

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Doktorské studijní programy v biomedicině

Katedra fyziologie živočichů



Mgr. Lenka Maršáková

## **Modulační mechanismy nociceptivních TRP kanálů**

Modulatory mechanisms of nociceptive TRP channels

### **Disertační práce**

Pracoviště: Fyziologický ústav Akademie věd České republiky v.v.i.

Oddělení buněčné neurofyziologie

Vedoucí práce: RNDr. Viktorie Vlachová, DrSc.

Konzultant: RNDr. Jan Krůšek, Ph.D.

Praha, 2012

# PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Disertační práce byla podporována Grantovou agenturou univerzity Karlovy (GAUK 25409 a 26110).

V Praze 12. 11. 2012

Podpis:

## PODĚKOVÁNÍ

V první řadě bych ráda poděkovala své školitelce dr. Viktorii Vlachové za její trpělivost, odborný i přátelský přístup a za ochotu, s kterou mi pokaždé pomohla vyřešit či zodpovědět jakýkoli problém či dotaz. Děkuji také dr. Janu Krůškovi za jeho vstřícnost a za čas, který mi věnoval při řešení fluorescenčních experimentů a za jeho cenné rady. Dále děkuji ing. Ivanu Dittertovi za technickou podporu a za stálý přísun vtipů. Také bych ráda poděkovala dr. Janu Teisingerovi za odbornou pomoc v oblasti molekulární biologie. Nemalé poděkování patří Magdičce Kuntošové a to nejen za přípravu tkáňových linií. Tímto děkuji také za spolupráci mým kolegům jmenovitě: Štěpánce Boukalové, Lucii Suré, Filipu Touškovi a Anně Hynkové, bez kterých by tato práce nevznikla. V neposlední řadě děkuji celému týmu laboratoře buněčné neurofyzologie za vytvoření přátelského prostředí, svým přátelům a Vojtovi za podporu.

# OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	6
ABSTRAKT.....	8
<b>1. LITERÁRNÍ ÚVOD .....</b>	<b>12</b>
1.1. Fyziologická funkce TRP kanálů .....	12
1.1.1. Nocicepce a bolest .....	12
1.1.2. Teplotní senzory organismu.....	14
1.1.3. Další funkce .....	17
1.2. Strukturní charakteristiky TRP receptorů .....	20
1.2.1. Pór iontového kanálu .....	23
1.2.2. Cytoplazmatické konce TRP receptorů.....	25
1.3. Aktivační a modulační mechanismy TRPV1.....	30
1.3.1. Aktivace TRPV1 .....	30
1.3.2. Modulace TRPV1 .....	34
1.4. Aktivační a modulační mechanismy TRPA1.....	45
1.4.1. Aktivace TRPA1 .....	45
1.4.2. Modulace TRPA1 .....	49
<b>2. CÍLE STUDIE .....</b>	<b>52</b>
2.1. Mechanismus účinku kafru na TRPV1 kanál .....	52
2.2. Funkční a strukturální úloha S4-S5 oblasti u teplem aktivovaných TRPV kanálů .....	52
2.3. Úloha C-terminálního konce TRPA1 kanálu ve Ca <sup>2+</sup> aktivaci .....	53
<b>3. MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>54</b>
3.1. Chemikálie a roztoky .....	54
3.2. cDNA klony .....	55
3.3. Tkáňové kultury a transfekce.....	56
3.4. Cílená mutageneze .....	57

3.5.	Metoda terčíkového zámku (Patch clamp).....	59
3.6.	Förster resonance energy transfer (FRET).....	62
<b>4.</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>65</b>
4.1.	Mechanismus účinku kafru na TRPV1 kanál .....	65
4.2.	Funkční a strukturální úloha S4-S5 oblasti u teplem aktivovaných TRPV kanálů .....	77
4.3.	Úloha C-terminálního konce TRPA1 kanálu ve Ca <sup>2+</sup> aktivaci .....	83
<b>5.</b>	<b>DISKUZE</b> .....	<b>89</b>
5.1.	Mechanismus účinku kafru na TRPV1 kanál .....	89
5.2.	Funkční a strukturální úloha S4-S5 oblasti u teplem aktivovaných TRPV kanálů .....	94
5.3.	Úloha C-terminálního konce TRPA1 kanálu ve Ca <sup>2+</sup> aktivaci .....	97
<b>6.</b>	<b>SOUHRN</b> .....	<b>101</b>
6.1.	Mechanismus účinku kafru na TRPV1 kanál .....	101
6.2.	Funkční a strukturální úloha S4-S5 oblasti u teplem aktivovaných TRPV kanálů .....	102
6.3.	Úloha C-terminálního konce TRPA1 kanálu ve Ca <sup>2+</sup> aktivaci .....	103
<b>7.</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>104</b>
7.1.	Mechanismus účinku kafru na TRPV1 kanál .....	104
7.2.	Funkční a strukturální úloha S4-S5 oblasti u teplem aktivovaných TRPV kanálů .....	105
7.3.	Úloha C-terminálního konce TRPA1 kanálu ve Ca <sup>2+</sup> aktivaci .....	105
<b>8.</b>	<b>SEZNAM PUBLIKACÍ</b> .....	<b>106</b>
<b>9.</b>	<b>PŘÍLOHY</b> .....	<b>107</b>
<b>10.</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>108</b>

## SEZNAM ZKRATEK

2-APB	2-aminoetoxydifenylborát
AITC	allylisothiokyanát
AKAP	kinázy ukotvující protein, („A-kinase anchoring protein“)
ANK	ankyrin
ARD	část aminového konce TRP receptoru tvořené ankyriny
ATP	adenosintrifosfát
B <sub>2</sub>	bradykininový receptor
BK	napětím řízený draselný kanál
Ca <sup>2+</sup> /CaM	komplex kalmodulinu s navázanými ionty Ca <sup>2+</sup>
CaM	kalmodulin
CaMKII	Ca <sup>2+</sup> /kalmodulin dependentní kináza II
CFP	cerulean, modrý fluorescenční protein, („cyan fluorescent protein“)
Cin	cinamal, látka obsažená ve skořici
CMP	(1R)-(+)-kafr, („camphor“)
CNS	centrální nervový systém
DAG	1,2-diacylglycerol
diC8-PIP <sub>2</sub>	zkrácená - hydrofilnější forma PIP <sub>2</sub>
DMSO	dimethylsulfoxid
DRG	spinální ganglia, („dorsal root ganglia“)
ECS	extracelulární roztok
FRET	rezonanční přenos energie mezi fluorescenčními molekulami, („Förster resonance energy transfer“)
GFP	zelený fluorescenční protein, („green fluorescent protein“)
GPCR	receptor spřažený s G-proteiny, („G-protein couple receptor“)
HEK293T	lidské embryonální ledvinové buňky 293T
ICS	intracelulární roztok
IP <sub>3</sub>	inositol-1,4,5-trifosfát
kaps	kapsaicin
LB	médium pro pěstování bakterií
NGF	nervový růstový faktor, („nerve growth factor“)
PBS	fosfátový pufr

PH_CFP/YFP	PH doména („pleckstrin homology domains“) PLC $\delta$ 1 značená CFP nebo YFP proteinem
PIP <sub>2</sub>	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PKA	proteinkináza A
PKC	proteinkináza C
PLA <sub>2</sub>	fosfolipáza A <sub>2</sub>
PLC	fosfolipáza C
PNS	periferní nervový systém
RMSD	střední kvadratická odchylka predikce, („root mean square deviation“)
ROS	reaktivní kyslíkové sloučeniny, („reactive oxygen species“)
S1-S6	transmembránové helixy receptoru 1-6
SEM	střední chyba průměru, („standard error of the mean“)
TG	trigeminální ganglia, („trigeminal ganglia“)
Trk	tyrosin kinázové receptory
TRP	„Transient Receptor Potential“ iontový kanál
TRPA1	ankyrinový TRP receptor typu 1
TRPC	kanonický TRP receptor
TRPM	melastatinový TRP receptor
TRPP	polycystinový TRP receptor
TRPV	vaniloidní TRP receptor
TRPV1	vaniloidní receptor typu 1, kapsaicinový receptor
U73122	inhibitor PLC
U73343	neaktivní forma inhibitoru PLC
WT	divoký typ receptoru, („wild type“)
YFP	žlutý fluorescenční protein, („yellow fluorescent protein“)

## ABSTRAKT

Detekce bolestivých podnětů na periférii a jejich transdukce do CNS je zprostředkována některými zástupci teplotně citlivých transient receptor potential (TRP) kanálů, kteří se exprimují na volných zakončeních primárních aferentních sensorických neuronů nazývaných nociceptory. Prostřednictvím TRP kanálů nociceptory vnímají nejen teplotní stimuly, ale také podněty mechanické a chemické. Ze sedmi v současnosti identifikovaných teplotně citlivých TRP kanálů jsou za detekci bolestivých teplotních podnětů zodpovědní dva teplem aktivovaní zástupci vaniloidních receptorů: TRPV1 ( $\geq 42\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), TRPV2 ( $\geq 52\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a jeden chladem aktivovaný zástupce ankyrinových receptorů TRPA1 ( $\leq 17\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Tyto kanály jsou typické složitým a dosud neznámým mechanismem působení, jejichž poznání je nezbytné k pochopení jejich komplexních funkcí v organismu a následně pro navrhování potenciálních analgetik. Nové poznatky, které jsou náplní této studie, směřují k objasnění mechanismů působení dvou výše zmíněných nociceptivních receptorů TRPV1 a TRPA1, se zaměřením na kافrovou a napětovou citlivost TRPV1 a vápníkovou modulaci TRPA1 receptoru.

Prvním tématem, které je v této práci diskutováno, je modulační mechanismus kafru na TRPV1 receptor. Kafr je účinnou, v přírodě se vyskytující látkou používanou díky svým analgetickým účinkům od nepaměti. Její mechanismus působení je však neznámý. Kafr je znám jako parciální agonista TRPV1 receptoru, plný agonista TRPV3 receptoru, ale i jako inhibitor savčího receptoru TRPA1. Působení kafru bylo v rámci této studie studováno nejen na úrovni vaniloidního receptoru typu 1, ale i na úrovni změn vlastností membrány v přítomnosti této látky. Ukázalo se, že kafr je schopen velmi rychle aktivovat TRPV1 receptor, a to prostřednictvím konformační změny krátkého helixu, který je situován uvnitř póru kanálu. Tento helix byl navržen i jako místo interakce kafru s receptorem. Stejně dobře kafr mění distribuci důležitého modulátoru vaniloidního receptoru fosfatidylinositolu-4,5-bisfosfátu na vnitřním listu membrány, což může představovat důležitý způsob modulace membránových receptorů.

Z hlediska základních strukturálně funkčních vlastností byla u TRPV1 receptoru studována úloha intracelulární části S4-S5 helixů a byla porovnána funkce odpovídajících aminokyselin u dvou dalších zástupců vaniloidních receptorů, TRPV2



a TRPV3. Přestože je studovaná oblast mezi těmito zástupci vysoce konzervovaná, ukázalo se, že nabitá rezidua v této oblasti mají mezi jednotlivými zástupci odlišné funkce v jejich teplotní, napěťové a chemické citlivosti. Byla identifikována rezidua nezbytná pro napěťovou a teplotní modulaci kapsaicinem aktivovaného TRPV1 kanálu.

Závěrečným tématem diskutovaným v rámci této práce je úloha distální části C-terminálního konce TRPA1 receptoru v aktivaci vápenatými ionty. TRPA1 je iontový kanál, jehož funkce je silně modulovaná ionty  $\text{Ca}^{2+}$ , ale mechanismus této modulace nebyl zatím uspokojivě objasněn. Na základě našich experimentálních dat usuzujeme na funkci distální domény C-konce jako vápníkového senzoru TRPA1 receptoru. Záměnami kyselých aminokyselin v této oblasti byla prokázána úloha těchto reziduí ve  $\text{Ca}^{2+}$ -indukované potenciaci a inaktivaci tohoto kanálu. Výsledky této části předložené dizertační práce napomáhají k porozumění funkce TRPA1 receptoru v chemické nocicepci.

## ABSTRACT

Detection of painful stimuli in the periphery is mediated by temperature-sensitive transient receptor potential (TRP) channels which are expressed in primary afferent endings of free sensory neurons called nociceptors. TRP channels in nociceptors are involved in the detection of thermal, but also mechanical and chemical stimuli. Out of seven known types of temperature-sensitive TRP channels, three are responsible for detecting painful temperatures: vanilloid receptors TRPV1 ( $> 42\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) and TRPV2 ( $> 52\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) detect noxious heat, and ankyrin receptor TRPA1 detects noxious cold ( $< 17\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Better knowledge of TRP channel mechanisms of action is essential for understanding TRP channel functions and ultimately for the design of potential analgesics. New findings presented in this thesis clarify mechanisms of action of TRPV1 and TRPA1 receptors, focusing on camphor and voltage sensitivity of TRPV1 channels and calcium modulation of TRPA1 channels.

The first topic discussed in this thesis is the mechanism of camphor sensitivity of TRPV1 receptor. Camphor is a naturally occurring substance known since time immemorial for its effective analgesic properties, yet its mechanism of action is not understood. Camphor is known to be a partial agonist of TRPV1 channel, a full agonist of TRPV3 channel, but also an inhibitor of TRPA1 channel. In this study we investigated the effects of camphor on TRPV1 activity, as well as camphor-induced changes in the properties of plasma membrane. We found that camphor is able to quickly activate TRPV1 channels through conformational changes in a short helix located inside the channel pore. This helix is proposed as the site of camphor interaction with the receptor. Moreover, camphor induced changes in the distribution of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, a minor phospholipid component of the plasma membrane and an important TRPV1 modulator. This mechanism of action can be also important for camphor-induced modulation of other  $\text{PIP}_2$ -sensitive membrane receptors.

In addition to camphor sensitivity of TRPV1, we have studied the function of the S4-S5 region of TRPV1. The results were compared with the function of corresponding amino acids in two other vanilloid channels, TRPV2 and TRPV3. Although the residues within the S4-S5 region are strongly conserved among TRPV

channels, some of the conserved charged residues serve distinct functions in thermal, voltage, and chemical sensitivity of the different members of the TRPV family.

The final topic discussed in this thesis is the role of the distal part of the C-terminal end of the TRPA1 channel in calcium-dependent modulation. TRPA1 is an ion channel whose function is strongly modulated by  $\text{Ca}^{2+}$  ions, but the mechanism of this modulation has not been identified. Our experimental data suggest that the C terminus of the TRPA1 receptor serves as a calcium sensor. Amino acid substitutions in this area have demonstrated the role of these residues in  $\text{Ca}^{2+}$ -induced potentiation and inactivation. These results contribute to a better understanding of TRPA1 channel function in chemical nociception.

# 1. LITERÁRNÍ ÚVOD

## 1.1. Fyziologická funkce TRP kanálů

„*Transient receptor potential*“ (TRP) kanály představují jednu z největších a evolučně původních rodin iontových kanálů, jejíž zástupci jsou exprimováni téměř ve všech typech živočišných tkání, kde plní nejrůznější funkce, včetně funkcí nezbytných k samotnému přežití organismu.

Zásadní událostí pro současný stav poznání těchto receptorů bylo vyklonování a charakterizace vaniloidního receptoru typu 1 (TRPV1), který je exprimován na periferních i centrálních zakončeních primárních aferentních sensorických neuronů (Caterina et al., 1997). Následný výzkum ukázal, že TRPV1 společně s ostatními identifikovanými zástupci TRP kanálů plní úlohu transdukčních molekul, které na nervovém zakončení umožňují detekovat celou řadu vnějších podnětů, rozpoznat mezi nimi podněty škodlivé a neškodné a předat tuto informaci do centrální nervové soustavy (CNS). Mechanismus sensorické transdukce spočívá v aktivaci TRP kanálů specifickým podnětem, v depolarizaci buněčné membrány a ve vzniku akčního potenciálu, který je poté převeden zadními rohy míšními do mozku. Identifikace intenzity a druhu (modality) aktivačního podnětu nezávisí pouze na počtu exprimovaných receptorů, ale především na typu přítomných TRP kanálů.

Polymodální kanály TRPV1 a TRPA1 jsou klíčovými molekulami, které na primárních sensorických neuronech zajišťují detekci podnětů, jež vyvolávají u člověka bolest a pravděpodobně se uplatňují v mechanismech chemické, tepelné a mechanické nocicepce za fyziologických i patofyziologických podmínek. Nejdůležitější předpokládané fyziologické funkce těchto receptorů jsou uvedeny v následující části kapitoly.

### 1.1.1. Nocicepce a bolest

Bolest je nepříjemný sensorický a emocionální vjem spojený se skutečným, nebo potenciálním poškozením tkáně, nebo popisovaný výrazy pro takové poškození (definice dle Mezinárodní asociace pro studium bolesti IASP). Bolest je nezbytná

pro zachování zdraví jedince, kterého varuje před potenciálně nebezpečnými podněty.

Kromě této pozitivní úlohy akutní bolesti se však bolest uplatňuje i v patologických stavech, kdy v přetrvávající formě může způsobit nevratné poškození organismu. Za patologické stavy lze považovat nejen přehnané, ale i nedostačující reakce na vnější podněty. Například bolest může být vyvolána podnětem mnohem nižší intenzity než u zdravého jedince (hyperalgie), nebo také podnětem, který u zdravého jedince bolest nevyvolává (alodynie).

Dle podnětu, který bolest vyvolává, lze rozlišovat mezi nociceptivní, zánětlivou a neuropatickou bolestí. Společným účastníkem všech tří typů bolesti je právě dvojice TRPV1 a TRPA1 kanálů (Chung et al., 2011, Stucky et al., 2009). Nociceptivní bolest má ochranný charakter a je vyvolána škodlivými podněty působícími na nociceptory na periférii. Tento druh bolesti je vyvolán vysokoprahovým podnětem a projevuje se jako akutní trauma. Naopak zánětlivá bolest je vyvolána nízkoprahovými zánětlivými faktory na úrovni periferní nervové soustavy (PNS) i CNS. Zánětlivé podněty působí nejen na nociceptory, ale také na nenociceptivní senzorycké neurony. Tato bolest má funkci opravnou, či léčivou; například pooperační bolest, či bolest při artritidě. Nízkoprahová neuropatická bolest může být vyvolána také neuronálním poškozením či ektopickým pálením. Působí podobně jako bolest při zánětu na nociceptory i jiné senzorycké neurony v rámci PNS i CNS. Funkce této bolesti je patofyziologická a vyskytuje se například při neuronálních lézích (Kuner, 2010).

Jako model při studiu bolesti jsou používány neurony, které exprimují TRPV1 receptor. Expozice těchto neuronů pálivé složce chilli papriček – kapsaicinu aktivuje TRPV1 kanály a na úrovni živého organismu vyvolává intenzivní pocit pálení a bolesti doprovázený desenzitizací TRPV1, která je zřejmě příčinou následného snížení bolestivého pocitu. Paradoxně je právě pro tuto vlastnost kapsaicin využíván jako lokální analgetikum (Patapoutian et al., 2009).

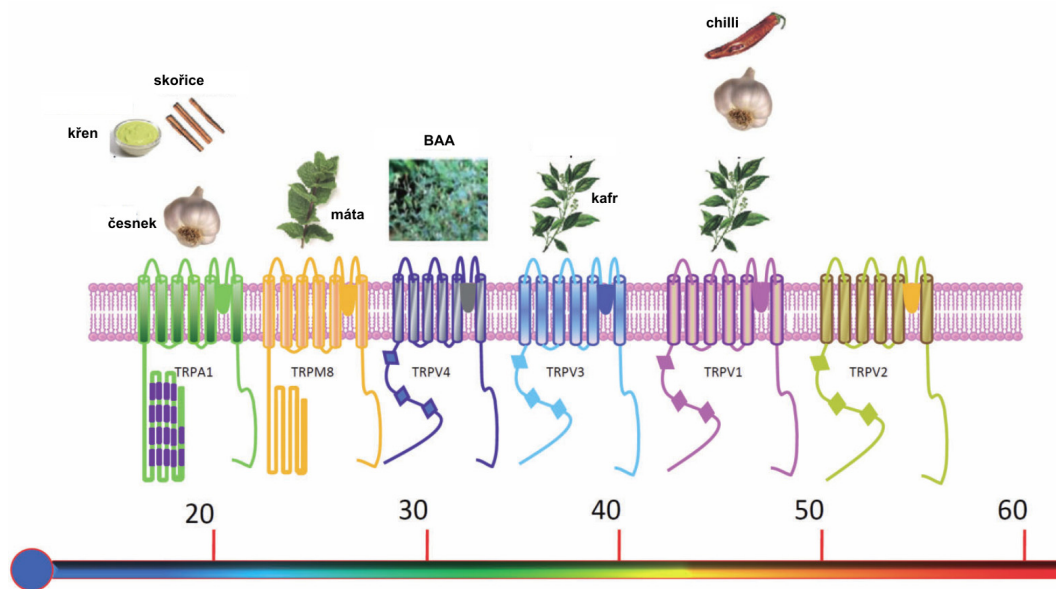
TRPV1 má rozhodující roli v teplotní nocicepci a hyperalgezií za patologických podmínek. TRPA1 se naopak účastní tkáňového poškození a vzniku varovných signálů. Kromě úlohy v chladové hyperalgezií přibývají i důkazy o úloze TRPA1 v hyperalgezií mechanické. Předpokládá se proto, že jak TRPV1, tak TRPA1 mohou být vhodným cílem při léčbě nejen patologické bolesti. Největším

problémem, se kterým se v současnosti farmakologické společnosti potýkají, je nízká selektivita inhibitorů těchto proteinů s významnými vedlejšími účinky.

Na nociceptorech je kromě TRPV1 a TRPA1 exprimována řada dalších TRP kanálů (TRPM8, TRPV3, TRPV4 a TRPC5), ale jejich úloha v nocicepci je teprve předmětem vědeckého bádání. Společnou vlastností zmíněných zástupců na nociceptorech je jejich charakteristická teplotní citlivost.

### 1.1.2. Teplotní senzory organismu

Rozpoznávání změn teploty v okolí je jednou ze základních vlastností organismů nezbytných k jejich přežití. Živočichové jsou o stavu okolní teploty informováni prostřednictvím teplotních sensorů v podobě některých zástupců TRP kanálů, kteří svými aktivačními prahy pokrývají celou teplotní škálu v rozmezí od bolestivého tepla až k bolestivému chladu (obr. 1.1.). Jak extrémně vysoké, tak i nízké teploty ohrožují udržení teplotní homeostázy organismu a je nezbytné, aby na tyto změny organismus příslušně reagoval. Podněty, které aktivují TRP kanály jež jsou součástí periferních zakončení nociceptorů, jako jsou extrémně vysoké či nízké teploty, jsou člověkem vnímány jako bolestivé.



**Obr. 1.1.: Membránová topologie savčích teplotně citlivých zástupců TRP kanálů.** TRP kanály se liší teplotním prahem aktivace, který se pohybuje od velmi vysokých teplot (TRPV2) až po nízké teploty (TRPA1). Každý z výše uvedených TRP kanálů je kromě teplotní aktivace aktivován také některými přírodními látkami (zdroj těchto látek je znázorněn obrázky nad strukturou daného receptoru), které jsou známy tím, že ovlivňují vnímání chladu nebo tepla. Vysvětlivky: BAA, bisandrographolid A. Obrázek byl převzat z publikace (Vay et al., 2012).

Kromě specifického rozsahu aktivačních teplot jsou pro teplotně citlivé TRP kanály známi různí aktivátoři rostlinného původu (tab. 1.2., str. 18). Tyto látky často ovlivňují vnímání teploty, a to takovým způsobem, který odpovídá teplotní aktivaci příslušného TRP kanálu. Například chladem aktivovaný TRPM8 je aktivován také mentolem obsaženým v mátě, při jehož požití nebo aplikaci na kůži cítíme příjemný chladivý pocit. Naopak teplem aktivovaný TRPV1 je aktivován pálivou složkou chilli paprik kapsaicinem, jehož konzumace je spojena s pocitem bolestivého tepla.

Sedm z celkem 30 identifikovaných savčích zástupců TRP kanálů je aktivováno při překročení určitého teplotního prahu. Vaniloidní zástupci TRPV1-4 převádějí informaci o zvýšené (TRPV3 a TRPV4) až bolestivé teplotě (TRPV1 a TRPV2) okolního prostředí (Caterina et al., 1999, Caterina et al., 1997, Peier et al., 2002, Xu et al., 2002). Naproti tomu TRPM8, TRPC5 a TRPA1 kanály jsou aktivovány mírným chladem, nebo chladem vyvolávajícím bolest (McKemy et al., 2002, Peier et al., 2002, Story et al., 2003, Zimmermann et al., 2011). Přesné hodnoty aktivačních teplot společně s místem nejčastějšího výskytu teplotně citlivých TRP kanálů jsou uvedeny v tabulce 1.1. (str. 16). Další tři zástupci TRPM2, TRPM4 a TRPM5 jsou také teplotně citliví, ale tyto iontové kanály nejsou specificky exprimovány na somatosenzorických neuronech, přestože zřejmě také mohou plnit úlohu molekulárních senzorů. Například TRPM5 je primárně exprimován v chuťových buňkách, kde zprostředkovává informaci o teplotě jídla (Talavera et al., 2005).

