tominaga, and M. Caterina. 2002.** Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *J Neurosci* **22**:6408-6414.
- Helliwell, R. J., L. M. McLatchie, M. Clarke, J. Winter, S. Bevan, and P. McIntyre. 1998.** Capsaicin sensitivity is associated with the expression of the vanilloid (capsaicin) receptor (VR1) mRNA in adult rat sensory ganglia. *Neurosci Lett* **250**:177-180.
- Hinman, A., H. H. Chuang, D. M. Bautista, and D. Julius. 2006.** TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:19564-19568.
- Hu, H. Z., Q. Gu, C. Wang, C. K. Colton, J. Tang, M. Kinoshita-Kawada, L. Y. Lee, J. D. Wood, and M. X. Zhu. 2004.** 2-aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3. *J Biol Chem* **279**:35741-35748.
- Huang, S. M., H. Lee, M. K. Chung, U. Park, Y. Y. Yu, H. B. Bradshaw, P. A. Coulombe, J. M. Walker, and M. J. Caterina. 2008.** Overexpressed transient receptor potential vanilloid 3 ion channels in skin keratinocytes modulate pain sensitivity via prostaglandin E2. *J Neurosci* **28**:13727-13737.
- Huang, S. M., X. Li, Y. Yu, J. Wang, and M. J. Caterina. 2011.** TRPV3 and TRPV4 ion channels are not major contributors to mouse heat sensation. *Mol Pain* **7**:37.
- Hwang, S. W., H. Cho, J. Kwak, S. Y. Lee, C. J. Kang, J. Jung, S. Cho, K. H. Min, Y. G. Suh, D. Kim, and U. Oh. 2000.** Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:6155-6160.
- Chuang, H. H., W. M. Neuhausser, and D. Julius. 2004.** The super-cooling agent icilin reveals a mechanism of coincidence detection by a temperature-sensitive TRP channel. *Neuron* **43**:859-869.
- Chung, M. K., H. Lee, and M. J. Caterina. 2003.** Warm temperatures activate TRPV4 in mouse 308 keratinocytes. *J Biol Chem* **278**:32037-32046.
- Jaquemar, D., T. Schenker, and B. Trueb. 1999.** An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts. *J Biol Chem* **274**:7325-7333.

- Jordt, S. E., D. M. Bautista, H. H. Chuang, D. D. McKemy, P. M. Zygmunt, E. D. Hogestatt, I. D. Meng, and D. Julius. 2004.** Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* **427**:260-265.
- Kanzaki, M., Y. Q. Zhang, H. Mashima, L. Li, H. Shibata, and I. Kojima. 1999.** Translocation of a calcium-permeable cation channel induced by insulin-like growth factor-I. *Nat Cell Biol* **1**:165-170.
- Karashima, Y., N. Damann, J. Prenen, K. Talavera, A. Segal, T. Voets, and B. Nilius. 2007.** Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1. *J Neurosci* **27**:9874-9884.
- Karashima, Y., K. Talavera, W. Everaerts, A. Janssens, K. Y. Kwan, R. Vennekens, B. Nilius, and T. Voets. 2009.** TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:1273-1278.
- Kim, A. Y., Z. Tang, Q. Liu, K. N. Patel, D. Maag, Y. Geng, and X. Dong. 2008.** Pirt, a phosphoinositide-binding protein, functions as a regulatory subunit of TRPV1. *Cell* **133**:475-485.
- Knowlton, W. M., A. Bifulco-Fisher, D. M. Bautista, and D. D. McKemy. 2010.** TRPM8, but not TRPA1, is required for neural and behavioral responses to acute noxious cold temperatures and cold-mimetics in vivo. *Pain* **150**:340-350.
- Kobayashi, K., T. Fukuoka, K. Obata, H. Yamanaka, Y. Dai, A. Tokunaga, and K. Noguchi. 2005.** Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with adelta/c-fibers and colocalization with trk receptors. *J Comp Neurol* **493**:596-606.
- Kort, M. E., and P. R. Kym. 2012.** TRPV1 antagonists: clinical setbacks and prospects for future development. *Prog Med Chem* **51**:57-70.
- Kwan, K. Y., A. J. Allchorne, M. A. Vollrath, A. P. Christensen, D. S. Zhang, C. J. Woolf, and D. P. Corey. 2006.** TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron* **50**:277-289.