**Tab. 1.1.: Lokalizace a prahové hodnoty aktivace teplotně citlivých TRP kanálů.**  
*Vysvětlivky: DRG, neurony zadních kořenů míšních; TG, trigeminální ganglia; GIT, gastrointestinální trakt.*

RECEPTOR	EXPRESE	AKTIVACE	CITACE
TRPA1	DRG, TG, fibroblasty, vláskové buňky	< 17 °C	(Bandell et al., 2004, Story et al., 2003)
TRPM8	DRG, TG, prostata, játra, močový měchýř, cévy	23-27 °C	(Fonfria et al., 2006, McKemy et al., 2002, Peier et al., 2002, Tsavaler et al., 2001)
TRPV4	DRG, TG, mozek, srdce, játra, ledviny, keratinocyty, vejcovody, varlata, vnitřní ucho, cévy, průdušnice, žlučovody, močový měchýř, osteoklasty, osteoblasty	> 25 °C	(Eversaerts et al., 2010, Guler et al., 2002, Chung et al., 2004, Plant and Strotmann, 2007, Plant and Strotmann, 2007, Watanabe et al., 2002)
TRPC5	DRG, mozek, endoteliální buňky, spermie	25-37 °C	(Jiang et al., 2011, Zimmermann et al., 2011)
TRPV3	DRG, TG, mozek, keratinocyty, vlasové folikuly, varlata, jazyk	33-39 °C	(Peier et al., 2002, Smith et al., 2002, Xu et al., 2002)
TRPV1	DRG, TG, mozek, keratinocyty, vláskové buňky, kardiomyocyty, žírné buňky, glie, potní žlázy, močový měchýř, slinivka	> 43 °C	(Caterina et al., 1997, Nagy et al., 2004, Pingle et al., 2007, Steenland et al., 2006, Tominaga et al., 1998)
TRPV2	DRG, mozek, monocyty, GIT, slezina, žírné buňky, svalové buňky, plíce	> 52 °C	(Muraki et al., 2003, Neeper et al., 2007)

V současné době je vynakládáno velké úsilí na vývoj antagonistů především TRPV1 a TRPA1 receptorů, neboť blokátory těchto kanálů mohou představovat terapeutické využití jako analgetika. Účinnou alternativou ve vývoji nových analgetik může být řízení modulace iontových kanálů zánětlivými mediátory, neboť práh teplotní aktivace TRPV1 i TRPA1 je modulován extracelulárními mediátory poškození tkáně či zánětu (např. bradykinin, prostaglandiny, růstové faktory).



### 1.1.3. Další funkce

Kromě stěžejní úlohy některých TRP kanálů v transdukcii bolestivých a teplotních podnětů se tyto iontové kanály účastní nesčetných fyziologických procesů, jejichž seznam uvedený v tabulce 1.2. (str. 18) není zdaleka konečný. Řada fyziologických funkcí jednotlivých TRP receptorů *in vivo* byla sledována na myších, u kterých byl daný gen TRP receptoru vyřazen. Nejlépe prozkoumaným je zatím TRPV1 receptor.

Myš s vyřazeným funkčním genem pro TRPV1 receptor není schopna reagovat na akutní teplotní podněty v podmínkách experimentálně vyvolaného zánětu. Aplikací bradykininu, nervového růstového faktoru (NGF), nebo adenosintrifosfátu (ATP) bylo prokázáno, že TRPV1 receptor je skutečně kritickým mediátorem teplotní hyperalgesie při zánětlivých stavech a zraněních (Caterina et al., 2000, Davis et al., 2000). U geneticky pozměněné myši byla překvapivě pozorována predispozice k nadváze, která se projevovala s rostoucím věkem zvířete (Garami et al., 2011). Ve srovnání s divokým typem byla „knockout“ myš hyperaktivní (Garami et al., 2011), ačkoli dřívější práce žádnou změnu v pohybové aktivitě u takto pozměněných zvířat nepozorovaly (Caterina et al., 2000, Davis et al., 2000, Marsch et al., 2007). Navíc aktivitu zvířete s divokým typem TRPV1 receptoru lze potlačit podáním aktivátorů (resiniferatoxin, anandamid) a naopak zvýšit podáním inhibitoru vaniloidního receptoru AMG0347. Na základě těchto experimentů byla vyslovena hypotéza, že transdukce podnětů z periferie zprostředkovaná TRPV1 tonicky potlačuje pohybovou aktivitu (Garami et al., 2011). Jakým mechanismem to však tento receptor zajišťuje, není známo.

**Tab. 1.2.: Přehled charakteristických aktivátorů a fyziologických funkcí teplotně citlivých TRP kanálů.** Vysvětlivky: NADA, N-arachidonyl dopamin AA-DA; 12-HPETE, 12-hydroperoxyeicosatetraenová kyselina; 2-APB, 2-aminoetoxydifenylborát; 5,6-EET, 5,6-epoxyeicosatrienová kyselina; BAA, bisandrographolid A; ROS, reaktivní kyslíkové sloučeniny. Převzato a upraveno z (Nilius and Owsianik, 2011).

RECEPTOR	AKTIVACE	FYZIOLOGICKÁ FUNKCE
TRPA1	isothiokyanát, cinamal, acrolein, chlorine, ROS, formalín, mastné kyseliny, allicin, gingerol, prostanoidy, isoflurane, propofol, dihydropyridiny, klotrimazol, nikotin, mentol, kanabinoidy, eugenol, tymol	vnímání chladu; nocicepce; mechanocitlivost; čichové odpovědi; chladem indukovaná kontrakce tračnicku a močového měchýře (Story et al., 2003)
TRPM8	mentol, icilin, eukalyptol, kafr	vnímání chladu; pohyb spermií
TRPV4	napětí, forbol ester, 5,6-EET, anandamid, arachidonová kyselina, BAA	vnímání tepla; mechanocitlivost; osmotická citlivost; nocicepce; kontrola vylučování; modulace buněčné migrace; vznik, vývoj a odbourání kostí; kontrola adhezivních spojení v kůži
TRPC5	adenofostin A	vývoj mozku (společně s TRPC1); růst neuritu; pocit úzkosti, strachu a odměny v nucleus accumbens (Venkatachalam et al., 2003)
TRPV3	2-APB, kafr, karvacrol, incensol acetát, tymol, eugenol	vnímání tepla; nocicepce; integrita kůže, hojení ran, růst vlasů
TRPV1	kapsaicin, nízké pH, ethanol, kafr, anandamid, NADA, 12-HPETE, kafr, resiniferatoxin, allicin, 2-APB, lidokain, gingerol, shogaol, piperine monoacylglyceroly, $\omega$ -3 mastné kyseliny, depolarizační napětí	vnímání tepla; nocicepce; autonomní termoregulace; synaptická plasticita; bolest při zánětech; teplotní hyperalgesie; diabetes; obezita; funkce močového měchýře a střev; hypertenze; exkreční funkce ledvin; regulace příjmu potravy
TRPV2	2-APB, kanabidiol, napětí, osmotický stres	vnímání tepla; nocicepce; imunitní systém (fagocytóza makrofágů)

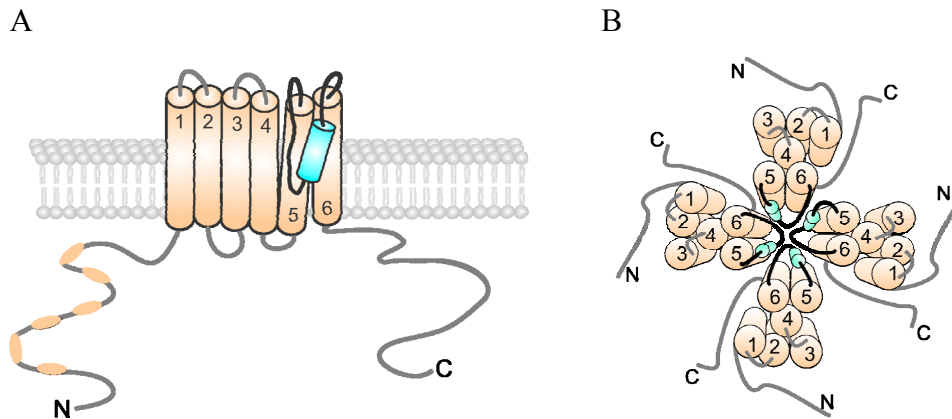
S pocitem bolesti úzce souvisí neméně důležitý klinický problém, a to pocit svědění. Tento vjem vyvolává touhu či reflex poškrabat se a stejně jako bolest se manifestuje v akutní i v chronické formě. Oba tyto nepříjemné vjemy mají pravděpodobně společného prostředníka, kterým je TRPV1 receptor. Látky vyvolávající bolest, stejně jako látky vyvolávající pocit svědění (např. histamin) specificky působí na primární senzorycké neurony. Přesvědčivým důkazem je experimentální pozorování, že u TRPV1 deficientní myši nebyla po injekčním podáním histaminu pozorována nutkavost poškrabat se (Patel and Dong, 2011). Histamin je znám tím, že generuje svědění, které je vyvoláno signálními drahami, jejichž součástí je TRPV1 receptor, neboť histaminergní receptory jsou spřažené

s G proteiny, v jejichž transdukční dráze leží fosfolipázy C (PLC) a A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), tedy enzymy přímo či nepřímo modulující aktivitu TRPV1 receptoru. Jiná studie stejné laboratoře naopak upozornila na klíčovou roli proteinu Pirt ve vyvolání pocitu svědění (Patel et al., 2011). Tento membránový protein interaguje s TRPV1 (Kim et al., 2008). U Pirt deficientních myší je eliminována či zásadně snížena potřeba škrabání po podání histaminu i látek nehistaminergních - na TRPV1 nezávislých (např. serotonin, antimalarikum chloroquin) (Patel et al., 2011, Patel and Dong, 2011).

## 1.2. Strukturní charakteristiky TRP receptorů

Uplynulo více než 40 let od počátku vědeckého zkoumání prvního zástupce TRP iontových kanálů ve fotoreceptorech *Drosophily* (Cosens and Manning, 1969, Montell and Rubin, 1989). Od té doby bylo u bezobratlých a obratlovců objeveno přes 70 dalších zástupců a bylo o nich napsáno přes 3 000 publikací (citace dostupné na portálu PubMed). Ačkoli máme v současnosti k dispozici velké množství informací o funkčních i strukturních charakteristikách jednotlivých zástupců TRP receptorů, k celkovému porozumění jejich fyziologické funkce dosud brání neznalost detailní struktury, nedostatečná informace o místech funkční exprese a nedostatečná selektivita jejich aktivátorů a inhibitorů. Do současnosti se nepodařilo připravit kompletní krystalovou strukturu proteinu o vysokém rozlišení ani pro jednoho ze zástupců těchto membránových proteinů. Příčinou je především velikost tetramerů, které TRP kanály přirozeně tvoří a jejichž podjednotky dosahují až 250 kDa (Li et al., 2011). Dalším zdrojem obtíží je charakteristická membránová topologie, pro níž je obecně obtížné získat velké množství čistého membránového proteinu ve stabilním stavu.

Funkční TRP kanály jsou lokalizovány nejen na membráně plazmatické, ale i na membránách buněčných organel resp. endoplazmatického retikula, endosomech či lysozomech (Dong et al., 2010, Gallego-Sandin et al., 2009, Toro et al., 2011). Údaje z dosavadních studií potvrzují, že funkční TRP kanál je tetramerem, jehož každá z podjednotek je tvořena šesti transmembránovými průniky (S1-S6) spojenými extra- a intracelulárními kličkami, z karboxylového a aminového konce směřujících do cytoplazmy (Clapham, 2003). Mezi pátou a šestou transmembránovou doménou (S5-S6) je lokalizována krátká hydrofobní klička („*P-loop*“), která společně s identickými částmi dalších tří podjednotek vytváří selektivní filtr a centrální pór kanálu, jímž ve směru elektrochemického gradientu procházejí kationty např.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  (Li et al., 2011, Owsianik et al., 2006; obr. 1.2.).



**Obr. 1.2.: Schematické uspořádání struktury TRPV1 receptoru.** A, Receptorová podjednotka je tvořena šesti transmembránovými helixy (1-6) protínajícími napříč membránu, intracelulárními C- a N-konci a pórovou kličkou mezi 5. a 6. helixem obsahující krátký helix (znázorněn modře). Na N-konci receptoru jsou ankyrinové domény. B, Pohled shora na tetramerní uspořádání TRP kanálu. Pórová klička jednotlivých podjednotek obsahující pórový helix tvoří centrálně situovaný pór iontového kanálu zajišťující selektivní průchod kationtů.

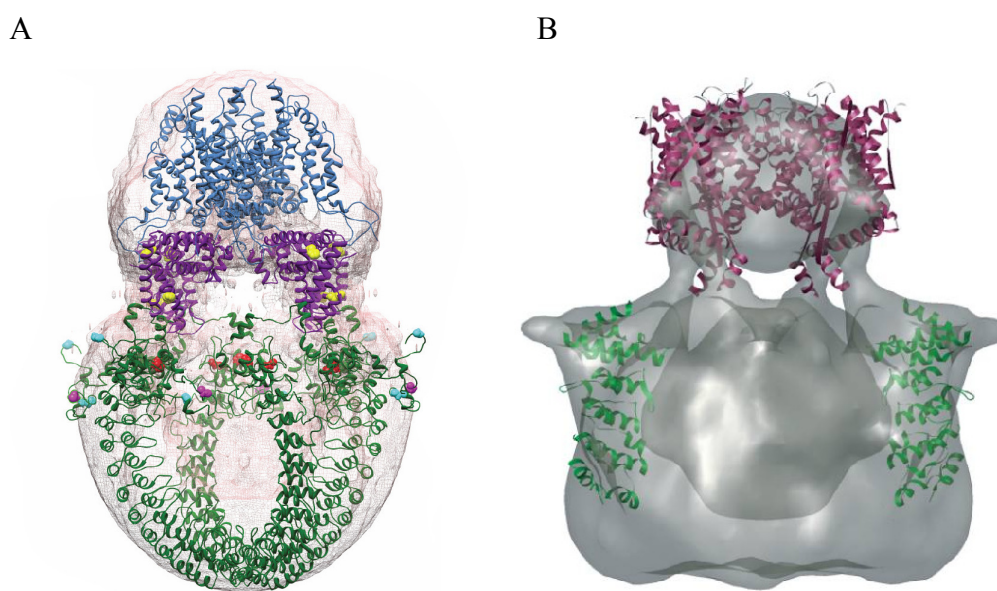
Například potkaní TRPV1 receptor je integrální protein o velikosti 95 kDa, jehož každá podjednotka je složena z 838 aminokyselin. Velká část proteinu ~ 70 % je tvořena cytoplazmatickými konci. Samotná transmembránová oblast S1-S6 je tvořena pouze 252 rezidui (433-684). V porovnání s tím je N-konec téměř jednou tak dlouhý (432) a C-konec je tvořen pouze 154 aminokyselinami (685-838) (Caterina et al., 1997). Tímto strukturním uspořádáním jsou TRP kanály nejvíce podobné napětově aktivovaným  $K^+$  kanálům tzv. „*Shaker-like*“, kanálům aktivovaným cyklickými nukleotidy či kanálům aktivovaným hyperpolarizací (Harteneck et al., 2000, Ramsey et al., 2006).

### Současná představa o struktuře TRP kanálů

Dosud nejpřesnější struktury celých TRP kanálů byly získány pomocí elektronové kryo-mikroskopie pro potkaní TRPV1 (Moiseenkova-Bell et al., 2008), potkaní TRPV4 (Shigematsu et al., 2010) a pro myší formu TRPA1 receptoru (Cvetkov et al., 2011). U těchto struktur s rozlišením 19, 35 a 16 Å (pro TRPV1, TRPV4 a TRPA1) jsou vždy zřetelné dvě oblasti. Jedna odpovídá cytoplazmatickým koncům připomínajícím tvar zavěšeného košíku, který na cytoplazmatické straně vytváří uzavřenou strukturu s centrální dutinou. Druhá, kompaktnější oblast odpovídá transmembránové části (viz struktura TRPA1 a TRPV1, obr. 1.3.).

Správnost získané elektronové struktury TRPV1 kanálu byla podpořena kompatibilitou této struktury s krystalovou strukturou transmembránové části homologního K<sub>v</sub>1.2 kanálu (Long et al., 2005) a s krystalovou strukturou aminového konce TRPV1 receptoru (Lishko et al., 2007; obr. 1.3.B).

Pomocí techniky elektronové mikroskopie byly připraveny také struktury zástupců jiných podskupin TRP kanálů: TRPC3, TRPM2 (Li et al., 2011), hlavními charakteristikami se však tyto kanály překvapivě odlišují od struktur TRPV1 a TRPA1 (Gaudet, 2008, Li et al., 2011). Detailní informace o nejdůležitějších doménách a regulačních místech se proto v následujícím textu zaměřují na iontové kanály, jejichž funkce byla předmětem studia této dizertační práce - kapsaicinový TRPV1 receptor a ankyrinový TRPA1 receptor.



**Obr. 1.3.: Struktury TRPA1 a TRPV1 kanálů získané elektronovou kryo-mikroskopií.** A, Struktura TRPA1 kanálu v zavřeném stavu bez navázaného ligandu. Na transmembránovou oblast homotetrameru (vyznačena modře, modelována na základě modelu lidského TRPV1 kanálu (Fernandez-Ballester and Ferrer-Montiel, 2008)) navazují N-koncové cytoplazmatické ankyrinové domény (vyznačeny zeleně) a kratší cytoplazmatické C-konce (zobrazeny fialově). Cytoplazmatické konce byly získány metodou počítačového modelování a dosazeny do struktury získané elektronovou mikroskopií. Převzato z (Cvetkov et al., 2011). B, Struktura TRPV1 kanálu získaná elektronovou kryo-mikroskopií na kterou je superponována známá krystalová struktura N-konce TRPV1 (zobrazena zeleně) a struktura transmembránové oblasti příbuzného draselného kanálu (Kv1.2) (zobrazena fialově). Převzato z (Moiseenkova-Bell et al., 2008).

### 1.2.1. Pór iontového kanálu

TRP kanály jsou kationtové kanály, které mají identickou strukturní organizaci póru a liší se selektivitou k daným kationtům. Většina z nich je dobře propustná pro vápenaté ionty. Pouze dva zástupci TRP kanálů jsou pro tyto ionty zcela nepropustné (TRPM4 a TRPM5) a další dva jsou naopak pro vápenaté ionty vysoce propustné (TRPV5 a TRPV6:  $P_{Ca^{2+}}/P_{Na^{+}} > 100$ ; Owsianik et al, 2006). Pór TRP kanálu je tvořen oblastmi S5-S6 helixů včetně pórové klíčky všech čtyř receptorových podjednotek za vzniku centrálně situované pórové domény. Pórová klíčka situovaná mezi zmíněnými helixy je tvořena krátkým helixem (pórovým helixem) a následující strukturně neuspořádanou částí, která představuje selektivní filtr pro průchod kationtů pórem.

#### TRPV1

TRPV1 kanál je neselektivní kationtový kanál ( $Ca^{2+} > Mg^{2+} > Na^{+} \sim K^{+} \sim Cs^{+}$ ) s vysokou propustností pro vápenaté ionty ( $P_{Ca^{2+}}/P_{Na^{+}} \sim 10$ ). Kromě těchto iontů je také propustný pro vodíkové kationty, což je pravděpodobná příčina intracelulární acidifikace nociceptivních neuronů po jeho aktivaci (Hellwig et al., 2004). Celková vodivost tohoto kanálu se pohybuje v rozmezí hodnot 35-80 pS (Caterina et al., 1997, Kedei et al., 2001, Niemeyer, 2005), tyto parametry však významně závisí na koncentraci vápníku v extracelulárním roztoku, na délce expozice a koncentraci agonisty např. kapsaicinu (Chung et al., 2008). Zajímavé je, že při vyšší koncentraci extracelulárního vápníku ( $> 10$  mM) dochází k poklesu relativní propustnosti kanálů, jenž je výraznější při vysokých koncentracích kapsaicinu. Naopak při nižší koncentraci extracelulárního vápníku ( $< 5$  mM), dochází k nárůstu relativní propustnosti. Chung a kolegové také zjistili, že při prodloužené aplikaci kapsaicinu dochází ke změně velikosti póru z jeho původní velikosti 6.8 na 10.1 Å (Chung et al., 2008). Dle jejich výsledků dochází k dilataci póru a upřednostňování propustnosti pro větší organické kationty.

Selektivní filtr vaniloidních TRP kanálů je konzervovaný a homologní se strukturně příbuznými napětím řízenými  $K^{+}$  kanály. Selektivní filtr  $K^{+}$  kanálů je typický sekvencí TVGYG, odpovídající sekvenci T<sup>641</sup>IGMG<sup>645</sup> u TRPV1 kanálu (Salazar et al., 2009). Experimentálně bylo ověřeno, že záměna methioninu M644 u TRPV1 za tyrosin (který je v této poloze u  $K^{+}$  kanálů) významně nezmění selektivitu iontového kanálu (Garcia-Martinez et al., 2000). Jakákoli záměna jiného

rezidua v pórové kličce však zásadně změni vlastnosti póru. Například neutralizací kyselého náboje aspartátu D646N dojde ke snížení citlivosti kanálu k ruthéniové červeni, která je blokátorem póru TRPV1 kanálu, a rovněž se sníží relativní propustnost kanálu pro bivalentní (dvojmocné) kationty (Garcia-Martinez et al., 2000). Reziduum D646 se tedy pravděpodobně účastní modulace pórových vlastností TRPV1 kanálu.

V roce 2009 byly u TRPV1 receptoru identifikovány dvě aminokyseliny, které uvnitř póru vytvářejí fyzickou překážku pro procházející ionty. První touto aminokyselinou je tyrosin 671 (Y671) situovaný uprostřed S6 domény a druhou je leucin 681 (L681) lokalizovaný na intracelulární straně téhož helixu. Zmíněný tyrosin pravděpodobně představuje vrátka kanálu, která po aktivaci teplem a kapsaicinem řídí průchod malých kationtů, zatímco leucin zabraňuje průchodu větších molekul (~ 6 Å) (Salazar et al., 2009).

Kromě regulace průchodu iontů je oblast póru také místem vazby agonistů TRPV1 kanálu - kromě protonů jsou to i jiné mono-, bi-, trivalentní kationty, polyaminy, gadolinium či moterpenoidní sloučenina kafr (Ahern et al., 2005, Ahern et al., 2006, Marsakova et al., 2012, Tousova et al., 2005).

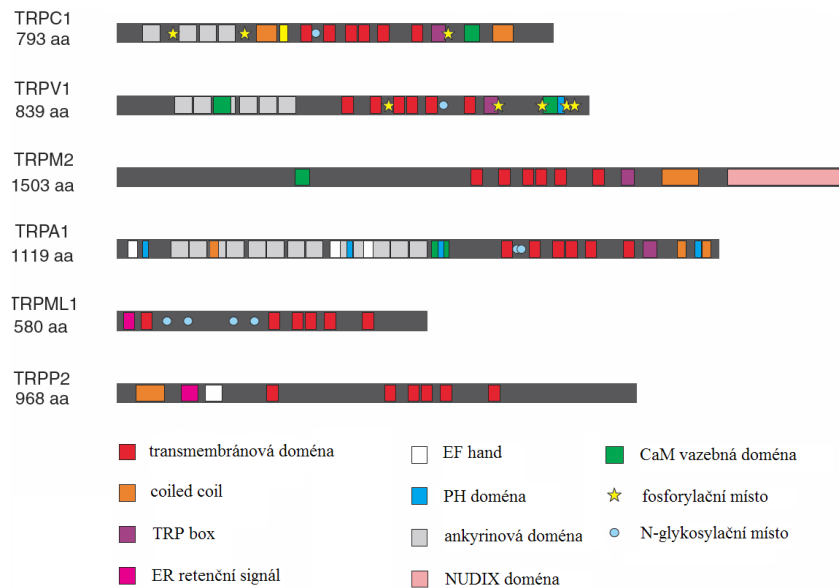
## TRPA1

Uprostřed pórové oblasti ankyrinového receptoru TRPA1 byl v sekvenci M<sup>915</sup>LGDI<sup>919</sup> (myší ortolog) jako selektivní filtr identifikován pouze aspartát v poloze 918, který zajišťuje vápníkovou propustnost tohoto kanálu (Wang et al., 2008). Neutralizací této aminokyseliny záměnou za alanin dojde ke snížení relativní propustnosti kanálu pro Ca<sup>2+</sup> z hodnoty P<sub>Ca2+</sub>/P<sub>Na+</sub> ~ 1 na P<sub>Ca2+</sub>/P<sub>Na+</sub> = 0.47 (Story et al., 2003). Pór TRPA1 kanálu je relativně široký ~ 11 Å a stejně jako u TRPV1 se jeho velikost může měnit v závislosti na koncentraci vápenatých iontů a typu agonisty (Karashima et al., 2010). Například aktivací TRPA1 allylisothiokyanátem (AITC) dojde k dilataci póru až o 3 Å a k nárůstu jeho selektivity pro velké bivalentní kationty, včetně iontů Ca<sup>2+</sup>. Změna velikosti póru je vratná a je řízena množstvím vápníku, které do buňky pronikne. TRPA1 kanál tímto způsobem pravděpodobně reguluje Ca<sup>2+</sup>-závislé procesy na nociceptorech, včetně uvolňování neuropřenašečů a zánětlivých mediátorů.



## 1.2.2. Cytoplazmatické konce TRP receptorů

Intracelulární konce patří mezi nejvariabilnější oblasti TRP receptorů. Účastní se aktivace, desenzitizace, tvorby funkčních tetramerů, regulují funkci kanálů prostřednictvím interakcí s modulačními sloučeninami či proteiny. Tyto různorodé funkce cytoplazmatických konců jsou mezi TRP kanály zprostředkovány specifickými doménami (obr. 1.4.).



**Obr. 1.4.: Předpokládaná strukturní topologie vybraných lidských TRP kanálů.** Všichni zástupci TRP kanálů se skládají z šesti transmembránových domén (vyznačeny červeně) a z variabilních cytoplazmatických konců, obsahující odlišné sady domén. Určité domény jsou konzervovány především v rámci dané podrodiny. Vysvětlivky: aa, aminokyseliny; EF hand,  $\text{Ca}^{2+}$ -vazací motiv; PH, plekstrin homologní doména; ER, endoplazmatické retikulum; NUDIX doména, doména typická pro Nudix hydroxylázy, místo regulace nukleosiddifosfátů; CaM, kalmodulin; coiled coil, tetramerizační doména. Převzato a upraveno z (Nilius et al., 2011).

U mnoha zástupců TRP kanálů byly získány krystalové struktury částí intracelulárních konců, což vedlo k prohloubení znalostí o mechanismech modulace těchto proteinů. Typická struktura, která se v různém počtu (kromě TRPM, TRPP, TRPML podrodin) nachází na N-konci TRP kanálů, je ankyrinová doména (ARD). Ankyrinem (ANK) je označována oblast opakujících se antiparalelních dvojic helixů tvořených z 30-34 aminokyselin spojených mezi sebou  $\beta$ -vlásečkovou smyčkou (Gaudet, 2008). Kromě regulační úlohy ANK domény výsledky řady studií předurčují úlohu této domény v převodu mechanické citlivosti, a to především pro kanály obsahující velké množství (17-24) ankyrinových repetit (Christensen and Corey, 2007). Ankyrinová doména byla vykrytalizována u krysí formy TRPV1

(PDB kód: 2PNN), kryší a lidské formy TRPV2 (PDB kód: 2ETB a 2F37), kuřecí formy TRPV4 (PDB kód: 3JXI) a myší formy TRPV6 receptoru (PDB kód: 2RFA). Méně popsány jsou domény na karboxylovém konci TRP receptorů. Struktura C-koncové tetramerizační domény typu „*coiled-coil*“ byla získána pro myší TRPM7 ( $\alpha$ -kinázová oblast) a pomocí NMR i pro lidskou variantu TRPP2, u které byla vykrytalizována i doména vázající vápenaté ionty (tzv. „*EF-hand*“ motiv) (Li et al., 2011).

## **N-terminální konec**

### **TRPV1**

U vaniloidních zástupců TRP kanálů je oblast aminového konce velmi konzervovaná v podobě šesti dvojic ankyrinových repetič. N-konec TRPV1 receptoru je tvořen 432 aminokyselinami, z čehož ANK domény pokrývají oblast 264 aminokyselin (101-364). U TRPV1 bylo mezi prvním až třetím ANK objeveno kompetující vazebné místo pro ATP a pro kalmodulin (CaM), po jehož zmutování nedošlo k navázání ani ATP ani komplexu kalmodulinu s navázanými ionty vápníku ( $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ; Lishko et al., 2007). V přítomnosti navázaného ATP na ankyrinové doméně dochází k senzitivaci kapsaicinové odpovědi TRPV1 a k silnému poklesu tachyfylaxe (snižující se odpovědi na opakovanou aplikaci kapsaicinu). Pro charakteristický průběh tachyfylaxe je naopak nezbytná vazba komplexu  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  na aminový konec receptoru, resp. navázání vápenatých iontů na CaM a poté celého tohoto komplexu na N-konec receptoru. Trifosfátová část ATP se váže na TRPV1 prostřednictvím R115, K155 a K160, zatímco adeninová část interaguje s L163 a Y199, Q202 a E210 (Lishko et al., 2007). Vazebné místo pro ATP a  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  na ARD doméně bylo biochemickými experimenty a sekvenčním porovnáním nalezeno i u TRPV3 a TRPV4 receptoru, ale u TRPV2, TRPV5 a TRPV6 kanálu jeho přítomnost potvrzena nebyla. Mechanismus působení molekuly ATP mezi vaniloidními TRP kanály je složitější. U TRPV4, stejně jako u TRPV1, ATP senzitivuje odpovědi na agonistu, naopak u TRPV3 receptoru byla odpověď na agonistu pomocí ATP snížena (Phelps et al., 2010).

Na aminovém konci TRPV1 receptoru jsou lokalizována také fosforylační místa proteinkinázy A (PKA; S116, T370) významná pro desenzitivaci receptoru (Bhave et al., 2002, Mohapatra et al., 2003). Naopak fosforylace reziduí T144 a T370 (+ S502 v S2-S3 klíče) vedou k senzitivaci teplem vyvolaných proudů (Rathee et

al., 2002). Interakce aminového konce TRPV1 receptoru s jinými interakčními proteiny jsou podrobněji rozebrány v kapitole 1.3.2.

### **TRPA1**

Pro ankyrinový receptor (TRPA1) je N-terminální konec nejen strukturně dominantní částí (716 z celkových 1119 aminokyselin), ale především je to významná oblast pro jeho modulaci. Větší část hydrofilního N-konce je složena z repetitivních ankyrinových úseků, jejichž počet (14-17) se mezi autory publikací liší (Gaudet, 2008, Story et al., 2003). Elektrofyziologickým testováním mutantních forem TRPA1 receptoru, které měly odstraněny 4 či 12 ankyrinových repetitivních úseků ( $\Delta 1-4$  či  $\Delta 1-12$ ), byla pozorována úplná ztráta funkce receptoru (Nilius et al., 2011). Jednou z funkčně významných oblastí N-konce je oblast tzv. „*EF-hand*“ motivu zodpovědná za modulaci receptoru vápenatými ionty, které jsou schopny samy o sobě TRPA1 receptor aktivovat (Doerner et al., 2007, Zurborg et al., 2007). Odstraněním vazebné domény pro vápník (460-468), stejně jako odstraněním ANK ( $\Delta 1-4$  a  $\Delta 1-12$ ), dojde ke ztrátě funkčnosti kanálu.

V aktivaci TRPA1 se na aminovém konci uplatňují cysteinová rezidua (C414, C421, C621, C633, C641 a C665), která jsou místem interakce elektrofilních aktivátorů s receptorem. Kovalentní modifikace těchto cysteinů elektrofilními látkami je považována za nejsilnější mechanismus aktivace ankyrinového receptoru. Cysteiny jsou cílem interakce typických aktivátorů TRPA1: allylisothiokyanátu, cinamalu, allicinu, akroleinu či endogenních aktivátorů, jako jsou peroxid vodíku či prostaglandiny a protony. Aminový konec některých ortologů TRPA1 receptoru se zřejmě podílí také na teplotní aktivaci tohoto kanálu (Cordero-Morales et al., 2011).

### **C-terminální konec**

Typickou strukturou na karboxylovém konci TRP kanálů je TRP doména oblast ~ 25 aminokyselin navazující na šestou transmembránou doménu, která je kromě TRPA1 a TRPP mezi savčími zástupci TRP kanálů konzervovaná. Oblast TRP domény je u TRPV a TRPM kanálů bohatá na proliny (Vannier et al., 1999) a zahrnuje oblast vysoce konzervovaných aminokyselin označovanou jako „*TRP box*“. Jedná se o sekvenci ~ 5 aminokyselin o definované sekvenci WKFQR (TRPV, TRPM) a WKFAR (TRPP, TRPC), ve které jsou na druhé a páté pozici kladně nabitá

rezidua. Tryptofan v této sekvenci je vůbec nejvíce konzervované reziduum mezi TRP proteiny.

### **TRPV1**

Karboxylový konec TRPV1 receptoru je nezbytnou součástí funkčního iontového kanálu, neboť jeho odstraněním (155 aminokyselin u krysí formy receptoru) není zbytek receptoru schopen odpovídat na chemické, teplotní a napěťové podněty a jejich kombinace (Vlachova et al., 2003).

Oblast TRP domény (E684-R721) byla identifikována jako oblast zajišťující tetramerizaci monomerních podjednotek TRPV1 (Garcia-Sanz et al., 2004, Vlachova et al., 2003). Tato oblast je uspořádána do  $\alpha$ -helikální struktury nazývané „*coiled-coil*“ doména, která velmi ochotně reaguje s jinými „*coiled-coil*“ helixy za vzniku oligomerů (Valente et al., 2008).

Systematickou záměnou jednotlivých reziduí v oblasti TRP boxu (I<sup>696</sup>WKLQR<sup>701</sup>) za alanin došlo u I696A, W697A a R701A mutantů k vážnému porušení citlivosti TRPV1 kanálu na napětí, teplo, k snížení kapsaicinové odpovědi a míry tachyfylaxe (Valente et al., 2008). Zmíněná zjištění jsou důkazem toho, že daná rezidua, respektive TRP box, situovaný v blízkosti póru iontového kanálu, se účastní modulace vrátkování TRPV1 kanálu. Podobný význam této domény byl navržen i pro TRPM8 a TRPV5 kanály (Rohacs et al., 2005).

Kromě TRP domény C-konec receptoru ukrývá další funkčně významné oblasti, včetně vazebných míst pro fosfoinositidy, CaM, AKAP79/150 a PKC fosforylační místo, které budou jednotlivě diskutovány v další kapitole (1.3.2.)

### **TRPA1**

Na rozdíl od karboxylového konce TRPV1 receptoru neobsahuje C-konec TRPA1 konzervovanou oblast zvanou TRP doména. V rámci karboxylového konce lidského TRPA1, který obsahuje 160 aminokyselin (960-1119), byly predikovány dva dlouhé (H1 a H4) a čtyři krátké helixy (H2, H3, H5 a H6) (Samad et al., 2011). V uvedené studii byly uvnitř karboxylového konce identifikovány aminokyselinové zbytky, které pravděpodobně tvoří součást napěťového senzoru (R957, K988 a K989) TRPA1 kanálu a podílejí se na jeho citlivosti k AITC (K1048, K1052, K1092 a R1099), fosfoinositidům či k anorganickým polyfosfátům (K969, R975, K988 a K989) (Samad et al., 2011).

Na C-konci TRPA1 receptoru byla identifikována vazebná místa pro dvojmocné ionty. Jedním z fyziologicky významných iontů je zinek, který se po průchodu TRPA1 kanálem váže na histidinový (H983) a cysteinový (C1021) aminokyselinový zbytek a v nanomolárních koncentracích aktivuje tento kanál (Hu et al., 2009). Kromě zinkové modulace je karboxylový konec nezbytný také při regulaci TRPA1 kanálu vápenatými ionty. Ve studii, která je součástí předložené dizertační práce (Sura et al., 2012), bylo prokázáno, že konstrukt lidského TRPA1 receptoru s odstraněným úsekem posledních 20 aminokyselin C-konce je typický pomalou a neúplnou inaktivací, která je závislá na vápníku. Kromě toho se vápníkové potenciace a inaktivace TRPA1 kanálu účastní distální část C-konce TRPA1 receptoru mezi predikovaným H4 a H5 helixem, jež je bohatá na kyselé aminokyseliny E1073-D1082 (více viz kapitola 4.3.). Posledním významným místem, které bylo dosud na karboxylovém konci TRPA1 identifikováno, je oblast (G961-A968) bohatá na glyciny (G958 a G962), navazující na S6 helix receptoru, která se společně s prolinem v S6 doméně (P949) účastní vrátkování kanálu (Benedikt et al., 2009).

## 1.3. Aktivační a modulační mechanizmy TRPV1

TRPV1 kanál je dokonalým příkladem polymodálního iontového kanálu, který je aktivován celou řadou podnětů chemické a fyzikální povahy, endogenního i exogenního původu, sloučeninami přírodními i syntetickými. Řada z těchto podnětů, jako například teplo ( $> 43\text{ }^{\circ}\text{C}$ ),  $\text{pH} < 6$ , látky uvolněné v místě poranění či zánětu, jsou prostřednictvím aktivace TRPV1 kanálu zdrojem bolestivého vjemu, který chrání daný organismus za normálního i patologického stavu.

### 1.3.1. Aktivace TRPV1

#### **Chemické látky**

Nejznámějším a nejlépe popsaným agonistou TRPV1 receptoru je pálivá substance chilli papriček kapsaicin (8-methyl-N-vanillyl-6-noneamid), díky němuž byl tento receptor rozpoznán (Baccaglini and Hogan, 1983) a poprvé molekulárně identifikován (Caterina et al., 1997). Právě citlivost k této vaniloidní látce ( $EC_{50} = 0.3\text{ }\mu\text{M}$ ) je používána jako marker nociceptivních neuronů, na kterých se TRPV1 exprimuje. Kapsaicin je lipofilní látka, která je schopna aktivace kanálu pouze po průchodu buněčnou membránou a následném navázání do vazebného místa, které je lokalizované převážně na intracelulární straně receptoru (Jung et al., 1999). Vazebné místo pro kapsaicin a další vaniloidní látky zahrnuje oblast S2-S4 helixů (rezidua: Y511, S512, W549 a T550), přičemž k aktivaci TRPV1 kanálu je nezbytné navázání minimálně dvou molekul kapsaicinu (Gavva et al., 2005, Jordt and Julius, 2002). Kromě aminokyselin v oblasti S2-S4 helixů byla indentifikována dvě rezidua na cytoplazmatických koncích: R114 na N-konci a E761 na C-konci, která jsou nezbytná k rozeznání agonisty (Jung et al., 2002). Kromě kapsaicinu se do vazebného místa váží další vaniloidní látky, např. rostlinný toxin resiniferatoxin a další aromatické látky, které jsou součástí našeho jídelníčku, jako piperin z černého pepře, eugenol z hřebíčku, gingerol ze zázvoru, allicin z česneku a cibule a kafr z kafrovníku (Vriens et al., 2009). Poslední dvě zmíněné látky však zřejmě působí z jiného místa než je vazebné místo pro vaniloidy.

Kafr byl charakterizován jako částečný agonista TRPV1 kanálu ( $EC_{50} > 3\text{ mM}$ ), který je schopen jeho aktivace i v přítomnosti kompetitivního inhibitoru kapsazepinu a jenž aktivuje i mutantní receptor necitlivý na kapsaicin (Xu

et al., 2005). Podle nejnovější studie se kafr pravděpodobně váže přímo na pórový helix receptoru, čímž zprostředkovává rychlou a velmi účinnou desenzitizaci TRPV1 kanálu (Marsakova et al., 2012). Mechanismus kařové modulační TRPV1 je předmětem studia předložené dizertační práce a je podrobně diskutován v kapitole 5.1.

Kromě látek rostlinného původu je TRPV1 kanál aktivován látkami původu živočišného, jako jsou pavoučí a medúzí jedy (Cuypers et al., 2006, Siemens et al., 2006).

Od roku 2000 se začaly objevovat první publikace o endogenních ligandech TRPV1 receptoru tzv. endogenních vaniloidech. Jedná se o různé deriváty mastných kyselin např. anandamid (Ahern, 2003), NADA: N-arachidonoyldopamin, 12S-HPETE: 12-hydroperoxyeikosatetraenová kyselina (Huang et al., 2002, Hwang et al., 2000), prostaglandiny a leukotrien B4 (Huang et al., 2002). Mezi endogenní aktivátory patří také polyaminy (spermin, spermidin) (Ahern et al., 2006).

Mezi nejznámější syntetickou látku aktivující TRPV1 kanál je lokální anestetikum lidokain, jehož neurotoxicita může být způsobena uvolněním složky neurogenního zánětu - kalcitoninu příbuzného peptidu (CGRP) z kůže a periferních nervů jako důsledek aktivace TRPV1 (Leffler et al., 2008). Další syntetickou látkou, která aktivuje TRPV1, je 2-aminoetoxydifenylborát (2-APB,  $EC_{50} = 10^{-4}$  M), není však agonistou specifického typu, protože aktivuje také TRPV2 a TRPV3. Detailní mechanismus působení této látky v buňce byl zkoumán v různých souvislostech. Je například známo, že inhibuje  $IP_3$  receptory na endoplazmatickém retikulu, a tím blokuje výlev intracelulárního vápníku (Diver et al., 2001).

## **Teplo**

Vaniloidní receptor typu 1 představuje společně s dalšími zástupci TRP rodiny (TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM8 a TRPA1) teplotní senzor organismu, jehož hodnota aktivační prahu doplňuje teplotní škálu od bolestivého chladu po bolestivé teplo. Expres TRPV1 na volných nervových zakončeních v kůži dovoluje detekovat nociceptivní teplo, neboť TRPV1 je při klidovém membránovém potenciálu aktivován po překročení teplotního prahu 43 °C (Caterina et al., 1997). Aktivace TRPV1 kanálu teplotním podnětem u savců vyvolává nejen pocit bolesti, ale i vznik neurogenního zánětu způsobeného výlevem prozánětlivých peptidů (Holzer, 1988). Kromě toho jsou TRPV1 kanály vystaveny řadě regulačních faktorů,

kteře potencují teplotní odpovědi. Mnoho z těchto regulačních látek je produkováno v podmínkách zánětu či tkáňového poškození. Při zánětu či ischemii tak může být TRPV1 kanál aktivován i za normální fyziologické teploty a vést k bolestivému vjemu.

Dlouhou dobu nebyl popsán mechanismus ani místo, které by bylo zodpovědné za teplotní citlivost TRPV1 receptoru. V roce 2003 bylo ve studii naší laboratoře navrženo, že teplotní citlivost TRPV1 receptoru je dána distální částí karboxylového konce (Vlachova et al., 2003). V pozdější studii byly provedeny další experimenty, jejichž výsledky prokazují důležitou úlohu karboxylových konců jako teplotních senzorů, a to hned u dvou teplotně citlivých kanálů: TRPV1 a TRPM8. Výměnou C-terminálních konců mezi teplem aktivovaným TRPV1 a chladem aktivovaným TRPM8 kanálem došlo taktéž k výměně jejich teplotních citlivostí. TRPV1 receptor s karboxylovým koncem TRPM8 receptoru byl aktivován teplotou mnohem nižší (~ 25 °C), odpovídající teplotě aktivující TRPM8 kanál (~ 25 °C). Naopak TRPM8 receptor s karboxylovým koncem receptoru TRPV1 byl aktivován při teplotě vyšší (~ 45 °C), odpovídající teplotní aktivaci TRPV1 (Brauchi et al., 2006).

## **Depolarizační napětí**

TRPV1 kanál je ve srovnání s napětím aktivovanými K<sup>+</sup> kanály jen slabě napětově závislý. Aktivace depolarizujícím napětím je charakterizována hodnotou polovičního účinného napětí  $V_{1/2} \sim +154$  mV (Boukalova et al., 2010). Hodnota  $V_{1/2}$  je silně závislá na teplotě. Při vyšší teplotě se práh napětově citlivosti TRPV1 výrazně posouvá k více negativním potenciálům (Nilius et al., 2005, Voets et al., 2004). To znamená, že citlivost tohoto teplotního senzoru je závislá na membránovém potenciálu a lze tedy očekávat, že se bude lišit u různých typů excitabilních buněk. Napětová závislost TRPV1 kanálu se mění také v přítomnosti dalších aktivátorů. Například TRPV1 je při pokojové teplotě aktivován depolarizujícím napětím, ale v přítomnosti kapsaicinu je aktivován více při hyperpolarizačním potenciálu. Křivka pravděpodobnosti otevření vs. koncentrace kapsaicinu má všechny znaky kooperativního aktivačního mechanismu (Oseguera et al., 2007). Předpokládá se tedy, že aktivační dráha kapsaicinu je alostericky spojena s dráhou napětovou a teplotní.



Hledání napěťového senzoru TRPV1 kanálu je předmětem studia mnoha laboratoří včetně té, ve které byla vypracována tato dizertační práce. Na základě strukturální podobnosti s napěťově citlivými  $K^+$  kanály byla navržena hypotéza, že je napěťový senzor TRPV1 kanálu vytvářen kladně nabitými rezidui uvnitř S1-S4 oblasti (Bezanilla, 2008, Villalba-Galea et al., 2008). V S4 helixu, který u  $K^+$  kanálů představuje oblast bohatou na kladně nabitá rezidua, je u TRPV1 receptoru pouze jeden kladně nabitý aminokyselinový zbytek. Příčina slabé napěťové citlivosti TRPV1 receptoru by mohla být způsobena právě nedostatkem bazických aminokyselin v této doméně. Citlivosti TRPV1 kanálu na depolarizační napětí se podle dosavadního stavu poznání účastní rezidua v rámci S4 helixu a S4-S5 kličky (S4-S5 oblast; Boukalova et al., 2010), jejichž detailnější význam v této funkci je předmětem kapitoly 4.2.

## **Kyselé pH**

Kyselé extracelulární pH vzniká v místě zánětu a zvyšuje pocit bolesti. Aktivace iontových kanálů exprimovaných v A $\delta$  a C vláknech citlivých na kyselé pH resp. ASIC a TRPV1 jsou spojovány s řadou bolestivých stavů včetně nádorového onemocnění či artritidy (Nagae et al., 2007, Ugawa et al., 2002). TRPV1 je přímo aktivován extracelulárním roztokem o  $pH < 5.5$ , zatímco vyšší  $pH \sim 6.5$  pouze potencuje agonistou vyvolané membránové proudy (Tominaga et al., 1998). Například mírně kyselé prostředí potencuje kapsaicinem vyvolané odpovědi TRPV1 kanálu a může posunout jeho teplotní citlivost blíže k hodnotám pokojové teploty (Reeh and Kress, 2001, Ryu et al., 2003, Tominaga et al., 1998).

Mechanismy aktivace a potenciace TRPV1 receptoru roztokem o kyselém pH jsou dle níže uvedených důvodů strukturálně oddělené. Dvě kyselá rezidua lokalizovaná ve vnějším póru kanálu se ukázala být specifická buď pro aktivační účinek protonů (E648), nebo pro potenciaci kapsaicinové odpovědi kyselým pH (E600) (Jordt et al., 2000). Navíc, další aminokyselina lokalizovaná v S3-S4 kličce TRPV1 receptoru (V538) je důležitá pro aktivaci kanálu protony bez zásadního vlivu na jiné aktivační dráhy (Ryu et al., 2007). Další reziduum, které je pro protonovou aktivaci TRPV1 receptoru nezbytné, je threonin 633 (T633) lokalizovaný uprostřed pórového helixu. U mutantního receptoru s tímto zaměněným threoninem za alanin nebyl pozorován žádný membránový proud vyvolaný nízkým  $pH = 5.5$ , ale současně byla zachována citlivost TRPV1 k teplotě, kapsaicinu i potenciace kapsaicinové

odpovědi při pH = 6.5. Je tedy pravděpodobné, že T633 se specificky účastní funkčního propojení mezi vazebným místem pro protony na E648 a vrátkovacím mechanismem TRPV1 kanálu (Ryu et al., 2007).

### 1.3.2. Modulace TRPV1

#### **Senzitizace**

Nociceptivní nervová zakončení na periférii mohou být senzitivována řadou mechanismů včetně: 1) autosenzitizace po uvolnění neuropeptidů, jako je substance P či peptid CGRP, 2) uvolněním zánětlivých mediátorů, jako jsou NGF, histamin, cytokiny, bradykinin a prostagladiny z buněk imunitního systému (Woolf and Salter, 2000), 3) uvolněním NGF, ATP a jiných prozánětlivých mediátorů ze sousedních kožních buněk (Asakawa et al., 2006, Xu et al., 2006), 4) uvolněním kyselin, ATP a jiných buněčných komponent při poškození tkáně nebo v okolí zánětu (Chuang et al., 2001). Bez ohledu na zdroj, uvolněné zánětlivé mediátory potencují TRPV1 receptor nepřímo spouštěním signálních kaskád prostřednictvím jejich receptorů spřažených s G-proteiny (GPCR) nebo ho aktivují přímo jako protony a/nebo lipoxygenázové nebo cyklooxygenázové produkty arachidonové kyseliny (Chuang et al., 2001, Shin et al., 2002, Tominaga et al., 2001).

Aktivita TRPV1 kanálu exprimovaného na nociceptivních C a A $\delta$ -vláknech může být modulovaná prostřednictvím signálních drah spojených s aktivací GPCR receptorů nebo aktivací tyrosin kinázových receptorů (Trk). GPCR receptory jsou aktivovány celou řadou látek včetně zánětlivých faktorů, neuropřenašečů či peptidů.

Kromě některých produktů fosfolipázy A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) a D, které se váží na TRPV1 receptor přímo, je konečným krokem drah vedoucích k modulaci aktivity TRPV1 receptoru fosforylace klíčových reziduí receptoru proteinkinázou C (PKC) a proteinkinázou A (PKA). Například bradykinin, který se uvolňuje v místě zánětu, aktivuje bradykininový receptor (B<sub>2</sub>), s nímž spojené G-proteiny aktivují PKC, která fosforyluje TRPV1 receptor. Kromě toho B<sub>2</sub> může aktivovat TRPV1 receptor produkcí leukotrienů přes aktivaci PLA<sub>2</sub> a následnou lipoxygenázovou aktivaci (Hwang et al., 2000). Leukotrieny se poté váží do kapsaicinového vazebného místa. Prostřednictvím PKC je TRPV1 receptor senzitivován také po aktivaci metabotropních purinergních receptorů aktivovaných extracelulárním ATP (Tominaga et al., 2001).

Modulace aktivity TRPV1 prostřednictvím GPCR receptorů je zprostředkována fosforylačními místy pro PKA a PKC: S116, S502 a S800 (u kryší formy TRPV1 receptoru) (Bhave et al., 2003, Bhave et al., 2002, Numazaki et al., 2002, Tominaga et al., 2001). Senzitivizující účinek fosforylovaného serinu S502 a S800 PKC se projevuje ve snížení teplotního prahu aktivace (Bhave et al., 2003, Numazaki et al., 2002). To může vysvětlit senzitivizující účinek bradykininu a ATP, který je na aktivitě PKC závislý (Chuang et al., 2001, Numazaki et al., 2002). Účinek fosforylace rezidua S116 PKA je odlišný od ostatních fosforylačních míst. Tento serin je *in vivo* konstitutivně fosforylovaný a jeho defosforylace je nezbytná pro vstup TRPV1 kanálu do desenzitizovaného stavu. Prostaglandiny aktivací PKA a následnou fosforylací S116 takto minimalizují desenzitizovaný stav TRPV1 receptoru (Bhave et al., 2002, Hu et al., 2002).