- Lee, H., T. Iida, A. Mizuno, M. Suzuki, and M. J. Caterina. 2005.** Altered thermal selection behavior in mice lacking transient receptor potential vanilloid 4. *J Neurosci* **25**:1304-1310.
- Liedtke, W., and J. M. Friedman. 2003.** Abnormal osmotic regulation in *trpv4*^{-/-} mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:13698-13703.
- Liedtke, W., Y. Choe, M. A. Marti-Renom, A. M. Bell, C. S. Denis, A. Sali, A. J. Hudspeth, J. M. Friedman, and S. Heller. 2000.** Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell* **103**:525-535.
- Link, T. M., U. Park, B. M. Vonakis, D. M. Raben, M. J. Soloski, and M. J. Caterina. 2010.** TRPV2 has a pivotal role in macrophage particle binding and phagocytosis. *Nat Immunol* **11**:232-239.

- Lishko, P. V., E. Procko, X. Jin, C. B. Phelps, and R. Gaudet. 2007.** The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron* **54**:905-918.
- Liu, D., and E. R. Liman. 2003.** Intracellular Ca²⁺ and the phospholipid PIP₂ regulate the taste transduction ion channel TRPM5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:15160-15165.
- Lukacs, V., B. Thyagarajan, P. Varnai, A. Balla, T. Balla, and T. Rohacs. 2007.** Dual regulation of TRPV1 by phosphoinositides. *J Neurosci* **27**:7070-7080.
- Mandadi, S., T. Sokabe, K. Shibasaki, K. Katanosaka, A. Mizuno, A. Moqrich, A. Patapoutian, T. Fukumi-Tominaga, K. Mizumura, and M. Tominaga. 2009.** TRPV3 in keratinocytes transmits temperature information to sensory neurons via ATP. *Pflugers Arch* **458**:1093-1102.
- McNamara, C. R., J. Mandel-Brehm, D. M. Bautista, J. Siemens, K. L. Deranian, M. Zhao, N. J. Hayward, J. A. Chong, D. Julius, M. M. Moran, and C. M. Fanger. 2007.** TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:13525-13530.
- Moqrich, A., S. W. Hwang, T. J. Earley, M. J. Petrus, A. N. Murray, K. S. Spencer, M. Andahazy, G. M. Story, and A. Patapoutian. 2005.** Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science* **307**:1468-1472.
- Moriyama, T., T. Higashi, K. Togashi, T. Iida, E. Segi, Y. Sugimoto, T. Tominaga, S. Narumiya, and M. Tominaga. 2005.** Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. *Mol Pain* **1**:3.
- Moriyama, T., T. Iida, K. Kobayashi, T. Higashi, T. Fukuoka, H. Tsumura, C. Leon, N. Suzuki, K. Inoue, C. Gachet, K. Noguchi, and M. Tominaga. 2003.** Possible involvement of P2Y₂ metabotropic receptors in ATP-induced transient receptor potential vanilloid receptor 1-mediated thermal hypersensitivity. *J Neurosci* **23**:6058-6062.
- Muraki, K., Y. Iwata, Y. Katanosaka, T. Ito, S. Ohya, M. Shigekawa, and Y. Imaizumi. 2003.** TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. *Circ Res* **93**:829-838.
- Neeper, M. P., Y. Liu, T. L. Hutchinson, Y. Wang, C. M. Flores, and N. Qin. 2007.** Activation properties of heterologously expressed mammalian TRPV2: evidence for species dependence. *J Biol Chem* **282**:15894-15902.
- Nilius, B., and G. Owsianik. 2011.** The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol* **12**:218.
- Park, U., N. Vastani, Y. Guan, S. N. Raja, M. Koltzenburg, and M. J. Caterina. 2011.** TRP vanilloid 2 knock-out mice are susceptible to perinatal lethality but display normal thermal and mechanical nociception. *J Neurosci* **31**:11425-11436.
- Peier, A. M., A. J. Reeve, D. A. Andersson, A. Moqrich, T. J. Earley, A. C. Hergarden, G. M. Story, S. Colley, J. B. Hogenesch, P. McIntyre, S. Bevan, and A. Patapoutian. 2002.** A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science* **296**:2046-2049.

- Perez, C. A., L. Huang, M. Rong, J. A. Kozak, A. K. Preuss, H. Zhang, M. Max, and R. F. Margolskee. 2002.** A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells. *Nat Neurosci* **5**:1169-1176.