Prostřednictvím GPCR či Trk receptorů je přes stimulaci PLC modulována aktivita TRPV1 receptoru i prostřednictvím fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu (PIP<sub>2</sub>), který je významným modulátorem (nejen) TRPV1 (Chuang et al., 2001). Kromě možného zrušení interakce PIP<sub>2</sub> s receptorem, štěpením tohoto fosfoinositidu vzniknou dva účinní druhy poslové inositol-1,4,5-trifosfát (IP<sub>3</sub>) a 1,2-diacylglycerol (DAG). Membránový DAG aktivuje PKC, která opět může fosforylovat receptor. Navíc cytoplazmatická IP<sub>3</sub> molekula zajišťuje výlev intracelulárního vápníku z endoplazmatického retikula, a tím také zprostředkovává aktivaci PKC senzitivizační dráhy.

## **Desenzitizace**

V literatuře se tradičně rozlišují dva typy desenzitizace TRPV1 kanálu, a to desenzitizace akutní a tachyfylyxe. Tachyfylyxí je myšlen zvyšující se pokles amplitudy proudových odpovědí na opakovanou aplikaci agonisty v krátkých časových intervalech (Reaves and Wolstenholme, 2007, Szallasi and Blumberg, 1999). K tomuto ději dochází po návratu TRPV1 kanálu do klidového stavu, kdy může být kanál opět aktivován navázáním agonisty (Liu and Simon, 1996). Procesem tachyfylyxe je nazýván komplexní děj, kterého se účastní celá řada signálních drah, resp. jejich funkční molekuly, jako např. Ca<sup>2+</sup>, ATP a PIP<sub>2</sub> (Koplas et al., 1997, Lishko et al., 2007, Liu and Simon, 1998).

Akutní desenzitizací TRPV1 je mnohými autory označováno rychlé snížení amplitudy první proudové odpovědi během prvních 20-30 s aplikace agonisty.

Akutní desenzitizace TRPV1 receptoru je důsledkem konformační změny vyvolané agonistou, která směřuje k zavření póru iontového kanálu. Tento proces je závislý na délce expozice agonisty a množství vápníku, který do buňky z extracelulárního prostředí pronikne. Pokud je chelatačními látkami snížena hodnota intracelulárního vápníku na minimum, k desenzitizaci nedochází (Caterina et al., 1997, Schwarz et al., 2000). Tento děj závislý na vápníku je pravděpodobně zprostředkován vazbou  $\text{Ca}^{2+}$  do struktury CaM ( $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ) a poté tohoto komplexu na receptor. CaM, který váže vápenaté ionty pronikající po aktivaci kanálu do buňky, vytváří  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  komplex interagující s TRPV1 receptorem. Po interakci tohoto komplexu s receptorem může docházet ke strukturnímu přeuspořádání receptoru upřednostňujícímu zavřený stav kanálu. Snížení amplitudy kapsaicinových odpovědí v přítomnosti vápenatých iontů je zřejmě také odrazem snížení celkového počtu funkčních receptorů v membráně (Rosenbaum et al., 2004). Desenzitizace TRPV1 kanálu je považována za ochranný mechanismus buňky proti toxickému působení vápenatých iontů. Navíc, desenzitizace TRPV1 receptoru je terapeuticky velmi relevantním dějem, neboť právě jemu je přisuzována příčina analgetických účinků řady agonistů (kapsaicinu a kafru). Podrobně jsou možné mechanismy desenzitizace TRPV1 kanálu popsány v publikaci „A cute desensitization of TRPV1“, která je součástí příloh (kapitola 9).

### **Fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát**

$\text{PIP}_2$  je minoritním fosfolipidem v plazmatické membráně (~ 1 %), přesto hraje velmi významnou úlohu substrátu pro mnohé signální proteiny a jako druhý posel reguluje mnoho buněčných procesů. Kromě modulace TRP iontových kanálů a řady jiných kanálů byla jeho úloha také prokázána v modulaci aktinového cytoskeletu, endocytózy, exocytózy, genové exprese, angiogenezi, buněčné migraci, transportu měchýřků i v procesech probíhajících v jádře (Rajala and Anderson, 2010).

Syntéza  $\text{PIP}_2$  probíhá prostřednictvím dvou po sobě jdoucích fosforylací: fosfatidylinositolu fosfatidylinositolkinázou a fosfatidylinositolfosfátkinázou. Naopak degradace  $\text{PIP}_2$  je zprostředkována PLC, která štěpí  $\text{PIP}_2$  na DAG a  $\text{IP}_3$ . Oba tyto metabolity jsou důležitými posly signálních drah.  $\text{IP}_3$  zajišťuje uvolnění vnitrobuněčných zásob  $\text{Ca}^{2+}$  z endoplazmatického retikula. DAG naopak stimuluje

proteinkinázu  $\text{Ca}$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  a  $\gamma$  (dále jen PKC) z rodiny serin/threoninových kináz, která zajišťuje fosforylaci celé řady buněčných proteinů.

Mezi prvními iontovými kanály, u kterých byla prokázána úloha  $\text{PIP}_2$  v aktivaci, byly draslíkové tzv. „*inward rectifying*“  $\text{K}^+$  (Kir) kanály, u kterých tento fosfolipid stabilizuje otevřený stav. V současné době je známa celá řada dalších kanálů, včetně napětově citlivých  $\text{K}^+$  kanálů (KCNQ, Kv, HCN, HERG, CNG) a  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů (Cav2.1 P/Q-typ a Cav2.2 N-typ).  $\text{PIP}_2$  moduluje také dvoupórové  $\text{K}^+$  kanály (TASK13, TREK1, TRAAK), P2X1-5 a P2X7,  $\text{Ca}^{2+}$ -uvolňující kanály (IP<sub>3</sub> a ryanodinové receptory), epiteliální  $\text{Na}^+$  kanály a především celou řadu zástupců TRP kanálů (TRPL, TRPA1, TRPP2, TRPV1/5/6, TRPM4/5/7/8, TRPC1/5/6/7) (Suh and Hille, 2008). V našich studiích jsme se zabývali pouze některými zástupci teplotně citlivých TRP kanálů, pro něž je souhrn známých účinků  $\text{PIP}_2$  uveden v následující tabulce.

**Tab. 1.3.: Přehled teplotně aktivovaných TRP kanálů modulovaných  $\text{PIP}_2$ .** Vysvětlivky: (+), pozitivní modulace, přidání  $\text{PIP}_2$  aktivuje receptor, odebrání  $\text{PIP}_2$  ho inhibuje; (-), negativní modulace, přidání  $\text{PIP}_2$  inhibuje receptor

RECEPTOR	MODULACE	MÍSTO INTERAKCE	CITACE
TRPA1	+ / -	---	(Karashima et al., 2008), (Kim et al., 2008)
TRPM8	+	TRP doména	(Rohacs et al., 2005), (Liu and Qin, 2005)
TRPV4	---	---	---
TRPC5	- / +	---	(Kim et al., 2008), (Trebak et al., 2009)
TRPV3	-	TRP box (R696, K705)	(Doerner et al., 2011)
TRPV1	+ / -	C-proximální, C-distální konec, TRP box	(Prescott and Julius, 2003), (Stein et al., 2006), (Lukacs et al., 2007), (Rohacs and Nilius, 2007), (Rohacs, 2009), (Kim et al., 2008), (Ufret-Vincenty et al., 2011), (Brauchi et al., 2007), (Jeske et al., 2011)
TRPV2	+	C-proximální konec (647-715)	(Mercado et al., 2010)

Výsledky studií zabývajících se účinkem  $\text{PIP}_2$  na TRPV1 receptor jsou kontroverzní. Z dosavadních studií vyplývá, že tento kyselý fosfolipid je schopen inhibice i senzitivace TRPV1 receptoru, a to pravděpodobně prostřednictvím přímých a/nebo nepřímých mechanismů.

Degradace  $\text{PIP}_2$  byla nejprve navržena jako důsledek senzitivace TRPV1 receptoru bradykininem a NGF (Chuang et al., 2001). V tomto modelu „hyperalgesie“ na buněčné úrovni, byla původní představa taková, že  $\text{PIP}_2$  se tonicky

váže a udržuje v inhibici TRPV1 kanál. Aktivovaná PLC poté sníží množství PIP<sub>2</sub> v membráně a uvolní tak receptor z inhibice. Podle jiných studií je senzitivace nociceptorů v důsledku přítomnosti NGF způsobena zvýšením počtu receptorů v membráně a nikoliv uvolněním receptorů z inhibice (Stein et al., 2006, Zhang et al., 2005). Výsledky následných studií zabývajících se působením NGF na TRPV1 receptor ukazují, že v senzitivaci receptoru by hlavní úlohu mohla hrát aktivita fosfoinositid-3-kinázy resp. akumulace fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfátu a ne PLC čili štěpení PIP<sub>2</sub> (Zhu and Oxford, 2007).

### **Nepřímý mechanismus působení PIP<sub>2</sub> na TRPV1**

Nedávno publikovaná studie (Jeske et al., 2011) se přiklání k teorii nepřímé regulace TRPV1 receptoru pomocí PIP<sub>2</sub>, a to prostřednictvím AKAP proteinu („A-kinase anchoring protein“). V tomto modelu je AKAP v klidovém stavu zakotven v PIP<sub>2</sub> bohatých oblastech membrány a po aktivaci PLC resp. degradaci PIP<sub>2</sub> dochází k jeho uvolnění z membrány a následně k jeho vazbě na C-konec TRPV1. AKAP na své struktuře váže PKA a PKC, které tak efektivně fosforylují a sensitizují receptor. Další vědecká skupina, která se přiklání k nepřímé modulaci, ověřovala hypotézu, že TRPV1 sám o sobě neobsahuje vazebné místo pro PIP<sub>2</sub>, ale že se PIP<sub>2</sub> váže na integrální membránový protein nazývaný Pirt, který se exprimuje ve stejných neuronech jako TRPV1 receptor a slouží jako PIP<sub>2</sub> senzor, který následně reguluje aktivitu receptoru (Kim et al., 2008). Tento mechanismus však nebyl jinými autory potvrzen (Lukacs et al., 2007, Ufret-Vincenty et al., 2011).

### **Přímý mechanismus působení PIP<sub>2</sub> - vazba na receptor**

Většina studií týkajících se problematiky modulace TRPV1 aktivity molekulou PIP<sub>2</sub> se přiklání k přímé vazbě této molekuly na receptor. Ve studii využívající expresi TRPV1 receptoru v oocytech byl za vazebné místo pro PIP<sub>2</sub> označen C-distální konec receptoru, který s navázanou molekulou PIP<sub>2</sub> udržuje receptor v inhibici (Prescott et al., 2003). Výsledky této studie jsou však v rozporu s výsledky experimentů na vytržených terčících, na kterých aplikace PIP<sub>2</sub> vyvolala přímo aktivaci TRPV1 kanálu (Klein et al., 2008, Lukacs et al., 2007, Stein et al., 2006). Jiná studie se také přiklání k tomu, že PIP<sub>2</sub> potencuje TRPV1 odpovědi (Lukacs et al., 2007). Bylo prokázáno, že pokud se zneutralizují dvě bazické aminokyseliny na C-proximálním konci receptoru (R701 a K710), dojde ke snížení

této potenciace (Brauchi et al., 2007). Na základě elektrofyziologických, fluorescenčních a biochemických pokusů byly publikovány přesvědčivé výsledky o tom, že PIP<sub>2</sub> se neváže ani na Pirt a ani na distální konec TRPV1 (777-820; Ufret-Vincenty et al., 2011). Naopak jako potenciální místo interakce PIP<sub>2</sub> s TRPV1, ale i s TRPV2 receptorem, byl *in vitro* experimenty navržen proximální konec receptoru, který se nachází 22 aminokyselin za koncem S6 helixu (682-725) (Ufret-Vincenty et al., 2011).

Výsledky vědeckého týmu pod vedením doktora Tibora Rohacse v roce 2007 pomohly objasnit mnohé kontroverzní výsledky o regulaci TRPV1 receptoru PIP<sub>2</sub> molekulou. V této studii autoři navrhli dvojí mechanismus regulace, a to v závislosti na koncentraci agonisty (Lukacs et al., 2007). Při saturující koncentraci kapsaicinu (10 μM) a v přítomnosti extracelulárního vápníku PIP<sub>2</sub> aktivuje TRPV1 receptor, neboť po jeho depleci vyvolané aktivací PLC receptor desenzitizuje. Naopak, při nízké koncentraci kapsaicinu (1 nM) převládá inhibiční efekt PIP<sub>2</sub>. V souladu s jinými studiemi autoři této publikace tvrdí, že PIP<sub>2</sub> je agonistou TRPV1 receptoru, jehož aplikací na vytržené terčiky je možné vyvolat aktivaci iontového kanálu (Klein et al., 2008, Lukacs et al., 2007, Stein et al., 2006).

## **Protein-proteinové interakce**

Kromě proteinů signálních kaskád a membránových fosfolipidů představuje velmi významný způsob modulace TRPV1 celá řada interakčních partnerů, kteří významným způsobem ovlivňují funkční vlastnosti tohoto iontového kanálu. V první řadě je to možnost vytváření heterotetramerů s různými sestřihovými variantami vaniloidního receptoru a s jinými zástupci TRP rodiny. Další skupinou jsou různorodé cytoplazmatické proteiny, např. cytoskeletární tubulin a protein vázající fosforylační enzymy nebo vápenaté ionty. Jedním z posledních identifikovaných interakčních proteinů je Pirt, jehož přesná úloha v regulaci vaniloidního receptoru není zatím vyřešena.

## **Sestřihové varianty TRPV1**

Ačkoli většina studií, včetně výsledků, které jsou součástí této disertační práce, jsou založeny na expresi homotetramerických iontových kanálů z podjednotek nejčastěji se vyskytující varianty TRPV1 receptoru (1252 bp), byly identifikovány další tři sestřihové varianty tohoto receptoru (obr. 1.5., str. 41). Kromě

homotetramerů TRPV1 podjednotky se *in vivo* vyskytují i heterotetramery receptorů s těmito variantami s unikátními aktivačními vlastnostmi.

Jedna ze sestřihových variant, TRPV1b, se od klasické podjednotky TRPV1 liší délkou N-konce a delecí části třetí ANK domény (Wang et al., 2004). Druhá z variant TRPV1var kóduje pouze část N-terminálního konce TRPV1 receptoru a poslední z identifikovaných variant VR.5'sv nemá většinu N-terminálního konce (Schumacher and Eilers, 2010).

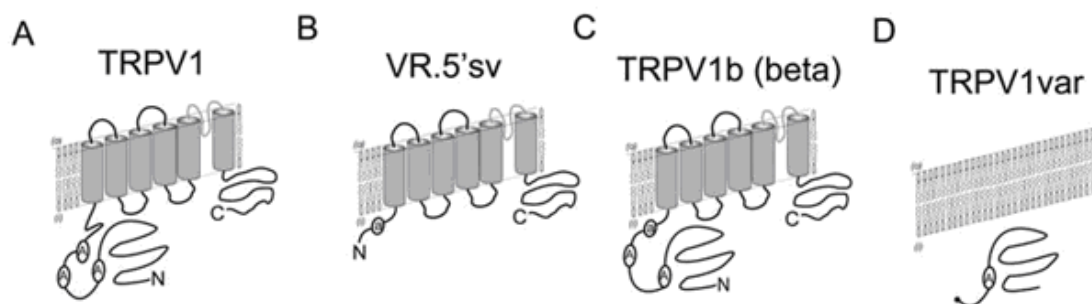
První identifikovanou sestřihovou variantou byla VR.5'sv, která se od TRPV1 podjednotky liší tím, že kóduje velmi malou oblast intracelulárního N-konce s částí třetí ANK domény (obr. 1.5.B, str. 41; Schumacher et al., 2000). Tato varianta je exprimována v neuronech ganglií zadních kořenů míšních (DRG) v poměru 1:20 (TRPV1:VR.5'sv), ale v mozku, ledvinách a krevních buňkách je tento poměr 1:1. Experimenty v savčím heterologním systému přinesly důkazy o negativním fenotypu této varianty, které byly dříve pozorovány v oocytech drápatky. Homotetramer VR.5'sv není citlivý ke kapsaicinu. Expresí heterotetrameru VR.5'sv s TRPV1 (1:1) došlo k návratu citlivosti kanálu ke kapsaicinu, ale jen na úroveň 30 % amplitudy proudových odpovědí homomerního TRPV1 kanálu (Schumacher et al., 2010).

Expresí TRPV1b varianty (1072 bp, obr. 1.5.C, str. 41), byla v hojné míře nalezena v DRG neuronech, v kůži, žaludku a jazyku u myši a člověka. Ve srovnání s TRPV1 podjednotkou je však v těchto tkáních zastoupena v 20x menším množství. Koexpresí TRPV1b podjednotky s klasickou podjednotkou TRPV1 receptoru vzniká iontový kanál, který je rezistentní na kapsaicin a protony, ale překvapivě si zachovává citlivost na teplo, jen s trochu vyšším prahem aktivace  $> 47^{\circ}\text{C}$  (Vos et al., 2006). Výskyt této varianty by tedy mohl vysvětlovat TRPV1 imunoreaktivitu v řadě tkání např. v keratinocytech, bez odpovědi na kapsaicin. Z pokusů v heterologním expresním systému se zdá, že TRPV1b varianta upřednostňuje tvorbu homotetramerů, ale *in vivo* může být situace odlišná.

Třetí ze sestřihových variant TRPV1var (obr. 1.5.D, str. 41) je, pokud jde o počet párů bazí, nejdelší (1353 bp) z variant díky zachování pátého intronu, ale co do počtu aminokyselin je tomu naopak. Tato varianta kromě transmembránových domén postrádá i C-terminální konec, mRNA kóduje pouze část N-terminálního konce s první ANK doménou (Tian et al., 2006). Tato varianta byla poprvé izolována z ledvinových papil, ale její exprese byla detekována i v DRG neuronech, kde by mohla na nociceptorech regulovat odpovědi zprostředkované TRPV1. O TRPV1var



se uvažuje jako o možném mechanoreceptoru v ledvinách, či jako detektoru membránového stresu a osmotických změn v senzorických neuronech (Schumacher et al., 2010).



**Obr. 1.5.: Porovnání klasické TRPV1 podjednotky s jejími sestříhovými variantami.** A, Klasická topologie TRPV1 podjednotky: šest transmembránových helixů s intracelulárními C- a N-konci. Na aminovém konci se vyskytují tři ANK. B, VR.5'sv sestříhová varianta se od TRPV1 podjednotky liší modifikací aminového konce. Aminový konec této sestříhové varianty má zachovánu pouze malou část třetí ANK. C, Druhá sestříhová varianta TRPV1b je s TRPV1 téměř identická kromě částečné delece třetí ANK a připojení polypeptidové sekvence. D, Nejvíce odlišná sestříhová varianta TRPV1var, které zcela chybí transmembránová část i C-konec receptoru. Jedná se tedy o cytoplazmatický protein, který si zanechal pouze část aminového konce receptoru s první ANK. Převzato z publikace (Schumacher et al., 2010).

Současný výzkum se zabývá nalezením odpovědi na otázku, zda exprese sestříhových variant TRPV1 receptoru, které mají převážně inhibiční fenotyp, může hrát protektivní roli v ochraně buněk během patologických stavů (zánět, stres nebo zranění) a zda právě regulace aktivity TRPV1 receptoru je hlavní fyziologický význam těchto sestříhových variant.

### Kalmodulin

TRPV1 iontový kanál je propustný pro  $\text{Ca}^{2+}$  a jeho aktivita je vápenatými ionty silně modulována (Caterina et al., 1997). Vápenaté ionty regulují aktivitu TRPV1 nejen modulací aktivity enzymů (např. PLC), ale také prostřednictvím  $\text{Ca}^{2+}$ -vázejícího cytoplazmatického proteinu CaM. Vazebná místa pro CaM byla identifikována na aminovém (E767-T801) i karboxylovém (F189-E222) (Numazaki et al., 2003, Rosenbaum et al., 2004) konci TRPV1. U receptoru s odstraněným C-terminálním úsekem vázajícím CaM zůstává míra desenzitizace zachována, což svědčí o tom, že toto CaM vazebné místo není pro desenzitizaci podstatné. Naopak, N-koncové CaM vazebné místo představuje  $\text{Ca}^{2+}$ -závislé místo zodpovědné za inhibici kapsaicinem vyvolaných proudů resp. desenzitizaci TRPV1 (Rosenbaum

et al., 2004). Na shodném místě ankyrinové oblasti TRPV1 receptoru (K155 a K160), kam se váže CaM, bylo identifikováno vazebné místo i pro ATP, jehož přítomnost naopak potencuje kapsaicinem vyvolané proudy. Současná představa Ca<sup>2+</sup>-závislé modulace spočívá v kompetici vazby CaM a ATP na společném vazebném místě v závislosti na aktivačním stavu TRPV1 receptoru (Lishko et al., 2007). Za klidového stavu je na ankyrinovém konci receptoru navázána molekula ATP, která receptor senzitivizuje, po otevření kanálu ji však ionty Ca<sup>2+</sup> a Mg<sup>2+</sup> chelatují a ATP se uvolní z receptoru. Poté se toto místo obsadí CaM s navázanými čtyřmi ionty vápníku a dochází k inaktivaci kanálu. Konzervované ATP-Ca<sup>2+</sup>/CaM kompetitivní místo bylo identifikováno u TRPV3 a TRPV4 receptoru (Phelps et al., 2010).

### **AKAP79/150**

Proteinem, který interakcí s TRPV1 receptorem reguluje jeho funkci, je AKAP79/150 (lidský/krysí či myší homolog). Ve své struktuře AKAP obsahuje vazebná místa pro enzymy fosforylující (PKC, PKA) a defosforylující (Ca<sup>2+</sup>-závislou fosfatázu: kalcineurin) aminokyselinové zbytky receptoru, čímž zajistí jeho senzitivizaci (PKA a PKC) či desenzitivizaci (kalcineurin). AKAP se váže na C-konec receptoru (do oblasti K735-N738 u AKAP79) a umožňuje tím interakci enzymového komplexu se specifickými aminokyselinovými zbytky TRPV1 receptoru (Zhang et al., 2008). K aktivaci PKA a PKC dochází například v přítomnosti zánětlivých mediátorů, jako je bradykinin a prostaglandin E<sub>2</sub>. Hlavním cílem obou kináz je serin 502 mezi druhou a třetí transmembránovou doménou, jehož fosforylace zvyšuje pravděpodobnost otevření kanálu (Numazaki et al., 2002), ale fosforylace se také ukázala být hlavním mechanismem, kterým AKAP zprostředkovává translokaci TRPV1 do membrány (Zhang et al., 2008).

V nedávné studii byl navržen mechanismus, kterým je asociace AKAP proteinu s TRPV1 chráněna vazbou Ca<sup>2+</sup>/CaM na receptor, která zabraňuje senzitivizaci receptoru fosforylací (Chaudhury et al., 2011). Aktivace receptoru nociceptivními podněty je doprovázena vstupem vápenatých iontů do nitra buňky, které se váží a aktivují CaM, který se pak váže na TRPV1 receptor (Numazaki et al., 2003, Rosenbaum et al., 2004). Ca<sup>2+</sup>/CaM komplex s receptorem účinně brání asociaci AKAP proteinu s receptorem, a tím prodlužuje desenzitivizaci kanálu. Vazba

AKAP proteinu na TRPV1 receptor umožní návrat receptoru z defosforylovaného, tj. desenzitizovaného stavu (Chaudhury et al., 2011).

### **Tubulin**

Karboxylový konec TRPV1 receptoru obsahuje mnoho strukturně a funkčně významných míst: tetramerizační doménu, fosforylační místo pro  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM dependentní kinázu II a PKC $\epsilon$ , místo nezbytné pro aktivaci resiniferatoxinem, CaM a PIP<sub>2</sub> vazebná místa. Kromě uvedených míst a domén jsou v této oblasti také místa zajišťující interakci receptoru s cytoskeletem resp. s tubulinem (Goswami et al., 2007). Byly identifikovány dva krátké bazické úseky (710-730 a 770-797), jejichž sekvence je především u TRPV zástupců velmi konzervovaná. Pro oba úseky byla prokázána interakce s tubulinem a vzhledem k jejich blízkosti k důležitým regulačním místům je pravděpodobné, že vazba tubulinu na TRPV1 může významně ovlivnit tato regulační místa a tím i funkci TRPV1 kanálu.

### **Pirt**

Podobně jako v případě AKAP proteinu byla v DRG neuronech exprimujících TRPV1 receptor prokázána koexprese integrálního proteinu Pirt regulujícího interakci TRPV1 s fosfoinositidy (Kim et al., 2008). V této práci byla vyslovena hypotéza, že Pirt na svém C-konci obsahuje vazebná místa pro TRPV1 receptor i molekulu PIP<sub>2</sub> a prostřednictvím PIP<sub>2</sub> pozitivně reguluje TRPV1 aktivitu. V souladu s dvojitým účinkem PIP<sub>2</sub> na TRPV1 receptor byla navržena souvislost mezi nezbytnou přítomností Pirt proteinu a aktivačními vlastnostmi PIP<sub>2</sub> při vysoké koncentraci kapsaicinu (5  $\mu\text{M}$ ). Jiné studie však nezbytnost Pirt proteinu nepodporují (Lukacs et al., 2007, Stein et al., 2006, Ufret-Vincenty et al., 2011). U Pirt deficientní myši byl však pozorován shodný fenotyp s tím, který byl popsán u myši neexprimující TRPV1 receptor, a to ztráta hyperalgezie při zánětu. Zmíněné nálezy podporují významnou funkci Pirt proteinu ve fyziologických procesech, kterých se účastní TRPV1 receptor.

### **TRPV3**

Kromě zmíněných interakčních proteinů je TRPV1 receptor schopen vytvářet heterotetramery s jiným teplotně citlivým zástupcem vaniloidních receptorů resp. s vaniloidním zástupcem typu 3 (TRPV3) (Smith et al., 2002). TRPV3 kanál je strukturním homologem TRPV1 kanálu, který je však zcela necitlivý na vaniloidy

a pH. Heterotetramerní TRPV1/TRPV3 kanál je charakteristický pozměněnou odpovědí na kapsaicin, nízké pH a 2-APB (Cheng et al., 2012). Existence funkčních heterotetramerů je pravděpodobná, protože oba typy receptorů se exprimují v subpopulaci C-vláken DRG neuronů, navíc jejich geny jsou lokalizovány v blízkosti sebe na chromozomu 7 (Smith et al., 2002). Kromě TRPV1 a TRPV3 byla u savčích TRPV kanálů prokázána tvorba heterotetramerů mezi TRPV1 a TRPA1 (Akopian et al., 2007; více viz 1.4.2).

## 1.4. Aktivační a modulační mechanizmy TRPA1

Jediný savčí zástupce ankyrinové podrodiny TRP kanálů TRPA1 je aktivován širokou škálou látek s dráždivými, pálivými, algogenními, psychotropními a chladivými účinky. Kromě těchto sloučenin obsažených v rostlinách, cigaretovém kouři či výfukových plynech je TRPA1 aktivován také plynnými látkami (např. O<sub>2</sub> nebo CO<sub>2</sub>), oxidačními látkami a chladem. Tento receptor je považován za detektor tkáňového poškození a zánětlivých procesů, jejichž mediátory je aktivován. V neposlední řadě je TRPA1 iontový kanál otevírán depolarizačním napětím a jeho spoluúčast byla prokázána i v mechanizmech transdukce mechanických podnětů.

### 1.4.1. Aktivace TRPA1

#### **Chemické látky**

Charakterizace odlišných typů TRP receptorů původně spočívala ve vyhledávání molekulárních cílů pro aktivátory v podobě látek přírodního původu, obzvláště deriváty izolované z vyšších rostlin. Jako první byl v této souvislosti identifikován cílový protein pro kapsaicin, receptor TRPV1 (Caterina et al., 1997) a o něco později cílový protein pro látku obsaženou v hořčičném oleji - AITC, receptor TRPA1 (Jordt et al., 2004). Později bylo zjištěno, že TRPA1 aktivují také další látky rostlinného původu včetně cinamalu (Cin) obsaženého ve skořici, allicinu v česneku a v cibuli, methylsalicylátu v libavce, gingerolu v zázvoru, eugenolu v hřebíčku, karvakrolu v oreganu, tymolu v tymiánu, tetrahydrokanabinolu v konopí, nikotinu v tabákových listech a mentolu v mátě pepřné (Bandell et al., 2004, Bautista et al., 2005, Calixto et al., 2005, Karashima et al., 2007, Macpherson et al., 2005, Talavera et al., 2009, Xu et al., 2006). Některé z těchto látek aktivují i jiné zástupce TRP receptorů, především z vaniloidní podrodiny. Například methylsalicylát, AITC a allicin kromě TRPA1 aktivují i TRPV1 receptor (Everaerts et al., 2011, Macpherson et al., 2005, Ohta et al., 2009, Salazar et al., 2008). Jiný zástupce vaniloidní podrodiny TRPV3 je naopak aktivován karvakrolem, eugenolem a tymolem (Xu et al., 2006). Citlivost TRP receptorů vůči dané látce se liší nejen koncentrační závislostí, ale v některých případech i svým účinkem. Savčí TRPA1, TRPV1 a TRPV3 iontové kanály spojuje citlivost k monoterpenní látce kafru. Tato látka je částečným agonistou TRPV1 a plným agonistou TRPV3, ale překvapivě

antagonistou TRPA1 (Macpherson et al., 2006, Moqrich et al., 2005, Xu et al., 2005).

Kromě přírodních látek rostlinného původu aktivují TRPA1 kanál také chemické látky znečišťující životní prostředí, jež pocházejí z průmyslové výroby či dopravních prostředků (např. sulfan, akrolein, acetaldehyd), těžké látky (např. hypochlorid, peroxid vodíku, formalin) nebo látky syntetického původu (Andrade et al., 2012). TRPA1 je cílovou molekulou několika léčiv včetně antimykotika clotrimazolu (Meseguer et al., 2008), chlorpromazinu (Hill and Schaefer, 2007), clioquinolu (Andersson et al., 2009) a isofluranu (Matta et al., 2008).

TRPA1 kanál je aktivován endogenními produkty metabolismu či produkty oxidačního stresu. Silným endogenním aktivátorem TRPA1 je produkt odbourávání mastných kyselin 15-deoxy-delta-prostaglandin  $J_2$ , který je syntetizován cyklooxygenázami na počátku zánětlivé reakce (Taylor-Clark et al., 2008). Produkty generované radikálovou řetězovou reakcí během oxidačních procesů, jako například 4-hydroxynonenal, peroxid vodíku, peroxyinitrit, hypochlorid, nitroolejová kyselina, nebo 4-oxononenal, oxidují thiolové skupiny TRPA1 proteinu, čímž ho přímo aktivují (Andersson et al., 2008, Bessac et al., 2008, Graepel et al., 2011, Sawada et al., 2008, Taylor-Clark et al., 2009, Taylor-Clark et al., 2008, Trevisani et al., 2007).

TRPA1 je aktivován různými mechanismy: nejvýznamnějším aktivačním mechanismem je tvorba kovalentní vazby mezi elektrofilní skupinou agonistů a nukleofilní skupinou cysteinů (C619, C639, C663 u lidské formy TRPA1) na N-konci TRPA1 receptoru (např. AITC nebo Cin). Dalším možným mechanismem je tvorba disulfidických můstků prostřednictvím oxidace cysteinů (Hinman et al., 2006, Macpherson et al., 2007, Takahashi et al., 2011). Příkladem této modifikace je aktivace TRPA1 molekulou kyslíku (Takahashi et al., 2011). Dle současné hypotézy je citlivost senzoričkových neuronů vůči kyslíku způsobená aktivací TRPA1 receptoru oxidací cysteinů a hydroxylací prolinového zbytku receptoru. Při hyperoxii  $O_2$  ochotně reaguje s cysteinovými zbytky (C633 a C856) receptoru a přímo jej aktivuje (Takahashi et al., 2011).

Na rozdíl od trvalé modifikace receptoru, kterou způsobují elektrofilní sloučeniny, neelektrofilní aktivátoři TRPA1 receptoru, jako jsou mentol, nikotin, clotrimazol a tetrahydrokanabinol působí prostřednictvím vratné a přechodné interakce mimo N-konec receptoru. Například mentol se váže mezi S5 a S6 helix, resp. na S876, T877 a G878 uvnitř S5 helixu (Xiao et al., 2008a).

## Vápenaté ionty

Vápenaté ionty hrají v aktivitě TRPA1 významnou roli. Kromě náboje, který s sebou při průchodu kanálem nesou, je to především jejich schopnost aktivace a následné inhibice proudové odpovědi na chemický podnět.  $\text{Ca}^{2+}$  ionty určují míru aktivace TRPA1 tím, že ovlivňují jednotkovou vodivost a pravděpodobnost otevření kanálu (Nagata et al., 2005).

Bylo prokázáno, že vápenaté ionty mohou interagovat s TRPA1 prostřednictvím vazebné domény tzv. „EF hand“ na cytoplazmatickém N-konci receptoru (Doerner et al., 2007, Zurborg et al., 2007). Výsledky dvou uvedených studií se však liší v reziduích, která byla identifikována jako klíčová pro vazbu vápníku. Ukazuje se, že mutace v oblasti EF-hand domény, jež se nachází mezi 11. a 12. ankyrinovou repeticí, mohou mít obecnější vliv na celkovou funkci i povrchovou expresi TRPA1 kanálu (Nilius et al., 2011). Kromě aminového konce nezbytného pro účinek intracelulárního vápníku byla navržena úloha asparaginu 855 uvnitř S4 helixu, který v závislosti na extracelulární koncentraci vápenatých iontů reguluje napětím řízené vrátkování TRPA1 kanálu (Kremeyer et al., 2010). Úloha tohoto rezidua však bude zřejmě souviset s obecným mechanismem vrátkování, u kterého lze předpokládat konformační závislost na  $\text{Ca}^{2+}$ .

Kromě přímé aktivace má vápník zásadní úlohu v modulaci aktivity ankyrinového receptoru. Účinek vápenatých iontů spočívá v potenciaci a následné inhibici odpovědi vyvolané agonistou, přičemž oba děje jsou pravděpodobně na sobě nezávislé (Sura et al., 2012, Wang et al., 2008). V případě potenciace i inhibice odpovědi vyvolané cinamalem byla prokázána významná úloha oblasti karboxylového konce receptoru, bohaté na kyselé aminokyseliny, která navíc představuje i možné vazebné místo pro vápenaté ionty (Sura et al., 2012).

## Chlad

Výsledky studií zabývajících se teplotní citlivostí TRPA1 receptoru jsou dosud kontroverzní. Nejprve byl TRPA1 charakterizován jako receptor aktivovaný nociceptivním chladem: teplotou nižší než 17 °C (Bandell et al., 2004, Macpherson et al., 2006, Story et al., 2003). V dalších publikacích však byla úloha TRPA1 kanálu jako teplotního senzoru zpochybněna (Jordt et al., 2004, Nagata et al., 2005). Jak bylo uvedeno výše, TRPA1 je přímo aktivován  $\text{Ca}^{2+}$ , a proto se předpokládalo, že chlad působí na TRPA1 kanál nepřímo, zvýšením hladiny intracelulárního vápníku

(Doerner et al., 2007, Zurborg et al., 2007). Proti tomuto závěru však vystoupily novější studie, ve kterých byla vyvolána chladová odpověď (< 20 °C) TRPA1 kanálu i v nepřítomnosti extracelulárního vápníku (Karashima et al., 2009, Sawada et al., 2007).

Při experimentech prováděných na myších s deficientním genem pro TRPA1 nebyla pozorována pozměněná chladová citlivost (Bautista et al., 2006). Kromě toho jiná vědecká skupina u myši s deficiencí TRPA1 společně s dalším chladem aktivovaným kanálem TRPM8 nepozorovala odlišnou citlivost na chlad ve srovnání fenotypem pouze bez TRPM8 (Knowlton et al., 2010). V rozporu s předchozími dvěma skupinami pozoroval jiný vědecký tým behaviorálními experimenty na myších bez TRPA1 signifikantní ztrátu reakce na bolest vyvolanou chladem (Karashima et al., 2009, Kwan et al., 2006). K významné roli TRPA1 receptoru v chladové hyperalgesii a alodynii přispívá fakt, že při zánětu tkáně či zranění periferních nervů je množství mRNA kódující TRPA1 receptor zvýšeno a že myši bez tohoto receptoru vykazují sníženou citlivost k bolesti vyvolané nízkou teplotou (Katsura et al., 2006, Obata et al., 2005). Tyto experimenty souhlasně dokládají, že se TRPA1 účastní některých aspektů bolesti vyvolané chladem, jejich výsledky ale zároveň ukazují, že detekce extrémně nízkých teplot není zajištěna pouze TRPA1 (nebo TRPM8) kanálem.

Důkazy o tom, že TRPA1 může hrát roli naopak teplotního senzoru, přinesla publikace, ve které autoři ukázali, že hadí forma TRPA1 kanálu je vysoce teplotně citlivá a je zodpovědná za detekci infračerveného záření (Gracheva et al., 2010). S velmi překvapivým objevem přišla také vědecká skupina z Baltimoru, která ukázala, že agonistou vyvolané proudy TRPA1 kanálu mohou být potlačeny nebo zcela zrušeny aplikací roztoku o zvýšené teplotě (Wang et al., 2012). Zvýšená teplota okolního roztoku podle nich nejen snižuje afinitu AITC k receptoru, ale také zvyšuje desenzitizaci a tachyfylaxi TRPA1 kanálu. Při teplotě okolního roztoku 39 °C již nebyla po aplikaci AITC pozorována žádná odpověď. Na základě této studie je patrné, že proudová odpověď TRPA1 receptoru je závislá na okolní teplotě, což může mít nesporný fyziologický význam.

### **Napět'ová aktivace**

Ankyrinový receptor může být aktivován vysoce depolarizujícím napětím (> +100 mV) bez přítomnosti dalších aktivátorů. Z hlediska fyziologického významu



je však mnohem důležitější, že aktivita TRPA1 kanálu je významně modulována membránovým potenciálem v přítomnosti jiného aktivačního podnětu, kdy se uplatní výrazná synergie. Byla identifikována některá rezidua přispívající k napěťové citlivosti TRPA1, ale identita samotného napěťového senzoru je stále předmětem studia. Je jisté, že místo zodpovědné za citlivost ke změnám membránového potenciálu bude situované mimo S4 helix TRPA1, který neobsahuje nabitě aminokyselinové zbytky. Studie naší laboratoře ukázaly, že část napěťového senzoru tohoto receptoru může spočívat v jeho karboxylovém konci, a to jak v jeho distální (E1077, T1078), tak v proximální části (R975, K988 a K989; Sura et al., 2012, Samad et al., 2011).

## 1.4.2. Modulace TRPA1

### **Senzitizace**

Aktivace a senzitivace TRPA1 je stejně jako u ostatních zástupců TRP kanálů spojena s GPCR receptory a s nimi spřaženými signálními drahami (Clapham, 2003). TRPA1 receptor je v tomto případě aktivován peptidem produkovaným při poškození tkáně, při zánětu, či ischemii bradykininem (Bandell et al., 2004). Bradykinin se váže na B<sub>2</sub> receptor, jehož stimulace vyvolává aktivaci PLC a s ní spojené štěpení molekul PIP<sub>2</sub> na DAG a IP<sub>3</sub>. Následně aktivované IP<sub>3</sub> receptory propouštějí vápenaté ionty z intracelulárních zásob, zatímco DAG aktivuje PKC. Aktivovaná PKC, stejně jako vápenaté ionty uvolněné vnitrobuněčných zásob, senzitivuje TRPV1 kanál, čímž podporuje vstup vápníku z extracelulárního prostoru do buňky a aktivaci TRPA1 kanálu (Bautista et al., 2006). DAG se navíc může díky DAG lipáze přeměnit na polynenasycené mastné kyseliny, například na kyselinu arachidonovou (Mizumura et al., 2009), jejíž produkty metabolismu prostaglandiny přímo aktivují TRPA1 kanál a také senzitivují TRPV1 kanál.

Wang a kolegové navíc ukázali, že kromě PLC dráhy přispívá k senzitivaci TRPA1 bradykininem také aktivace PKA cyklickým adenosinmonofosfátem (Wang et al., 2008). Tento mechanismus spočívá v tom, že B<sub>2</sub> receptor s navázaným bradykininem prostřednictvím G-proteinů aktivuje adenylátcyklázu, která začne produkovat cyklický adenosinmonofosfát, významného druhého posla, který aktivuje PKA a senzitivuje TRPA1 i TRPV1 receptor.

Obdobným mechanismem probíhá senzitivace TRPA1 receptoru prostřednictvím jiného typu GPCR receptoru, a to proteázou-aktivovaným receptorem 2 (PAR<sub>2</sub>). PAR<sub>2</sub> je koexprimován s TRPA1 receptorem na DRG neuronech, kde spolu funkčně interagují (Dai et al., 2007). TRPA1 receptor je integrační molekulou, která odpovídá na uvolnění zánětlivých modulátorů a umožní tak amplifikaci zánětlivého či nociceptivního procesu.

Významné poznatky o mechanismu senzitivace tedy i o zachování citlivosti nociceptorů přinesly experimenty s myším TRPA1 receptorem (Schmidt et al., 2009). Při aplikaci AITC, ale i kapsaicinu, se autorům uvedené publikace podařilo popsat fúzi měchýřků obsahujících TRPA1 receptory s plazmatickou membránou. Pozorovaný děj, který pravděpodobně představuje příčinu senzitivace TRPA1 odpovědi, se ukázal být závislý na aktivaci PKA a PLC enzymů.

## **Desenzitizace**

K desenzitizaci ankyrinového receptoru může docházet vlivem homologního (AITC) či heterologního (kapsaicin) agonisty. TRPA1 receptor exprimovaný na senzoričných neuronech může být převeden do desenzitizovaného stavu nepřímo typickým aktivátorem TRPV1 kapsaicinem, a to prostřednictvím PLC signalizační dráhy závislé na vápníku (Akopian et al., 2007). Desenzitizaci TRPA1 kanálu předchází kapsaicinem vyvolaná aktivace TRPV1 kanálu, která způsobí okamžité zvýšení intracelulárního vápníku, štěpení PIP<sub>2</sub> molekul a snížení aktivity TRPA1 (Akopian et al., 2007). Naopak homologní desenzitizace TRPA1 vyvolaná např. AITC není vyvolána vápníkem ani štěpením PIP<sub>2</sub>, ale stálou strukturální modifikací cysteinů na aminovém konci receptoru, která pravděpodobně vyvolá poškození vrátkování kanálu (Hinman et al., 2006, Macpherson et al., 2007).

## **Funkční interakce s TRPV1**

Ankyrinový receptor je společně s TRPV1 koexprimován na nociceptivních neuronech, které jsou velmi citlivé na stimulaci podněty potenciálně poškozující organismus. Právě koexprese a funkční spolupráce těchto dvou receptorů je považována za příčinu citlivosti A $\delta$  a C vláken k bolestivým podnětům (Story et al., 2003). Proudové odpovědi zprostředkované TRPA1 receptory na senzoričných neuronech jsou zásadním způsobem ovlivňovány přítomností receptorů TRPV1, neboť funkční znaky TRPA1 nejsou reprodukovatelné v neuronech, ve kterých je

exprimován pouze tento receptor. Vzájemné ovlivnění těchto kanálů bylo prokázáno pro experimentálně vyvolaný zánět, resp. při působení endogenních mediátorů zánětu, jako jsou bradykinin a vápenaté ionty (Bautista et al., 2006, Patil et al., 2010). Modulace TRPA1 kanálu  $\text{Ca}^{2+}$  je regulována právě aktivitou TRPV1 kanálu. Studie využívající mutagenezi TRPV1 receptoru ukázala, že tato modulace závisí na vápníkové propustnosti TRPV1 kanálů (Patil et al., 2010).

Hypotéza o možnosti přímé interakce TRPV1 a TRPA1 kanálů a tvorby jejich komplexu, který by umožňoval TRPV1 receptoru modulovat funkční charakteristiky TRPA1, byla zkoumána pomocí fluorescenčních experimentů. Snímáním aktivity z jednotlivých TRPA1 kanálů bylo zjištěno, že TRPV1 moduluje funkci TRPA1 nezávisle na intracelulárním vápníku (Staruschenko et al., 2010).

## 2. CÍLE STUDIE

### 2.1. Mechanismus účinku kafru na TRPV1 kanál

#### Hypotéza:

Kafr je částečným agonistou TRPV1 kanálu, jehož mechanismus účinku je nezávislý na vazebném místě pro vaniloidy. Na základě zjištění, že kinetika odpovědi TRPV1 na kafr je rychlá, jsme předpokládali, že se jedná o přímou interakci s receptorem, pravděpodobně z extracelulární strany. Kafr je mimo jiné lipofilní látkou používanou ve vysokých koncentracích a nelze proto opomenout ani možnost jeho nepřímého účinku na receptor prostřednictvím významného modulátoru TRPV1 kanálu PIP<sub>2</sub>.

#### Cíle:

- A) Pomocí elektrofyzilogických experimentů popsat základní kinetické charakteristiky kastrových odpovědi TRPV1 kanálu a porovnat je s odpověďmi klasického agonisty kapsaicinu.
- B) Popsat kastrovou modulaci membránových proudů zprostředkovaných TRPV1, vyvolaných typickými aktivátory, jako jsou kapsaicin, teplo, depolarizační napětí a protony.
- C) Navrhnout možný mechanismus kastrové modulace TRPV1 kanálu, popřípadě navrhnout místo interakce kafru s receptorem.
- D) Na základě FRET experimentů popsat dynamiku molekul PIP<sub>2</sub> v membráně v přítomnosti kafru a porovnat ji se změnou distribuce tohoto fosfolipidu v přítomnosti kapsaicinu. Navrhnout funkci PIP<sub>2</sub> v kastrové modulaci TRPV1 kanálu.

### 2.2. Funkční a strukturální úloha S4-S5 oblasti u teplem aktivovaných TRPV kanálů

#### Hypotéza:

Intracelulární část S4-S5 helixů představuje mezi teplotně citlivými vaniloidními zástupci (TRPV1, TRPV2 a TRPV3) TRP kanálů vysoce konzervovanou oblast s nabitými rezidui, která by mohla být významná pro funkci

těchto receptorů a stejně jako u příbuzného TRPM8 receptoru představovat součást jeho napěťového senzoru.

**Cíle:**

- A) Připravit mutantní receptory s neutralizujícími záměnami postupně všech nabitých aminokyselin v S4-S5 oblasti TRPV1. Elektrofyzilogicky charakterizovat jejich citlivost na depolarizační napětí, teplo, chemickou citlivost na kapsaicin a 2-aminoetoxydifenylborát. U reziduí, které budou mít rozdílný fenotyp na sledovaný podnět od divokého typu receptoru, navrhnout jejich funkční a strukturální význam.
- B) Určit, do jaké míry je funkční význam konzervovaných aminokyselin v S4-S5 oblasti shodný u třech vaniloidních receptorů TRPV1, TRPV2 a TRPV3.

### 2.3. Úloha C-terminálního konce TRPA1 kanálu ve Ca<sup>2+</sup> aktivaci

**Hypotéza:**

Distální část karboxylového konce TRPA1 receptoru obsahuje oblast bohatou na záporně nabitě aminokyseliny, která by mohla představovat potenciální místo pro jeho vápníkovou modulaci.

**Cíle:**

- A) Funkčním testováním TRPA1 konstruktů se zkrácenými C-konci zjistit význam této části receptoru na jeho funkci.
- B) Příprava jednotlivých mutantů se záměněnými rezidui v oblasti distálního C-konce TRPA1 receptoru bohaté na záporně nabitá rezidua (E<sup>1073</sup>I ISETEDDD<sup>1082</sup>). Určení fenotypu těchto mutantů TRPA1 receptoru testovaných na citlivost k depolarizačnímu napětí, cinamalu, vápníkovou potenciací a inhibici cinamalem vyvolané odpovědi.
- C) S využitím homologního modelování a molekulárně dynamické simulace ověřit možné interakce testovaných reziduí s ionty vápníku.

## 3. MATERIÁL A METODY

### 3.1. Chemikálie a roztoky

K přípravě roztoků byla použita deionizovaná voda, která byla pro molekulárně biologické metody přečištěna přístrojem Simplicity 185 (Millipore, USA) a sterilizována. Pokud není uvedeno jinak, chemikálie byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika).

#### **Extracelulární roztok (ECS)**

V průběhu fluorescenčních a elektrofyziologických experimentů byly buňky omývány kontrolním extracelulárním roztokem o  $\text{pH} = 7.3$  a osmolaritě 325 mmol/kg obsahující: 160 mM NaCl, 10 mM glukosy, 10 mM HEPES, 2.5 mM KCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  a 2 mM  $\text{MgCl}_2$ . Výsledné  $\text{pH}$  roztoku bylo upraveno roztokem NaOH.

#### **Intracelulární roztok (ICS)**

Pro snímání membránových proudů z buněk byly použity skleněné pipety naplněné intracelulárním roztokem o  $\text{pH} = 7.3$  a osmolaritě 290 mmol/kg obsahující: 125 mM glukono- $\delta$ -laktón, 15 mM CsCl, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES, 0.5 mM  $\text{CaCl}_2$  a 2 mM ATP ( $\text{Mg}^{2+}$  sůl). Výsledné  $\text{pH}$  roztoku bylo upraveno CsOH.

#### **Agonisté a modulátoři TRP kanálů**

Kapsaicin byl připravován z 0.1 M zásobního roztoku v ethanolu. Z tohoto zásobního roztoku byl připraven 1 mM pracovní roztok kapsaicinu ve vodě, který byl uchováván při 4 °C a před pokusem byl vždy 20 minut sonikován při 60 °C. V experimentech byly používány roztoky o výsledné koncentraci 1-10  $\mu\text{M}$  kapsaicinu, odpovídající 0.001-0.01% koncentraci ethanolu.

Aplikační roztoky obsahující kafr byly připravovány ze zásobního 1 M roztoku v DMSO. Pracovní roztoky byly používány v koncentraci 1-10 mM obsahující 0.1-1% DMSO. Pro dokonalé rozpuštění kafru byl roztok krátce sonikován (1-2 min) při teplotě 60 °C.

Dalším používaným agonistou společným pro TRPV1, TRPV2 i TRPV3 receptory byl 2-APB. Na buňky byl aplikován 300  $\mu\text{M}$  roztok, který byl připraven ze zásobního 0.1 M roztoku v ethanolu (0.3 % ethanolu).

Inhibitor PLC U73122 a jeho neaktivní analog U73343 byl ředěn ECS ze zásobního 1 mM roztoku v DMSO na výslednou pracovní koncentraci 3  $\mu$ M. Účinek těchto látek byl pozorován po jejich 90 s aplikaci a stejně trvajícím odmytí. Zásobní roztoky chemikálií byly uchovávány při -20 °C.