- Prescott, E. D., and D. Julius. 2003.** A modular PIP2 binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity. *Science* **300**:1284-1288.
- Qin, F. 2007.** Regulation of TRP ion channels by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Handb Exp Pharmacol*:509-525.
- Qin, N., M. P. Neepser, Y. Liu, T. L. Hutchinson, M. L. Lubin, and C. M. Flores. 2008.** TRPV2 is activated by cannabidiol and mediates CGRP release in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* **28**:6231-6238.
- Siemens, J., S. Zhou, R. Piskorowski, T. Nikai, E. A. Lumpkin, A. I. Basbaum, D. King, and D. Julius. 2006.** Spider toxins activate the capsaicin receptor to produce inflammatory pain. *Nature* **444**:208-212.
- Smith, G. D., M. J. Gunthorpe, R. E. Kelsell, P. D. Hayes, P. Reilly, P. Facer, J. E. Wright, J. C. Jerman, J. P. Walhin, L. Ooi, J. Egerton, K. J. Charles, D. Smart, A. D. Randall, P. Anand, and J. B. Davis. 2002.** TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature* **418**:186-190.
- Smith, P. L., K. N. Maloney, R. G. Pothén, J. Clardy, and D. E. Clapham. 2006.** Bisandrographolide from *Andrographis paniculata* activates TRPV4 channels. *J Biol Chem* **281**:29897-29904.
- Story, G. M., A. M. Peier, A. J. Reeve, S. R. Eid, J. Mosbacher, T. R. Hricik, T. J. Earley, A. C. Hergarden, D. A. Andersson, S. W. Hwang, P. McIntyre, T. Jegla, S. Bevan, and A. Patapoutian. 2003.** ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* **112**:819-829.
- Strotmann, R., C. Harteneck, K. Nunnenmacher, G. Schultz, and T. D. Plant. 2000.** OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nat Cell Biol* **2**:695-702.
- Sugiura, T., M. Tominaga, H. Katsuya, and K. Mizumura. 2002.** Bradykinin lowers the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1. *J Neurophysiol* **88**:544-548.
- Suzuki, M., A. Mizuno, K. Kodaira, and M. Imai. 2003.** Impaired pressure sensation in mice lacking TRPV4. *J Biol Chem* **278**:22664-22668.
- Szallasi, A., and P. M. Blumberg. 1999.** Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev* **51**:159-212.
- Takahashi, N., Y. Mizuno, D. Kozai, S. Yamamoto, S. Kiyonaka, T. Shibata, K. Uchida, and Y. Mori. 2008.** Molecular characterization of TRPA1 channel activation by cysteine-reactive inflammatory mediators. *Channels (Austin)* **2**:287-298.

- Talavera, K., K. Yasumatsu, T. Voets, G. Droogmans, N. Shigemura, Y. Ninomiya, R. F. Margolskee, and B. Nilius. 2005.** Heat activation of TRPM5 underlies thermal sensitivity of sweet taste. *Nature* **438**:1022-1025.
- Todaka, H., J. Taniguchi, J. Satoh, A. Mizuno, and M. Suzuki. 2004.** Warm temperature-sensitive transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) plays an essential role in thermal hyperalgesia. *J Biol Chem* **279**:35133-35138.
- Tominaga, M., M. J. Caterina, A. B. Malmberg, T. A. Rosen, H. Gilbert, K. Skinner, B. E. Raumann, A. I. Basbaum, and D. Julius. 1998.** The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* **21**:531-543.
- Trevisani, M., J. Siemens, S. Materazzi, D. M. Bautista, R. Nassini, B. Campi, N. Imamachi, E. Andre, R. Patacchini, G. S. Cottrell, R. Gatti, A. I. Basbaum, N. W. Bunnett, D. Julius, and P. Geppetti. 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.
- Trevisani, M., D. Smart, M. J. Gunthorpe, M. Tognetto, M. Barbieri, B. Campi, S. Amadesi, J. Gray, J. C. Jerman, S. J. Brough, D. Owen, G. D. Smith, A. D. Randall, S. Harrison, A. Bianchi, J. B. Davis, and P. Geppetti. 2002.** Ethanol elicits and potentiates nociceptor responses via the vanilloid receptor-1. *Nat Neurosci* **5**:546-551.
- Ufret-Vincenty, C. A., R. M. Klein, L. Hua, J. Angueyra, and S. E. Gordon. 2011.** Localization of the PIP2 sensor of TRPV1 ion channels. *J Biol Chem* **286**:9688-9698.
- Vellani, V., S. Mapplebeck, A. Moriondo, J. B. Davis, and P. A. McNaughton. 2001.** Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *J Physiol* **534**:813-825.
- Voets, T., G. Droogmans, U. Wissenbach, A. Janssens, V. Flockerzi, and B. Nilius. 2004.** The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* **430**:748-754.
- Vriens, J., G. Owsianik, B. Fisslthaler, M. Suzuki, A. Janssens, T. Voets, C. Morisseau, B. D. Hammock, I. Fleming, R. Busse, and B. Nilius. 2005.** Modulation of the Ca²⁺ permeable cation channel TRPV4 by cytochrome P450 epoxygenases in vascular endothelium. *Circ Res* **97**:908-915.
- Vriens, J., G. Owsianik, T. Hofmann, S. E. Philipp, J. Stab, X. Chen, M. Benoit, F. Xue, A. Janssens, S. Kerselaers, J. Oberwinkler, R. Vennekens, T. Gudermann, B. Nilius, and T. Voets. 2011.** TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat. *Neuron* **70**:482-494.
- Wagner, T. F., S. Loch, S. Lambert, I. Straub, S. Mannebach, I. Mathar, M. Dufer, A. Lis, V. Flockerzi, S. E. Philipp, and J. Oberwinkler. 2008.** Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic beta cells. *Nat Cell Biol* **10**:1421-1430.

- Walder, R. Y., R. Radhakrishnan, L. Loo, L. A. Rasmussen, D. P. Mohapatra, S. P. Wilson, and K. A. Sluka. 2012.** TRPV1 is important for mechanical and heat sensitivity in uninjured animals and development of heat hypersensitivity after muscle inflammation. *Pain* **153**:1664-1672.
- Watanabe, H., J. B. Davis, D. Smart, J. C. Jerman, G. D. Smith, P. Hayes, J. Vriens, W. Cairns, U. Wissenbach, J. Prenen, V. Flockerzi, G. Droogmans, C. D. Benham, and B. Nilius. 2002.** Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol derivatives. *J Biol Chem* **277**:13569-13577.
- Watanabe, H., J. Vriens, J. Prenen, G. Droogmans, T. Voets, and B. Nilius. 2003.** Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature* **424**:434-438.
- Wissenbach, U., M. Boddling, M. Freichel, and V. Flockerzi. 2000.** Trp12, a novel Trp related protein from kidney. *FEBS Lett* **485**:127-134.
- Xiao, B., A. E. Dubin, B. Bursulaya, V. Viswanath, T. J. Jegla, and A. Patapoutian. 2008.** Identification of transmembrane domain 5 as a critical molecular determinant of menthol sensitivity in mammalian TRPA1 channels. *J Neurosci* **28**:9640-9651.
- Xu, H., M. Delling, J. C. Jun, and D. E. Clapham. 2006.** Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nat Neurosci* **9**:628-635.
- Xu, H., I. S. Ramsey, S. A. Kotecha, M. M. Moran, J. A. Chong, D. Lawson, P. Ge, J. Lilly, I. Silos-Santiago, Y. Xie, P. S. DiStefano, R. Curtis, and D. E. Clapham. 2002.** TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* **418**:181-186.
- Zhang, X., J. Huang, and P. A. McNaughton. 2005.** NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *Embo J* **24**:4211-4223.
- Zhang, Y., M. A. Hoon, J. Chandrashekar, K. L. Mueller, B. Cook, D. Wu, C. S. Zuker, and N. J. Ryba. 2003.** Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* **112**:293-301.
- Zimmermann, K., J. K. Lennerz, A. Hein, A. S. Link, J. S. Kaczmarek, M. Delling, S. Uysal, J. D. Pfeifer, A. Riccio, and D. E. Clapham. 2011.** Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 5 (TRPC5) is a cold-transducer in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:18114-18119.
- Zygmunt, P. M., J. Petersson, D. A. Andersson, H. Chuang, M. Sorgard, V. Di Marzo, D. Julius, and E. D. Hogestatt. 1999.** Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* **400**:452-457.