Pro nahromadění PIP<sub>2</sub> v buňce byla využita zkrácená forma, která je lépe rozpustná ve vodném prostředí diC8-PIP<sub>2</sub> (Echelon Biosciences, Salt Lake City, USA). Alikvoty diC8-PIP<sub>2</sub> byly rychle zmrazeny v tekutém dusíku a uchovávány při -20 °C. DiC8-PIP<sub>2</sub> byl v koncentraci 25  $\mu$ M přidáván do intracelulárního roztoku, který se od standardního intracelulárního roztoku lišil tím, že neobsahoval ionty Mg<sup>2+</sup> ani ATP. ICS s diC8-PIP<sub>2</sub> byl krátce sonikován při 60 °C a ihned plněn to skleněné pipety, aby se předešlo jeho precipitaci.

Ostatní použité roztoky a chemikálie jsou uvedeny v rámci jednotlivých metod.

## 3.2. cDNA klony

V experimentech byla používána krysí (r - „rat“), myší (m - „mouse“) a lidská (h - „human“) varianta divokého TRPV1 receptoru (více viz tab. 3.1.) a jejich mutantní varianty. Dále chiméra krysího TRPV1 receptoru s TRPV2 receptorem (TRPV1- $\Delta$ 15:627-634), která měla kromě delece 15 nekonzervovaných reziduí ( $\Delta$ 15:T612-S626) vyměněnou oblast pórového helixu (Y627-C634) za odpovídající oblast receptoru TRPV2. K dispozici byla i kontrolní varianta této chiméry s delecí výše uvedených 15 aminokyselin (TRPV1- $\Delta$ 15). Klony byly poskytnuty laboratoří doktora Feng Qin v Buffalu (Ryu et al., 2007).

Ke studiu změn distribuce PIP<sub>2</sub> v membráně pomocí FRET techniky bylo využito dvojice CFP- (Cerulean, modrý fluorescenční protein) a YFP- (žlutý fluorescenční protein) značených PH („*pleckstrin homology*“) domén resp. úseků prvních 174 aminokyselin fosfolipázy C  $\delta$ 1 (PLC $\delta$ 1), které specificky vážou molekulu PIP<sub>2</sub> (PH\_CFP, PH\_YFP). Princip monitorování PIP<sub>2</sub> pomocí této techniky PH domén byl detailně popsán v publikaci (van der Wal et al., 2001).

**Tab. 3.1: Seznam použitých klonů včetně typu vektoru, ve kterém jsou zaklonovány, a jejich zdrojů.**

GEN	VEKTOR	ZDROJ
<i>rTRPV1</i>	pcDNA3	David Julius, University of California, USA
<i>hTRPV1</i>	pCMV6-XL4	OriGene Technologies, Rockville, MD, USA
<i>PH_CFP</i>	pEGFP	Tamas Balla, NICHD, USA
<i>PH_YFP</i>	pcDNA3	Tamas Balla, NICHD, USA
<i>mTRPV1-CFP</i>	pEGFP-N3	Jie Zheng, University of California Davis, USA
<i>hTRPV2</i>	pCMV6-XL5	OriGene Technologies, Rockville, MD, USA
<i>rTRPV1Δ15:627-634</i>	pcDNA3	Feng Qin, University of New York at Buffalo, USA
<i>rTRPV1-Δ15</i>	pcDNA3	Feng Qin, University of New York at Buffalo, USA
<i>GFP</i>	pQBI25	TaKaRa, Japonsko
<i>CFP-TetraCys</i>	pcDNA3	Juan Llopis, University of Granada, Spain
<i>hTRPA1</i>	pCMV6-XL4	OriGene Technologies, Rockville, MD, USA
<i>Cerulean/CFP</i>	pEGFP-C1	Addgene, Cambridge, MA, USA
<i>hTRPV3</i>	pcDNA5/FRT	Ardem Patapoutian, Srippts Research Institute, USA

### 3.3. Tkáňové kultury a transfekce

Jako expresní systém byly využívány lidské embryonální ledvinové buňky HEK293T (Human Embryonic Kidney cells; ATCC, USA) stabilně exprimující T antigeny opičího viru SV40, zvyšující transkripci DNA. Buňky byly pěstovány v médiu OPTI-MEM (Life Technologies, USA) obohaceném 5% fetálním telecím sérem (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Německo) v inkubátoru při teplotě 37 °C, 5% koncentraci CO<sub>2</sub>. Pro účely transfekce byly buňky nasazovány na kultivační destičky s 24 jamkami pokrytými kolagenem (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo) o koncentraci 0.5 mg/ml. Pro transfekci byla vybrána jamka s buňkami o 80-90% konfluenci. Plazmidy (200-600 ng), jejichž seznam je uveden v tabulce 3.1., byly přechodně transfekovány do HEK293T buněk pomocí magnetických nanopartikulí MATra-A Reagent a silného magnetu (IBA GmbH, Göttingen, Německo). Transfekované buňky byly v rozmezí 24-48 hodin použity k experimentům. Pro rozeznání buněk exprimujících rekombinantní receptory od buněk netransfekovaných byla používána kotransfekce receptorů s plazmidem kódující zelený fluorescenční protein GFP (150 ng). Po transfekci byly buňky rozpasážovány a nasazeny na plastové kultivační misky o průměru 35 mm, které



měly na svém dně připravena 24 mm sklíčka pokrytá kolagenem a poly-L-lysinem (10 µg/ml rozpuštěný v 0.15 M kys. borité o pH = 8.4) pro lepší adsorpci buněk.

#### **PBS („phosphate buffered saline“)**

Po transfekci byly buňky od transfekční směsi opláchnuty ve fosfátovém pufru (PBS) připraveném z 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a pH roztoku bylo upraveno NaOH na hodnotu 7.3.

#### **Roztok s trypsinem**

Při pasážování buněk se k uvolnění buněk od podložky používal roztok o pH = 7.3 obsahující 0.2 % trypsinu (Invitrogen, Carlsbad, CA) a 10 mg EDTA v 50 ml PBS.

### **3.4. Cílená mutageneze**

Záměny aminokyselin divokých typů TRP receptorů byly připraveny pomocí navržených mutačních primerů syntetizovaných na zakázku (VBC-Biotech, Vídeň, Rakousko) a PCR reakce v Thermo-cycleru (Eppendorf, Hamburg, Německo). Kromě primerů, DNA templátu a mixu oligonukleotidů (Invitrogene, Life Technologies, USA) byly všechny potřebné chemikálie součástí používaného kitu: QuikChange II XL Site-Directed mutagenesis kit (Agilent Technologies, USA). Po ukončení PCR reakce byla templátová DNA naštěpena enzymem DpnI a velikost výsledného produktu byla zkontrolována na 1% agarosovém gelu horizontální elektroforézou (70 mV, ~ 50 minut). Dle protokolu výše uvedeného kitu byly ultrakompetentní bakterie XL10-Gold transformovány 2 µl PCR produktem metodou teplotního šoku (42 s při 45 °C). Buněčná suspenze byla nanášena na Petriho misky s LB agarem obohaceným ampicilinem (2 µg/ml) či kanamycinem (50 µg/ml) a ponechána přes noc v inkubátoru (37 °C). Narostlé kolonie byly zaočkovány do LB média s příslušným antibiotikem a za stálého třepání (200 rpm) a 37 °C byly kultivovány 16-20 hodin. Takto připravené bakteriální kultury byly připraveny pro izolaci plazmidové DNA. K izolaci byl používán QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, USA) a centrifuga (Hettich Instruments, MA, USA). DNA byla z kolonky eluována sterilní deionizovanou vodou temperovanou na 60 °C.

Koncentrace získané DNA byla změřena na přístroji Nanodrop 1000 (NanoDrop Technologies, DE, USA) a přítomnost mutace byla zkontrolována sekvenací na přístroji ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (MBÚ, AV ČR v.v.i.).

### **PCR program**

- |    |          |   |
|----|----------|---|
| 1. | 95 °C    | 1 min                                   |
| 2. | 95 °C    | 50 s                                    |
| 3. | 49-55 °C | 50 s                                    |
| 4. | 68 °C    | 16 min.....kroky 1 → 4: 17-25 opakování |
| 5. | 68 °C    | 10 min                                  |
| 6. | 4 °C     | konec                                   |

### **Příprava LB média a agarových ploten**

1 % peptonu (Serva, Heidelberg, Německo), 0.5 % kvasničního extraktu (Serva, Heidelberg, Německo) společně s 1 % NaCl bylo rozpuštěno v deionizované vodě a sterilizováno (20 min, 121 °C). Pro přípravu agarových ploten byla do LB média navíc přidána 2 % agaru a poté následovala sterilizace. Agar byl ochlazen na ~ 50 °C a těsně před rozlitím do Petriho misek bylo pro selekci transformovaných bakterií přidáno antibiotikum.

### **Elektroforetický pufr (50x TAE)**

Jako pufr pro horizontální elektroforézu byl použit 1x TAE, který byl naředěn z 50x koncentrovaného zásobního roztoku o složení:

Tris base	12,11 g
Kyselina octová 99%	2,85 ml
EDTA	0,73 g
H <sub>2</sub> O	doplněno do 50 ml

### **1% agarosový gel**

Deionizovaná voda byla společně s 1 % agarosy a 2 % 50x TAE pufrům krátce povařena v mikrovlnné troubě. Po rozpuštění agarosy byl roztok mírně ochlazen a k bezpečné vizualizaci DNA byla přidána 10 000x zředěná sonda SYBR®Safe DNA gel stain (Life Technologies, USA), která byla uchovávána při 4 °C ve formě 10x zředěného zásobního roztoku v DMSO.

### 3.5. Metoda terčíkového zámku (Patch clamp)

Membránové proudy z HEK293T buněk byly snímány pomocí elektrofyziologické techniky terčíkového zámku („*patch clamp*“). Proudly byly měřeny z celých buněk („*whole cell*“) zesilovačem Axopatch 200B (Axon Instruments, USA) a programem pCLAMP 10 (Molecular Devices, USA). Snímací pipety byly vytaženy z borosilikátových kapilár o vnějším průměrem 1.65 mm pomocí tahače (P-97, Sutter Instrument, Novato, CA). Hroty pipet byly poté tepelně otaveny (MF-830, Narishige, Tokyo, Japonsko) na výsledný průměr 1-2  $\mu\text{m}$ . Po naplnění pipet ICS se jejich odpor pohyboval v rozmezí 3-5 M $\Omega$ . Přesné umístění snímací pipety vůči membráně buňky bylo zajištěno mikromanipulátorem (MP-225, Sutter Instrument, Novato, CA, USA). Referenční Ag/AgCl elektroda byla ponořena do ECS v mističce s buňkami. Veškeré experimenty mimo experimenty s teplotní stimulací probíhaly při pokojové teplotě (23-25 °C) a membránový potenciál buněk, pokud není uvedeno jinak, byl udržován na -70 mV. Sériový odpor byl u všech buněk kompenzován minimálně na 70 %.

V případě měření mutantních receptorů byl vždy stejnými roztoky a protokolem otestován i divoký typ receptoru na buňkách stejné pasáže. Pro daný typ experimentu byly provedeny nejméně čtyři nezávislé transfekce. Aby výsledky nebyly zkreslené předchozí chemickou expozicí, bylo na každý experiment použito vždy nové krycí sklíčko s buňkami. Transfekované buňky byly vizualizovány pomocí invertovaného fluorescenčního mikroskopu Olympus IX-81 (Olympus, Japonsko) excitací GFP při  $475 \pm 10 \text{ nm}$  a snímáním emise při vlnových délkách  $> 510 \text{ nm}$ .

#### **Chemická a teplotní stimulace**

Pro definovanou aplikaci chemických látek byl používán aplikační systém WAS02 s možností rychlé výměny až sedmi roztoků v čase kratším než 130 ms. Toto aplikační zařízení bylo rozšířeno o možnost přesného řízení teploty roztoku, který protéká jednou ze sedmi křemených kapilár, jejichž společné ústí představuje trubička, kolem které je omotaný izolovaný měděný drátek zajišťující řízené ohřívání roztoků aplikovaných na buňku (Dittert et al., 2006, Dittert et al., 1998). Přesná teplota protékajícího roztoku byla měřena termočlánkem v ústí kapiláry. Aplikační trubička byla umístována přibližně 100  $\mu\text{m}$  od snímané buňky.

Charakteristiky odpovědí při teplotní a chemické aktivaci kanálů byly vyhodnocovány ze záznamu buněk udržovaných na stálém membránovém potenciálu -70 mV a v případě chemické stimulace při pokojové teplotě ~ 23 °C.

Rychlost aktivace odpovědí iontových kanálů na aplikaci jejich agonistů byla stanovena proložení časového průběhu membránového proudu exponenciální funkcí:

$$A(t) = A_{\infty} * (1 - \exp^{-t/\tau}), \quad (1)$$

kde  $A(t)$  představuje amplitudu odpovědi v čase  $t$ ,  $A_{\infty}$  maximální amplitudu,  $\tau$  časovou konstantu reprezentující dobu, za kterou dosáhne amplituda 63 % své maximální hodnoty.

Rychlost deaktivace fáze odpovědi na kapsaicin a kafr byla vyhodnocována jako doba, za kterou klesne amplituda na polovinu maximální hodnoty ( $T_{50}$ ).

Pro vyjádření velikosti kافrových odpovědí TRPV1 receptorů byly tyto hodnoty vztahovány k maximální hodnotě proudové odpovědi dané buňky na 10  $\mu$ M kapsaicin. Míra akutní desenzitizace receptorů byla vyhodnocována jako velikost plochy pod křivkou po dobu 15 s od dosažení maximální amplitudy. Velikost akutní desenzitizace (*des*) uváděná v procentech byla vypočtena dle vztahu:

$$des(\%) = 100 * \left[ 1 - \left( \frac{S}{S_c} \right) \right], \quad (2)$$

ve kterém  $S$  představuje plochu pod křivkou a  $S_c$  celkovou plochu. Absolutní hodnoty 0 % a 100 % představovaly nedesenzitizující a zcela desenzitizující odpověď.

V případech, kdy byly proudové odpovědi receptorů na membránovém potenciálu -70 mV velmi malé a/nebo špatně reprodukovatelné, použili jsme každé 4 s protokol s lineárně se zvyšujícím napětím v rozmezí -70 až +100 mV, trvající 400 ms. Ze záznamů pořízených tímto protokolem jsme poté odečetli hodnoty amplitud na membránovém potenciálu +70 mV nebo +90 mV v kontrolním roztoku, v roztoku obsahujícím agonistu a ve fázi odmývání agonisty.

Proudová hustota buněk („*peak current density*“) byla vyjádřena poměrem maximální hodnoty naměřeného proudu a kapacity buňky (pA/pF).

Teplotní aktivace vaniloidních receptorů byla zajišťována lineárním zvyšováním teploty roztoku aplikovaného na buňku rychlostí maximálně 14 °C·s<sup>-1</sup> do maximální hodnoty s ohledem na aktivační práh daného receptoru.

## Napět'ová stimulace

Napět'ová citlivost receptorů byla testována na buňkách, které byly udržovány na membránovém potenciálu -70 mV při pokojové teplotě ~ 23 °C, poté na ně byl aplikován protokol o 14 vzestupných 100 ms napět'ových skocích v rozmezí -80 do +200 mV, přičemž jednotlivé skoky se zvyšovaly po +20 mV. Z rovnovážných hodnot membránových proudů na daných potenciálech byly dle vztahu (3) vypočteny hodnoty vodivosti, jejichž vynesemím vůči hodnotám potenciálu jsme získali vodivostně-napět'ovou závislost iontových kanálů.

$$G = \frac{I}{U - U_{rev}}, \quad (3)$$

kde  $G$  reprezentuje vodivost v [S],  $I$  hodnotu naměřeného membránového proudu v [A],  $U$  vložené napětí ve [V] a  $U_{rev}$  hodnotu reverzního potenciálu buňky ve [V]. Křivku závislosti vodivosti buňky na membránovém napětí jsme proložili Boltzmannovou funkcí resp.:

$$G = \frac{G_{max} - G_{min}}{1 + \exp\left(-\frac{z \cdot F}{R \cdot T} (V - V_{1/2})\right)} + G_{min}, \quad (4)$$

kde  $G_{max, min}$  představují maximální a minimální vodivost buňky v [S],  $z$  je vrátkovací náboj,  $F$  je Faradayova konstanta (96 485 C·mol<sup>-1</sup>),  $T$  je absolutní teplota v [K],  $V_{1/2}$  je napětí ve [V], při kterém dosahuje vodivost buňky poloviční maximální hodnoty,  $R$  je univerzální plynová konstanta (8.314 J·K<sup>-1</sup>·mol<sup>-1</sup>). Vrátkovací náboj  $z$  je hodnota udávající minimální počet nábojů, které se vlivem změny napětí v proteinu přesunou, a je považován za vhodný parametr napět'ové citlivosti iontových kanálů.

## Statistické vyhodnocení

Elektrofyzilogická data byla analyzována programem pCLAMP 10 (Molecular Devices GmbH, Německo) a křivky byly prokládány a statisticky analyzovány v programu SigmaPlot 10 a SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc., USA). Získané výsledky jsou uvedeny jako průměr ± střední chyba průměru (SEM), statistická významnost byla vypočtena pomocí t-testu. Za statisticky významné byly považovány rozdíly s hladinou významnosti  $P < 0.05$ .

### 3.6. Förster resonance energy transfer (FRET)

K monitorování dynamiky  $\text{PIP}_2$  na vnitřním listu plazmatické membrány v přítomnosti různých aktivátorů TRPV1 receptoru jsme využili metody založené na rezonančním přenosu energie mezi dvěma fluorofory resp. donorem a akceptorem („Förster resonance energy transfer“ - FRET). K přenosu energie mezi donorem a akceptorem dochází po splnění několika podmínek: emisní spektrum donoru se překrývá s excitačním spektrem akceptoru, dipólové momenty obou fluoroforů jsou shodně orientovány a oba fluorofory jsou od sebe vzdáleny maximálně  $\sim 10$  nm. Vztah mezi účinností FRET signálu a vzdáleností fluoroforu udává následující vztah:

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6}, \quad (5)$$

kde  $E$  je účinnost FRET přenosu,  $r$  je vzdálenost mezi donorem a akceptorem,  $R_0$  je vzdálenost, při které je účinnost FRET přenosu energie 50 %. Pro námi zvolenou dvojici fluoroforů CFP a YFP byla hodnota  $R_0$  stanovena mezi 4.9-5.2 nm (Tsien, 1998).

#### Použitý model

Využili jsme zavedeného modelu dvojice fluorescenčně značených PH domén (174 aminokyselin dlouhý úsek N-konce PLC $\delta$ 1) s navázaným CFP (PH\_CFP) a YFP (PH\_YFP) fluorescenčním proteinem (van der Wal et al., 2001). Kladně nabitá rezidua v rámci PH domény se vážou k záporně nabitě molekule  $\text{PIP}_2$  a umožňují tím monitorovat její rozložení v membráně. V klidovém stavu buňky, u které proběhla transfekce ekvimolárním množstvím plazmidů obsahující PH\_CFP a PH\_YFP, je dostatečné množství molekul  $\text{PIP}_2$  v blízkosti sebe v membráně a lze tedy detekovat FRET signál. Tento model FRET experimentu umožňuje monitorovat nejen změny v rozložení fosfolipidů, ale také časový průběh aktivity PLC závislé na  $\text{Ca}^{2+}$  iontech. PLC aktivovaná vstupem vápenatých iontů prostřednictvím aktivovaných TRP kanálů štěpí molekuly  $\text{PIP}_2$ , čímž dojde k poklesu FRET signálu v důsledku uvolnění PH domén do cytoplazmy. Jako donor v tomto modelu sloužil modrý fluorescenční protein CFP (Cerulean), který byl excitován při  $436 \pm 10$  nm a jeho emise snímána při  $480 \pm 15$  nm. Emisní spektrum CFP se překrývá s excitačním spektrem akceptoru, kterým byl žlutý fluorescenční protein YFP, jehož emise byla

detekována při  $535 \pm 20$  nm ( $\lambda_{\text{excitace}} = 470 \pm 10$  nm). Pokles FRET signálu v důsledku aktivace PLC se podle předpokladu projevil jako nárůst emise CFP za současného poklesu emise YFP. Na obrázku 3.1. (str. 64) jsou znázorněna excitační a emisní spektra obou použitých fluoroforů a šedými sloupci jsou vymezeny oblasti citlivosti použitých filtrů.

## **Technické zařízení**

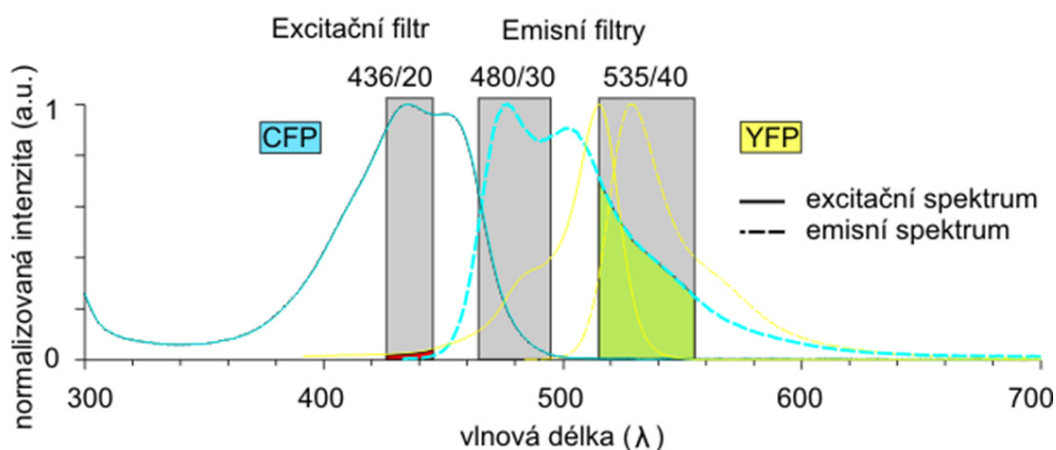
Fluorescenční pokusy byly zaznamenávány pomocí programu Cell<sup>^</sup>R a invertovaného mikroskopu Olympus IX-81 (Olympus, Tokyo, Japonsko) vybaveného speciálním zařízením pro současné snímání emise při dvou různých vlnových délkách (Dual-View Optical Insights, LLC, USA). Nezbytnou součástí aparatury tvořil polychromátor (Polychrome V, Till Photonics, Německo), který je schopen rychle měnit vlnové délky excitace, a citlivá CCD kamera (Hamamatsu Orca ER; Japonsko).

## **Korekční faktory**

Vzhledem k překryvu emisního spektra donoru a emisního filtru akceptoru byl v nepřítomnosti akceptoru stanoven korekční faktor 0.67 (67 % z celkové emise CFP bylo součástí celkové emise v YFP kanálu; obr. 3.1., str. 64, zelená oblast). Druhým korekčním faktorem, který bylo nutné vzhledem k překryvu excitačních spekter donoru a akceptoru stanovit, bylo určení části molekul akceptoru excitovaných při buzení vlnovou délkou donoru v kontrolním případě, kdy není přítomen donor a není tedy možný přenos rezonanční energie z donoru na akceptor (FRET). Tento korekční faktor jsme určili na 0.08 (resp. 8 % z celkové fluorescence YFP budíme v nepřítomnosti donoru; obr. 3.1., str. 64, červená oblast). Abychom mohli tento korekční faktor určit, museli jsme pro každý experiment stanovit celkovou fluorescenci YFP v dané buňce ( $F'_{\text{YFP}}$ ), kterou jsme získali použitím YFP kostky resp. excitací vlnovou délkou pro YFP ( $470 \pm 10$  nm). Výsledný korigovaný FRET signál byl tedy uváděn jako časový průběh poměru mezi fluorescencí korigovaného akceptoru (YFP) a donoru (CFP) :

$$FRET\ signál = \frac{F_{YFP} - (0.67 * F_{CFP}) - (0.08 * F'_{YFP})}{F_{CFP}}, \quad (6)$$

kde  $F_{YFP}$  je intenzita fluorescence YFP získaná excitací vlnovou délkou  $436 \pm 10$  nm (excitační vlnovou délkou CFP) a detekcí emise na  $535 \pm 20$  nm;  $F_{CFP}$  je celková fluorescence CFP detekovaná na  $480 \pm 15$  nm;  $F'_{YFP}$  je intenzita fluorescence YFP buzené vlnovou délkou  $470 \pm 10$  nm a detekované při  $535 \pm 20$  nm.



**Obr. 3.1.: Excitační a emisní spektra dvojice CFP a YFP fluoroforů.** Šedými obdélníky jsou znázorněny oblasti detekce jednoho excitačního (CFP) a dvou emisních filtrů (CFP a YFP), které byly součástí kostky využitě k FRET experimentům. Červená barva vyznačuje míru uplatnění prvního korekčního faktoru, respektive oblast excitačního CFP filtru, v které při excitaci CFP dochází k excitaci také části YFP molekul. Zeleně vyznačená oblast představuje druhý korekční faktor, přesvit části celkové emise CFP do emisního filtru YFP.

## Vyhodnocení FRET experimentů

K vyhodnocení fluorescenčních experimentů byl využit program ImageJ v kombinaci s programem SigmaPlot 10.0 (Systat Software GmbH, Německo). Intenzita fluorescence byla stanovena z oblasti zahrnující celou buňku. Od fluorescenčních záznamů bylo vždy odečteno pozadí, jehož hodnota byla změřena z oblasti neobsahující buňky. Ke grafické prezentaci výsledků byl použit CorelDRAW 12 (Corel Corporation, Kanada), obrázky fluorescenčních záznamů nebyly digitálně upravovány.



## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Mechanismus účinku kafru na TRPV1 kanál

Tato výsledková část popisuje hlavní nálezy publikované v časopise *Anesthesiology* (Marsakova et al., 2012). Kompletní studie je součástí příloh (kapitola 9). Veškeré experimentální výsledky přiložené publikace jsem naměřila samostatně, kromě minoritní části fluorescenčních a dokovacích pokusů, na kterých jsem se podílela ve spolupráci se spoluautory této publikace.

Stěžejním tématem disertační práce jsou experimentální výsledky charakterizující molekulární mechanismus působení monoterpenické látky kafru na vaniloidní receptor TRPV1, který se na sensorických neuronech uplatňuje v drahách bolesti a teplotní citlivosti.

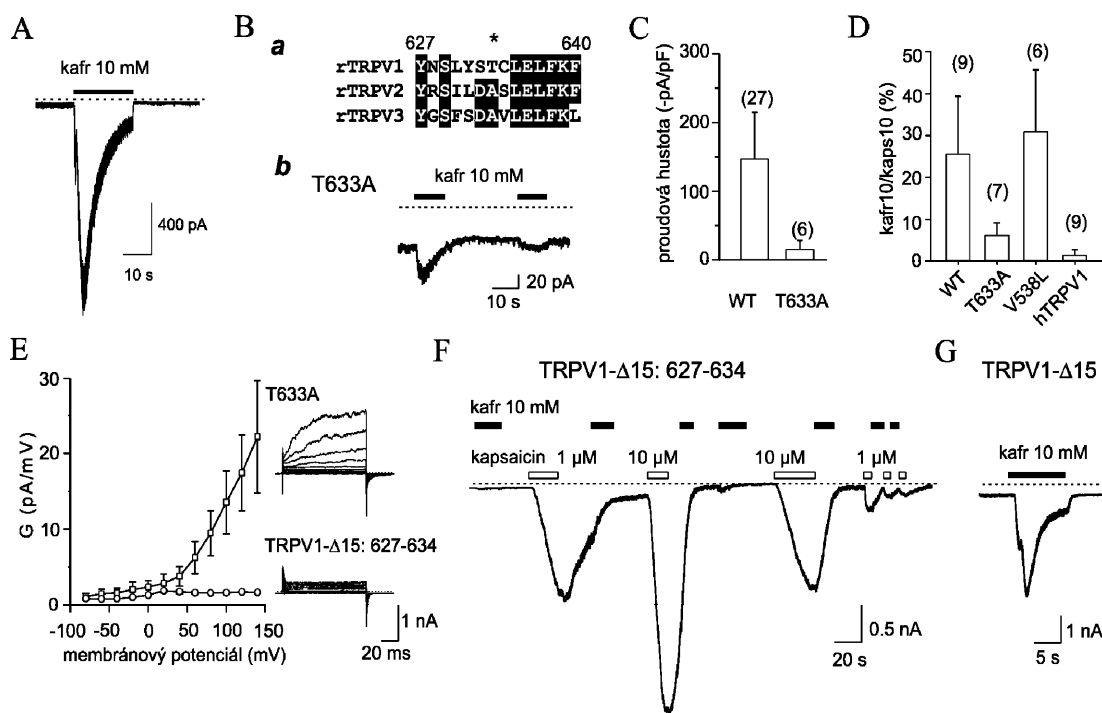
Výsledky studie (Marsakova et al., 2012) přispěly k identifikaci strukturních elementů kafrové citlivosti TRPV1 a poukázaly na důležité aspekty, které se mohou uplatnit při interakci kafru s TRPV1 receptorem. Na základě těchto experimentů jsme vyslovili hypotézu, že rychlé odpovědi TRPV1 kanálu na kafr jsou zprostředkovány interakcí z extracelulární strany receptoru, respektive prostřednictvím interakce a strukturního přeuspořádání pórového helixu. Výsledky také prokázaly, že neméně důležitou funkci v modulaci receptoru může zastávat i změna distribuce PIP<sub>2</sub> v plazmatické membráně, jakožto změna v uspořádání velmi důležitého modulátoru TRPV1.

#### **Kafrová modulace receptoru prostřednictvím pórového helixu**

Aktivace TRPV1 receptoru kafrem je zajišťována vnější pórovou doménou představující krátký helix mezi pátým a šestým transmembránovým segmentem. Zásadní úlohu pro zprostředkování aktivace kafrem má především threonin v pozici 633, který se nachází téměř uprostřed pórového helixu (obr. 4.1.Ba, str. 67). Kritická funkce tohoto rezidua byla dříve prokázána v aktivaci TRPV1 protony (pH = 5.5) (Ryu et al., 2007). Vzhledem k rychlé aktivační i deaktivaci kinetice, kterou jsme pozorovali v našich experimentech při aplikaci kafru, jsme se při hledání možného interakčního místa zaměřili nejdříve na vnější oblast receptoru. Tato oblast obsahuje domény, které byly již dříve podrobně charakterizovány v souvislosti

s extracelulárním účinkem protonů. Protony se uplatňují prostřednictvím dvou klíčových aminokyselinových zbytků v oblasti póru iontového kanálu (E600 a E648) (Jordt et al., 2000) a konformační změny zahrnují také pórový helix (T633) (Ryu et al., 2007), druhou extracelulární kličku (V538 a E536) (Ryu et al., 2007, Wang et al., 2010), ale také specifický aromatický aminokyselinový zbytek F660 v šesté transmembránové doméně (Aneiros et al., 2011), který je důležitý jak pro aktivační, tak potenciační účinek protonů.

Měřením membránových proudů jsme zjistili, že záměnou threoninu 633 za alanin získáme mutantní receptor, u kterého se amplituda kافrem vyvolané proudové odpovědi na membránovém potenciálu -70 mV sníží o 94 % (obr. 4.1.Bb,C, str. 67). Mutant měl současně v plném rozsahu zachovánu citlivost na kapsaicin. Tento výsledek nás vedl k hypotéze, že reziduum nezbytné pro aktivaci TRPV1 protony se může uplatňovat také při převodu signálu interakce s kافrem. Ověřovali jsme proto, do jaké míry je aktivační dráha pro kافr společná s dráhou pro protony a za tímto účelem jsme zkonstruovali mutant, jenž selektivně odstranil schopnost protonů aktivovat TRPV1 (Ryu et al., 2007) a u kterého byl valin 538 v kličce mezi třetím a čtvrtým transmembránovým helixem zaměněn za leucin (V538L). Při testování kافrové citlivosti tohoto mutantu jsme však nepozorovali žádný pokles odpovědi na kافr v porovnání s divokým typem receptoru (obr. 4.1.D, str. 67). To znamená, že konformační změny vyvolané kافrem zahrnují T633, ale pro převod aktivačního signálu není zřejmě druhá extracelulární klička důležitá.

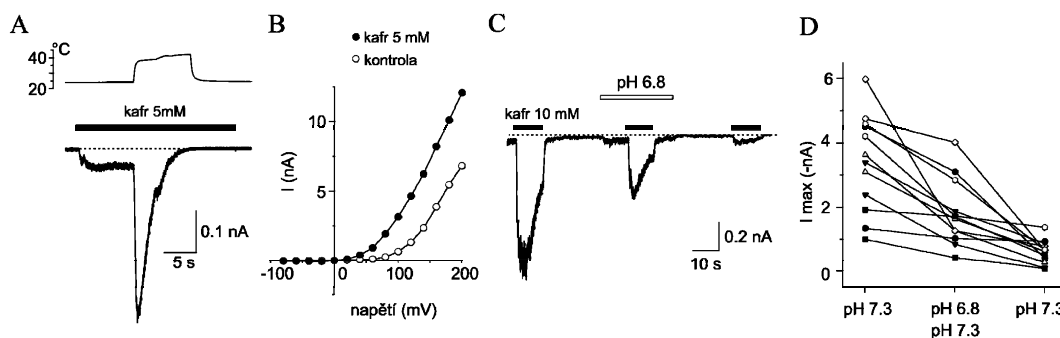


**Obr. 4.1.: Pórový helix hraje klíčovou úlohu v kařové citlivosti TRPV1 receptoru.**  
 A, Typická proudová odpověď TRPV1 kanálu na aplikaci roztoku obsahujícího 10 mM kař. B, Porovnání sekvencí pórových helikálních domén třech zástupců potkaních vaniloidních receptorů (a), substituce threoninu 633 za alanin významně redukuje kařem vyvolané odpovědi (b). C, Kvantifikace proudové hustoty v maximální amplitudě vyvolané roztokem 10 mM kařu pro divoký typ receptoru (WT) a T633A mutant. D, Membránové proudy vyvolané aktivací 10 mM kařu u potkaní varianty WT TRPV1, jeho mutantů T633A, V538L a lidské varianty divokého typu TRPV1 receptoru (hTRPV1) vztahované k maximální odpovědi na 10  $\mu$ M kapsaicin (kaps10), vyjádřené jako poměr kař10/kaps10. E, Vodivostně-napěťový vztah byl získán z ustáleného stavu proudových odpovědí z celých buněk (grafy vpravo) po aplikaci napěťových skoků od -80 do 200 mV, T633A mutant (čtverečky) je na rozdíl od TRPV1- $\Delta$ 15:627-634 chiméry (kolečka) depolarizujícím napětím aktivován. F, TRPV1 chiméra je kompletně necitlivá na kař, kař u ní není schopen vyvolat ani potenciaci kapsaicinové odpovědi, chiméra je charakteristická pomalým nástupem aktivace i deaktivace kapsaicinové odpovědi. G, Delece 15 nekonzervovaných reziduí před pórovým helixem, které chybí u měřené chiméry, nemají vliv na kařovou citlivost TRPV1 receptoru. Kromě experimentů zobrazených v případě E, byly buňky udržovány na membránovém potenciálu -70 mV, čísla v závorkách znázorňují počet naměřených buněk, v případě C, D, data představují průměrné hodnoty  $\pm$  směrodatné odchylky.

Abychom upřesnili funkční význam pórového helixu obsahující T633 pro převod kařové signalizace, použili jsme chiméru TRPV1 receptoru (Ryu et al., 2007), která měla oblast pórového helixu (Y627-C634) vyměněnu za odpovídající část TRPV2 receptoru, který je na kař necitlivý. U této chiméry (TRPV1- $\Delta$ 15:627-634) došlo k úplné ztrátě citlivosti na kař (obr. 4.1.F), což je silným důkazem toho, že zaměněná oblast je nezbytná pro zprostředkování kařové odpovědi. Chiméra se kromě vyměněné pórové části receptoru od divokého typu receptoru lišila delecí patnácti ( $\Delta$ 15:T612-S626) nekonzervovaných aminokyselin v klíče spojující pátou

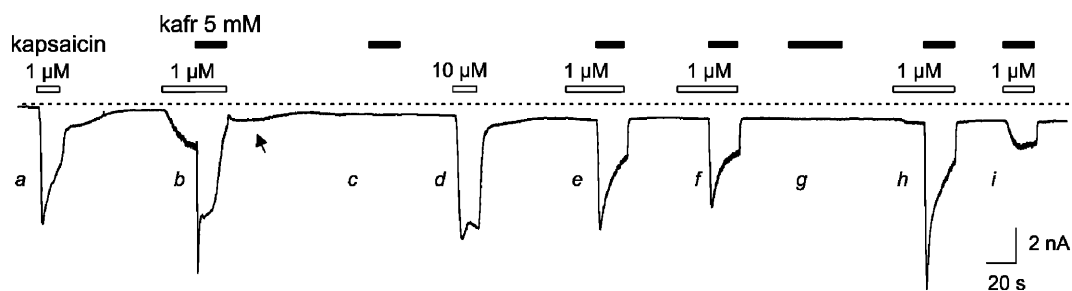
transmembránovou doménu s pórovým helixem. Z tohoto důvodu jsme také testovali kontrolní chiméru s delecí zmíněných patnácti aminokyselin (TRPV1- $\Delta$ 15) a experimentálně jsme vyvrátili možnost, že by tato část měla nějakou funkci v kafrové citlivosti TRPV1 receptoru, či že by se chiméra funkčně odlišovala od TRPV1- $\Delta$ 15:627-634 chiméry (obr. 4.1.G, str. 67). Ve shodě s předešlou studií (Ryu et al., 2007) naše výsledky ukázaly, že elektrofyzilogická odpověď zmiňované chiméry (TRPV1- $\Delta$ 15:627-634) je typická zpomalenou aktivační a deaktivací kinetikou, avšak plně zachovává maximální amplitudu kapsaicinové odpovědi. Nelze tedy říci, že by pozorovaný fenotyp chiméry byl odrazem nefunkčního kanálu. Zjistili jsme, že chimerický typ kanálu je necitlivý nejen na kyselé pH (pH = 6.8), jak již bylo popsáno dříve (Ryu et al., 2007), ale především na kafr a na rozdíl od mutantu T633A překvapivě i na depolarizující napětí (obr. 4.1.E, str. 67). Tyto údaje podporují hypotézu o úloze pórového helixu jako společného elementu pro otevírání a zavírání iontového kanálu v přítomnosti různých aktivačních modalit (Myers et al., 2008).

Kromě výše zmíněných společných defektů protonové a kafrové aktivace jak u T633A mutantu, tak u TRPV1- $\Delta$ 15:627-634 chiméry jsme navíc u divokého typu TRPV1 receptoru pozorovali i velmi slabou kafrovou potenciaci proudových odpovědí vyvolaných nízkým pH (obr. 4.2.C,D, str. 69), což je v rozporu s typickým alosterickým chováním TRPV1 aktivátorů, které jsme pozorovali u teplotní, napěťové či kapsaicinové odpovědi (obr. 4.2.A,B a 4.3., str. 69 a 70). Tato relativně malá míra potenciace by mohla být známkou kompetice aktivačních drah kafru a protonů.



**Obr. 4.2.: Kafrem zprostředkovaná potenciace proudových odpovědí klasických aktivátorů TRPV1 receptoru.** A, Teplem vyvolaná potenciace a desenzitizace káfrové odpovědi, horní záznam znázorňuje průběh teploty. B, Přítomnost káfru (černé symboly) posouvá proudově-napěťovou křivku TRPV1 kanálu směrem k méně depolarizujícímu napětí, každý bod na křivce odpovídá hodnotě proudové odpovědi z celé buňky, na kterou byly aplikovány napěťové skoky v rozmezí -80 do +200 mV po 20 mV. C, Amplituda káfrové odpovědi při pH = 6.8 nedosáhne hodnoty první kontrolní káfrové odpovědi při pH = 7.3 a nezmění průběh tachyfylyxe, což je v rozporu s potenciálním efektem káfru v přítomnosti jiných aktivčních podnětů (A, B.). D, Každé tři spojené body představují amplitudy odpovědi tří po sobě jdoucích proudových odpovědí vyvolaných aplikací 10 mM káfru na membránovém potenciálu -70 mV z šesti kontrolních buněk vystavených třem aplikacím káfru při pH = 7.3 (bílé symboly) a šesti nezávislých experimentů ve stejném uspořádání jako v případě C, (černé symboly).

Měřením proudových odpovědí vyvolaných kapsaicinem, kafrem a jejich kombinací v přítomnosti extracelulárního vápníku jsme zjistili, že potenciace kapsaicinové odpovědi kafrem je stavově závislá, neboť kafr je schopen zvyšovat kapsaicinem vyvolané odpovědi pouze za podmínky předchozí aktivace kanálu kapsaicinem (obr. 4.3., str. 70). Tato potenciace je navíc velmi rychlá, vratná a dosahuje maximální amplitudy odpovědi (~ 10  $\mu$ M kapsaicin), což vypovídá o přímém působení káfru z extracelulární strany prostřednictvím pórového helixu, který zde může zastávat funkci pohyblivé bariéry pro vstupující ionty, jež je kromě toho závislá na protonovém stavu kanálu. Dalším důležitým faktem podporujícím úlohu vnější pórové domény jako alosterického regulačního místa receptoru (Myers et al., 2008) je, že selektivní filtr TRPV1 kanálu nepodléhá během aktivace kafrem dynamickým konformačním změnám, ale naopak zůstává rigidní - nezvětšuje svůj průměr (Chung et al., 2008).

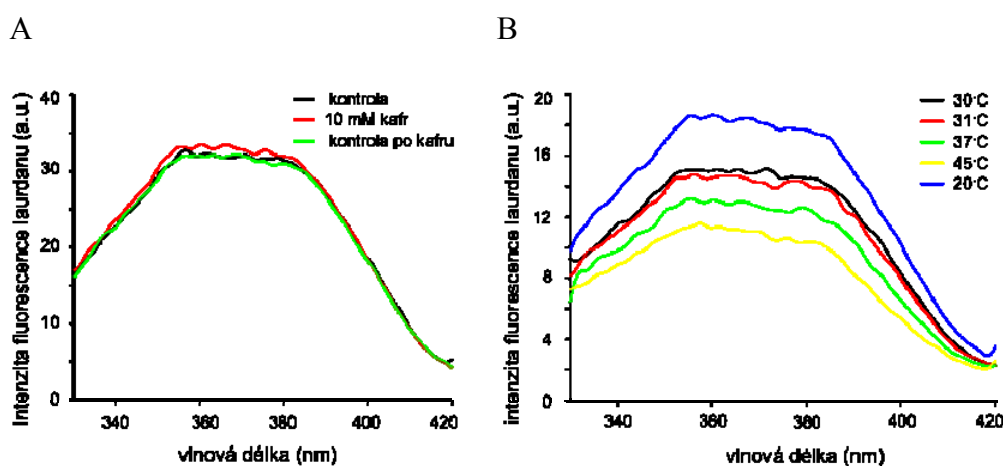


**Obr. 4.3.: Kafrem vyvolaná stavově závislá potenciace kapsaicinové odpovědi TRPV1.** Reprezentativní záznam proudových odpovědí z celé buňky (HEK293T), exprimující TRPV1 receptory, udržované na membránovém potenciálu  $-70$  mV. Přerušovaná čára představuje nulovou úroveň proudu. Aplikace roztoků s 1 a 10  $\mu$ M kapsaicinem (bílé obdélníky; a, d), 5 mM kafrem (černé obdélníky; c, g) či jejich kombinace (b, e, f, h, i) odhalují, že kafr potenciace kapsaicinem vyvolané odpovědi mnohem efektivněji, pokud je receptor obsazen kapsaicinem, než v případě zavřené formy receptoru (b, e, f, h vs. i), a to i v případě, že kafr sám již žádnou odpověď nevyvolá (c, g).

### Kafrová modulace receptoru prostřednictvím membrány

V navazující sérii experimentů jsme testovali hypotézu, že kafr působí na TRPV1 přímo. Optickým pozorováním HEK293T buněk transfekovaných TRPV1 receptorem současně s fluorescenčně značenými proteiny specificky se vázajícími k plazmatické membráně (PH\_CFP a PHYFP) jsme ve fluorescenčním mikroskopu pozorovali jasné morfologické změny doprovázející působení kafru aplikovaného ve fyziologicky účinné koncentraci 1-10 mM (obr. 4.5., str. 72). Proto jsme další cíl naší studie zaměřili na prozkoumání možné funkce plazmatické membrány v modulaci TRPV1 zprostředkované kafrem. Je známo, že kafr sám o sobě mění fyzikální vlastnosti membrán, zejména anizotropii a fluiditu (Turina et al., 2006), a může tak měnit i okolí iontového kanálu. Abychom ověřili, do jaké míry může kafr vyvolávat fázové změny v buněčných membránách, využili jsme vlastnosti fluorescenční sondy laurdan (6-dodecanoyl-2-dimethylaminonafalen), jejíž spektrum citlivě reaguje na změny vodního obsahu v membránové dvojvrstvě a vypovídá tak o fázových změnách membrány (Sanchez et al., 2012). Po 2.5 h barvení buněk laurdanem jsme pomocí spektrofluorometru měřili kontrolní excitační spektra a porovnávali je se spektry buněk ponořených v extracelulárním roztoku obsahujícím 10 mM kafru. Přítomnost kafru vyvolávala malé, vratné, ale přesto reprodukovatelné změny v excitačním spektru buněk, které byly analogické změnám vyvolaným snížením teploty (obr. 4.4., str. 71). Z hlediska uplatnění vlivu fázových změn na aktivity teplotně citlivých membránových receptorů bylo velmi důležité zjištění, že největší změny ve spektru byly pozorovány při změnách teploty. Při porovnání

spekter při 45 °C a 20 °C se intenzita fluorescence laurdanu zvýšila na dvojnásobek, což může znamenat, že také chladově citlivé receptory mohou být řízeny v závislosti na fázi plazmatické membrány. Ačkoli je charakter změn ve spektru při ochlazení a při působení kafru obdobný, nemůžeme jednoznačně říci, že dochází v membráně ke stejným strukturním změnám. Navíc data mohou být ovlivněna tím, že je laurdan přítomen i ve vnitřních membránách, kterých je v buňce několikanásobně větší objem, než membrány plazmatické (Lodish et al., 2004). Vnitřní membrány mají navíc odlišné vlastnosti od membrány plazmatické a mohou tak pozměnit získané spektrum. To může být jednou z příčin, proč se nám pomocí fluorimetrických měření spekter laurdanu nepodařilo prokázat rozsáhlé změny ve struktuře membrán vyvolané kafrem. Tato zjištění podporují naši hypotézu, že kafr moduluje iontové kanály spíše specificky, prostřednictvím „jemnějších“ a přímých mechanismů, než jsou obecné změny fáze plazmatické membrány.

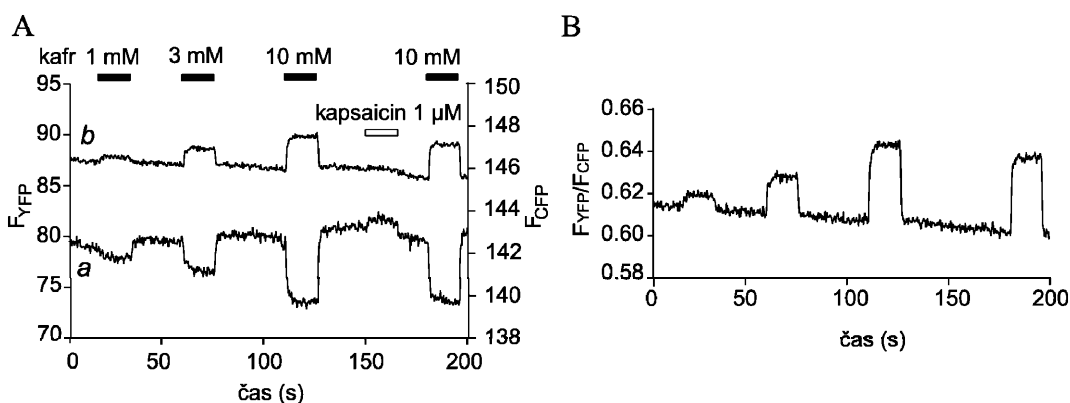


**Obr. 4.4.: Vliv kafru a teploty na fázové změny v membráně.** Excitační spektra buněk barvených fluorescenční sondou laurdan a jejich závislost na přítomnosti 10 mM kafru graf A, a na teplotě graf B,. HEK293T buňky byly napěstovány na sklíčku a barveny 2.5 h v 2  $\mu$ M laurdanu, poté na nich bylo změřeno excitační spektrum v rozmezí 330-420 nm (emise 440 nm).

V dalších pokusech jsme se proto zaměřili na zkoumání změn v membránové distribuci PIP<sub>2</sub>, který by jako významný modulátor TRPV1 kanálu (Lukacs et al., 2007) mohl zprostředkovávat mnohem více specificky účinek kafru na tento iontový kanál.

## Kafrová modulace receptoru prostřednictvím PLC a PIP<sub>2</sub>

Jakým způsobem mohou změny vyvolané kafrem na úrovni membrány souviset s funkcí TRPV1 receptoru? Na tuto otázku se zaměřila další série experimentů, v níž jsme se pokusili popsat účinek kafru na dynamiku distribuce membránového PIP<sub>2</sub>, který je významným modulátorem TRPV1 receptoru (Brauchi et al., 2007, Prescott et al., 2003). Za využití metody FRET s fluorescenčně značenými doménami vázajícími molekuly PIP<sub>2</sub> (van der Wal et al., 2001) jsme v závislosti na aplikaci kafru v buňkách neexprimující TRPV1 receptor pozorovali specificky rychlé, koncentračně závislé, vratné a opakovatelné změny v relativní intenzitě FRET signálu odrážejícím změny v distribuci PIP<sub>2</sub> molekul mezi membránou a cytosolem (obr. 4.5.). Pozorované změny naznačují děj odpovídající růstu koncentrace PIP<sub>2</sub> ve vnitřním listu membrány v přítomnosti kafru.

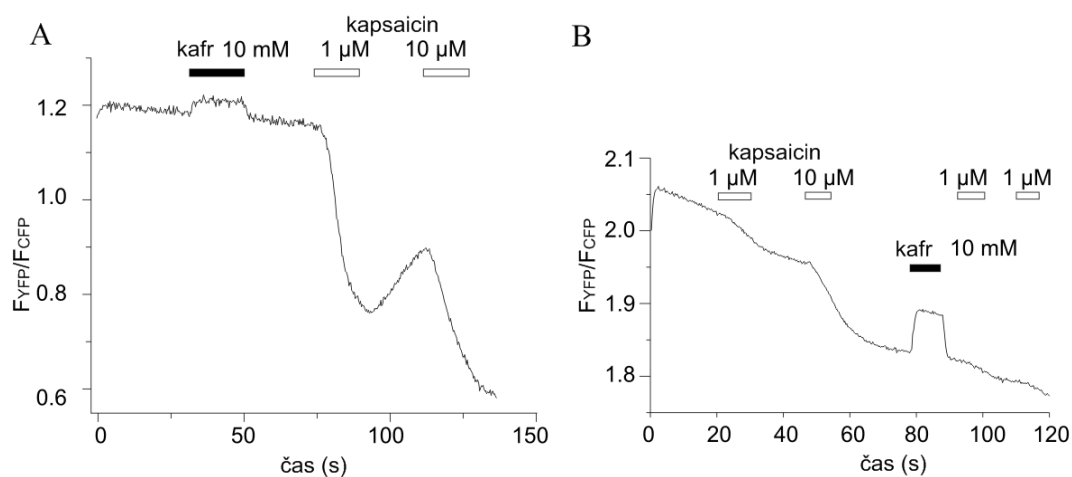


**Obr. 4.5.:** *Kafr vyvolává vratné, koncentračně závislé změny ve FRET signálu mezi CFP a YFP fluorescenčními proteiny navázanými na PH doménu, které obsahují PIP<sub>2</sub> vazebné domény. A, Kinetické změny v CFP (a) a YFP fluorescenci (b) z jediné buňky (HEK293T), vyvolané vzrůstající koncentrací kafru (1, 3 a 10 mM), buňka byla transfekována pouze PH\_CFP a PH\_YFP konstrukty. B, Stejný záznam jako v případě A, vyjádřený jako časový průběh FRET signálu resp. poměru fluorescence YFP a CFP ( $F_{YFP}/F_{CFP}$ ). V přítomnosti kafru dochází k nárůstu FRET signálu, který odpovídá změně v rozložení – přiblížení molekul PH domén či nárůstu koncentrace PIP<sub>2</sub> ve vnitřním listu plazmatické membrány. Během experimentu byly fluorofory vystaveny excitaci o vlnové délce  $436 \pm 10$  nm (56 ms) a emise byla detekována na  $480 \pm 15$  nm a  $535 \pm 20$  nm.*

Podobné změny v distribuci PIP<sub>2</sub> v přítomnosti kafru jsme pozorovali nezávisle na přítomnosti TRPV1 iontového kanálu (obr. 4.6., str. 73). Kafr má v buňkách exprimujících receptory ve srovnání s kapsaicinem opačný vliv na tendenci změn FRET signálu. Pozorovaný účinek kapsaicinu na FRET signál (pokles) je však na rozdíl od efektu kafru (nárůst) dobře reprodukovatelný a odpovídá poklesu množství PIP<sub>2</sub> v membráně v důsledku aktivace PLC vápenatými ionty proniknuvšími pórem aktivovaného TRPV1 kanálu. Kafrem vyvolané změny

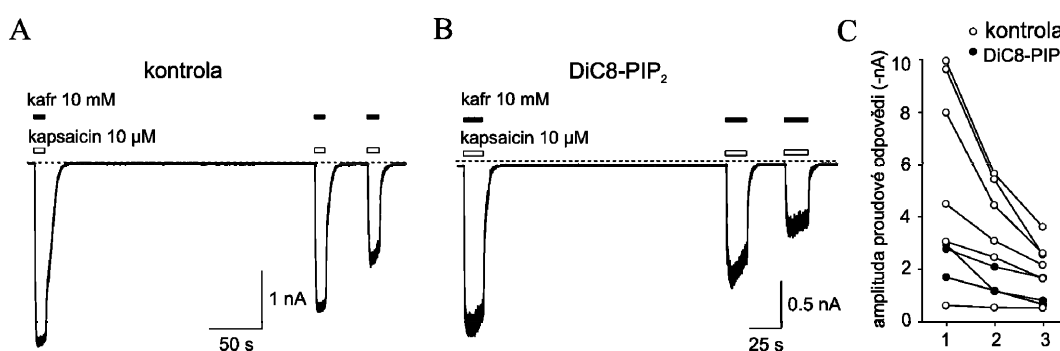


ve fluorescenci byly navíc velmi rychlé a vratné, což je v rozporu s rychlostí štěpení a resyntézy  $\text{PIP}_2$  po aplikaci kapsaicinu. Význam kafrem indukovaných změn ve fluorescenčním signálu jsme se snažili poodhalit pomocí souvislostí s elektrofyziologickými záznamy a porovnáním odpovědi s typickým plným agonistou TRPV1 receptoru, jakým je kapsaicin. Kafr je jen částečný agonista TRPV1 receptoru, vyvolávající proudové odpovědi, které na záporných membránových potenciálech (-70 mV) dosahují jen ~ 25 % maximální amplitudy odpovědi na saturující koncentraci kapsaicinu (10  $\mu\text{M}$ ). Kafrem vyvolané odpovědi TRPV1 receptoru jsou typické snížením jejich velikosti amplitudy při opakované aplikaci (tachyfylyxi). Elektrofyziologická data tedy nekorespondují s pozorovanými změnami v distribuci  $\text{PIP}_2$ , které se při opakované aplikaci kafru nemění. Obdobné opakovatelné a neměnné odpovědi jako u fluorescenčních pokusů jsme však u TRPV1 kanálu pozorovali při opakované potenciaci kapsaicinových odpovědi kafrem (obr. 4.3., str. 70). Kafr je na kanálu obsazeném kapsaicinem schopen opakované potenciace do maximální hodnoty amplitudy při aktivaci. Na základě našich experimentálních dat se domníváme, že pozorované změny ve FRET signálu resp. ve vzdálenosti  $\text{PIP}_2$  molekul na vnitřním listu membrány mohou souviset spíše s potenciační schopností kafru než s aktivací TRPV1 kanálu.



**Obr. 4.6.: Kafr ve srovnání s kapsaicinem vyvolává opačné změny ve FRET signálu z buněk exprimujících TRPV1 receptor.** A, Aplikace kafru vyvolává vratné zvýšení FRET signálu mezi CFP- a YFP- značenými PH doménami, naopak aplikace 1  $\mu\text{M}$  kapsaicinu vyvolá pokles signálu korespondující s aktivací PLC  $\text{Ca}^{2+}$  resp. s úbytkem  $\text{PIP}_2$  v membráně, který je následován resyntézou nových molekul  $\text{PIP}_2$  a tím i nárůstem FRET signálu; aplikace 10  $\mu\text{M}$  kapsaicinu vyvolala výrazný pokles interakcí mezi fluorofory resp. mezi  $\text{PIP}_2$  a PH doménami. B, Kafr je schopen částečně navýšit FRET signál, který byl předtím snížen v důsledku deplece molekul  $\text{PIP}_2$  po aplikaci kapsaicinu. Uvedené záznamy byly pořizeny z nezávislých HEK293T buněk exprimující TRPV1 receptor, PH\_CFP a PH\_YFP doménu.

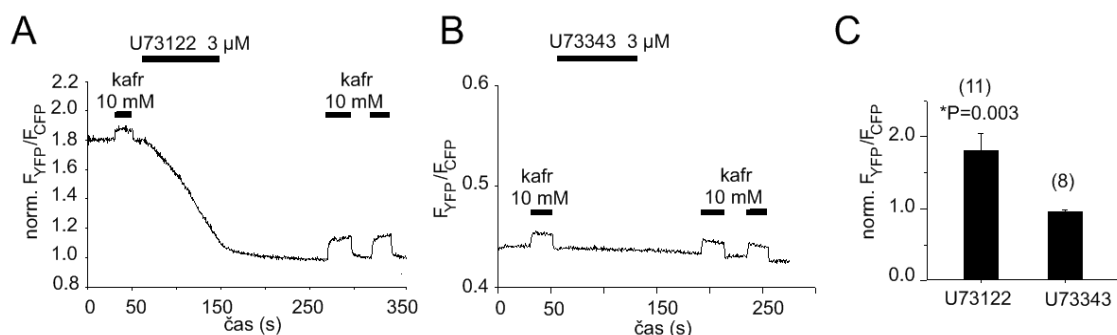
Pokud by nárůst FRET signálu v přítomnosti kafru představoval přibližování PH domén v důsledku zvýšené dostupnosti PIP<sub>2</sub> molekul, mohlo by v důsledku toho docházet k přibližování molekul PIP<sub>2</sub> k vazebné doméně na TRPV1 receptoru (Ufret-Vincenty et al., 2011). Testovali jsme proto vliv zvýšené intracelulární koncentrace PIP<sub>2</sub> na proudové odpovědi vyvolané kafrem. Do intracelulárního roztoku, který neobsahoval hořčičkové ionty, jsme přidali rozpustnou formu fosfolipidu dioktanoylfosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (DiC8-PIP<sub>2</sub>, 25 μM) a porovnávali jsme časový průběh proudových odpovědí vyvolaných opakovanou aplikací 10 mM kafru v kombinaci s 10 μM kapsaicinem před a po tří minutové perfúzi (obr. 4.7.). Skutečnost, že jsme nepozorovali rozdíl mezi časovým průběhem proudů snímaných elektrodami obsahujícími DiC8-PIP<sub>2</sub> a kontrolními měřeními, nás vedla k závěru, že redistribuce PIP<sub>2</sub> nemusí být primárním signálem pro aktivační účinky kafru, nebo že se v jeho přítomnosti afinita TRPV1 k PIP<sub>2</sub> výrazně zvýší.



**Obr. 4.7.: Vliv přidání DiC8-PIP<sub>2</sub> na hodnotu maximální proudové odpovědi TRPV1.** Repräsentativní záznamy proudových odpovědí z celých buněk exprimující divoký typ TRPV1 receptoru měřené na membránovém potenciálu -70 mV. Proudů byly vyvolané směsí 10 μM kapsaicinu s 10 mM kafrem. Složení intracelulárního roztoku bylo v záznamu A, standardní nebo v záznamu B, neobsahovalo ATP a Mg<sup>2+</sup> ionty, ale obsahovalo 25 μM DiC8-PIP<sub>2</sub>. C, Souhrnná data ze šesti experimentů se standardním intracelulárním roztokem (jako v záznamu A, bílé kroužky) a třech experimentů s intracelulárním roztokem obsahující DiC8-PIP<sub>2</sub> (jako záznam B, černé kroužky).

V nedávné době bylo zjištěno, že kafr (a některé jiné monoterpenoidní látky) inhibuje aktivitu PLC (Kim et al., 2008). Zkoumali jsme proto možnost, že kafr moduluje TRPV1 prostřednictvím signálních drah, které prokazatelně souvisejí s bioaktivními účinky PIP<sub>2</sub>, a to tak, že inhibuje PLC a z důvodu následné zvýšené dostupnosti PIP<sub>2</sub> na vnitřní straně membrány snižuje energii nutnou k otevření iontového kanálu. Zaznamenávali jsme časový průběh FRET signálu z HEK293T buněk exprimujících PH\_CFP a PH\_YFP domény, na něž byl krátce aplikován kafr

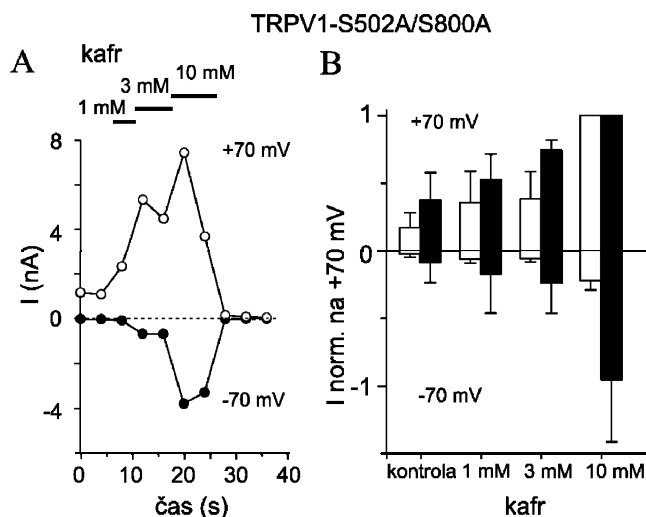
(10 mM, 20 s), a poté po dobu 1-2 minuty inhibitor PLC U73122 (3  $\mu$ M; 1-[6-(((17 $\beta$ )-3-metoxyestra-1,3,5[10]-trien-17-yl)amino)hexyl]-1H-pyrrol-2,5-dion); obr. 4.8.A). Po inkubaci s inhibitorem PLC byl aplikován opět kafr. Podobný protokol využívající U73122 jako inhibitor PLC byl dříve navržen pro monitorování hladiny PIP<sub>2</sub> metodou FRET již dříve v jiné studii (Horowitz et al., 2005) a délka aplikace a koncentrace byla autory optimalizována tak, aby nedocházelo k vedlejším nespecifickým účinkům této látky. Přestože jsme v naší studii zvolili obdobný postup, s překvapením jsme pozorovali silný pokles FRET signálu po aplikaci U73122 (obr. 4.8.A). I po tomto silném poklesu signálu bylo patrné, že kafr vratně zvyšuje relativní odpověď FRET signálu podobně jako v buňkách, kde byla PLC aktivována kapsaicinem (obr. 4.6.B, str. 73). Relativní zvýšení bylo dokonce téměř dvojnásobné ve srovnání s výsledkem shodného experimentu na neúčinném analogu PLC inhibitoru U73343 (3  $\mu$ M; 1-[6-(((17 $\beta$ )-3-metoxyestra-1,3,5[10]-trien-17-yl)amino)hexyl]-2,5-pyrrolidindion; obr. 4.8.B,C), který jsme provedli za účelem vyloučení nespecifických účinků inhibitoru. Přikláníme se proto k hypotéze, že inhibice PLC snižuje relativní odpověď FRET signálu na kafr.



**Obr. 4.8.: Inhibice PLC způsobuje kafrem vyvolané zvýšení FRET signálu v HEK293T buňkách exprimující CFP- a YFP- značené PH domény.** Časový záznam změny FRET signálu (vyjádřeného jako poměr intenzit akceptoru a donoru elektronů resp.  $F_{YFP}/F_{CFP}$ ) vyvolaného aplikací 10 mM kafru před a po 90 s inkubaci s inhibitorem PLC (U73122) A, a s jeho neaktivní formou (U73343) B., C. Po aplikaci U73122 na rozdíl od U73343 dochází k významnému nárůstu FRET signálu ( $P = 0.003$ ).

## Kafrová modulace receptoru v závislosti na jeho fosforylačním stavu

Zjistili jsme, že mutant TRPV1 receptoru S502A/S800A, který má poškozena fosforylační místa pro PKC a PKA, vykazuje zvýšenou citlivost ke kafru (obr. 4.9.). Částečná afinita TRPV1 receptoru ke kafru může být tedy závislá na fosforylačním stavu resp. na stupni citlivosti k proteinkinázám (Studer and McNaughton, 2010).



**Obr. 4.9.: Efekt odstranění fosforylačních míst S502 a S800 na kastrovou citlivost TRPV1.** A, Typický záznam proudových odpovědí z celé buňky exprimující receptor s dvěma mutacemi (TRPV1-S502A/S800A) na +70 mV (bílé symboly) a na -70 mV (černé symboly). V experimentu byly každé 4 s aplikovány 400 ms napěťové skoky v rozmezí -70 do +100 mV a to nejdříve v extracelulárním roztoku (kontrola) a poté ve zvyšující se koncentraci kafuru (1, 3 a 10 mM). Každé kolečko reprezentuje amplitudu odpovědi při daném potenciálu (+70 či -70 mV). B, Každý sloupec reprezentuje průměrná data z pěti experimentů jako v případě A, a to jak pro divoký typ receptoru (bílé sloupce) tak pro mutant S502A/S800A (černé sloupce) normalizovaná na maximální hodnotu proudu vyvolanou roztokem 10 mM kafuru na +70 mV.

## 4.2. Funkční a strukturální úloha S4-S5 oblasti u teplem aktivovaných TRPV kanálů

Ve studii (Boukalova et al., 2010) byla v rámci S4-S5 oblasti identifikována čtyři nabitá rezidua (R557, E570, D576 a R579), jejichž mutací byla poškozena funkce TRPV1 kanálu, a to vzhledem k citlivosti na napětí, kapsaicin, teplo, 2-APB a/nebo jejich alosterické působení. Podařilo se prokázat funkční význam interakce dvou dvojic opačně nabitých aminokyselinových zbytků R557/E570 a D576/R579 a identifikovat aminokyselinu K571 nezbytnou pro chemickou aktivaci TRPV1 receptoru 2-APB.

V rámci této studie jsem se podílela na plánování a přípravě mutantních variant TRPV1 (Y554F, Y555F, G563A, G563C, G563S, R579E, R579D, R557E/E570R), TRPV2 (D534V, R515A, K529E, Q530E) a TRPV3 (Q580E, R567A, K581E) receptorů. V případě pochybností o funkčnosti některých mutantů jsem provedla poměrové měření změn koncentrace intracelulárního vápníku pomocí FURA-2 sondy a kontrolu membránové exprese receptorů pomocí konfokální mikroskopie.

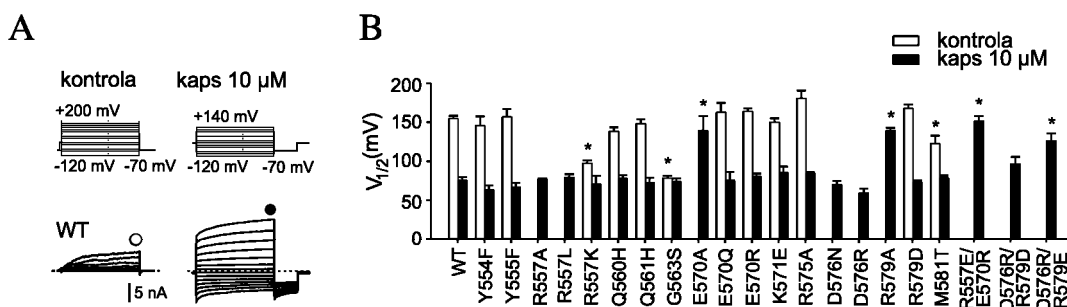
Studie byla zaměřena na funkční a strukturální význam kladných aminokyselinových zbytků v S4-S5 oblasti TRPV1 receptoru a reziduí, které by mohly hrát úlohu v citlivosti na membránové napětí. Oblast S4-S5 je mezi savčími zástupci TRPV receptorů vysoce konzervovaná. Pro TRPV1 receptor je tato oblast (Y554-F582) ze 72.4 % identická s odpovídající oblastí TRPV2 (Y512-L540) a ze 65.5 % s TRPV3 receptorem (Y564-F592) (obr. 4.10.C, str. 78). Nabitá rezidua uvnitř S4-S5 oblasti jsme podrobili postupné mutageně a elektrofyziologickému testování napěťové, chemické a teplotní citlivosti. V případech, kdy jsme u některé mutace TRPV1 receptoru pozorovali významné poškození některého ze sledovaných parametrů ( $V_{1/2}$ ,  $Q_{10}$ , amplituda a/nebo kinetika membránových proudů vyvolaných kapsaicinem a 2-APB), připravili jsme a testovali analogické mutanty pro TRPV2 a TRPV3 receptory, abychom zjistili míru konzervovanosti mechanismu aktivace. S překvapením jsme zjistili, že homologní rezidua, pro která jsme u TRPV1 identifikovali významné změny funkce vyvolané specifickou mutací, neměla u TRPV2, TRPV3 receptorů analogickou poruchu aktivace. Například pro TRPV2 receptor jsme testovali pět mutací, které u TRPV1 vedly ke ztrátě teplotní aktivace, ale u homologních TRPV2 mutantů byla teplotní citlivost shodná s divokým typem



## Napět'ový senzor TRPV1 receptoru

Systematickým mutováním jednotlivých nabitých aminokyselin jsme identifikovali dva aminokyselinové zbytky R557 v S4 helixu a D576 v S4-S5 klíče, které by mohly být součástí napět'ového senzoru TRPV1 receptoru. Záměnou náboje (R557E a D576R) či neutralizací (R557A, R557L a D576N) těchto dvou zbytků jsme získali fenotyp receptorů s narušenou napět'ovou citlivostí (obr. 4.11.B, str. 80). Napět'ovou závislost TRPV1 receptorů jsme charakterizovali hodnotami membránového potenciálu, při kterých bylo dosaženo poloviční hodnoty maximální vodivosti kanálů vyvolané depolarizujícím napětím ( $V_{1/2}$ ). Pro R557A, R557L, D576R, D576N mutanty nebylo technicky možné odhadnout hodnoty  $V_{1/2}$ , protože rozsah měřicí aparatury neumožňuje regulovat membránový potenciál nad hodnoty vyšší než  $\pm 200$  mV. R557E konstrukt byl nefunkční. Překvapivé bylo, že se v přítomnosti saturující koncentrace kapsaicinu hodnoty  $V_{1/2}$  uvedených mutantních variant TRPV1 receptoru nelišily od hodnoty divokého typu receptoru (obr. 4.11.B, str. 80). Tyto výsledky mohou znamenat, že napět'ová citlivost v přítomnosti navázaného kapsaicinu je zprostředkována jinými rezidui než ve stavu bez navázaného kapsaicinu. Z hodnot  $V_{1/2}$  mutantů argininu v pozici 557, který je jediným reziduem s pozitivním nábojem v S4 a je považován za hlavní součást napět'ového senzoru, je patrné, že lokalizace kladného náboje v této oblasti není v přítomnosti kapsaicinu nutná (hodnoty  $V_{1/2}$  u R557A, R557K jsou shodné s divokým typem receptoru: WT, obr. 4.11.B, str. 80). Na základě těchto výsledků je tedy patrné, že arginin 557 nemůže být jediným reziduem, který tvoří napět'ový senzor TRPV1 receptoru. Testováním jediného kladného zbytku R567 u TRPV3 receptoru v S4 helixu, který je na pozici homologní k R557 u TRPV1, jsme zjistili, že k napět'ové citlivosti kanálu nepřispívá.

Kromě R557 rezidua by mohla v rámci S4 helixu zprostředkovávat napět'ovou závislost také dvojice tyrosinů Y554 a Y555, a to prostřednictvím svých dipólových momentů (Bezanilla, 2008). Zjistili jsme, že na těchto dvou pozicích je tolerován jen fenylalanin, což zřejmě naznačuje úlohu aromatických reziduí v intramolekulárních interakcích, přičemž záměna za jiné aminokyselinové zbytky nevedla k funkční expresi TRPV1 kanálu.



**Obr. 4.11.: Napěťová závislost TRPV1 mutantů.** A, Reprezentativní záznamy membránových proudů z celých buněk transfekovaných divokým typem TRPV1 receptoru (WT) vyvolaných aplikací 100 ms napěťových skoků v rozmezí membránového potenciálu od -120 do +200 mV (horní záznam) v nepřítomnosti (bílé kolečko, kontrola) či od -120 do +140 mV v přítomnosti 10 μM kapsaicinu (černé kolečko). Mezi pokusy byly buňky udržovány na potenciálu -70 mV. B, Průměrné hodnoty napětí, při kterých vodivosti mutantních forem TRPV1 receptoru dosahují poloviny jejich maxima ( $V_{1/2}$ ) v kontrolních podmínkách extracelulárního roztoku (bílé sloupce) a v přítomnosti 10 μM kapsaicinu (černé sloupce). Každý sloupec reprezentuje průměrnou hodnotu  $\pm$  SEM vypočtenou nejméně ze čtyř nezávislých buněk; hvězdička značí významný rozdíl v hodnotách mezi WT a daným mutantem receptoru.

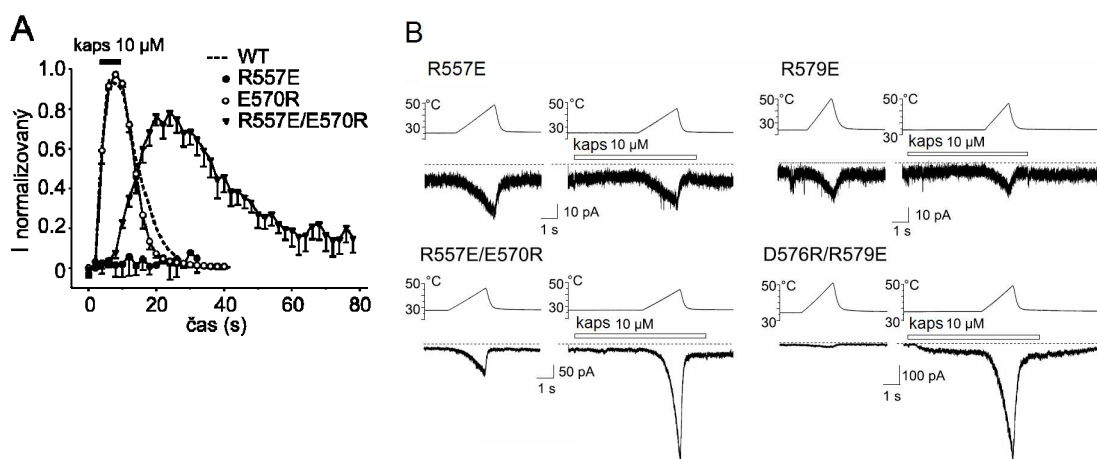
### Význam interakcí mezi dvojicemi aminokyselin R557/E570 a D576/R579.

Na základě experimentálních dat jsme navrhli funkční souvislost mezi R557 a E570 zbytky, které jsou v nejnovějším modelu struktury TRPV1 receptoru situovány blízko sebe a mohou tak vytvářet elektrostatické interakce (Brauchi et al., 2007, Fernandez-Ballester et al., 2008).

Abychom charakterizovali aktivační a deaktivaci kinetiku mutantů, kteří stěží odpovídají na kapsaicin při -70 mV, aplikovali jsme napěťový protokol sestávající se z lineárního zvýšení membránového potenciálu od -70 do +100 mV, trvajícího 500 ms a aplikovaného každé dvě sekundy. Mutanty jsme porovnávali grafickým vynesemím časového průběhu amplitud membránových proudů měřených na +90 mV před a po aplikaci 10 μM kapsaicinu (obr. 4.12.A, str. 81). Výměna kladného náboje za záporný v pozici R557 (R557E) vedla ke ztrátě funkční exprese. Pokud byl však současně zaměněn náboj na vzdálené pozici E570 za kladně nabitý argininový zbytek, dvojitý mutant R557E/E570R byl funkčně exprimován a v přítomnosti 10 μM kapsaicinu vykazoval signifikantní odpovědi na pozitivních membránových potenciálech, zpomalenou kinetiku aktivace a deaktivace, a silnou potenciaci teplem vyvolaných odpovědí na membránovém potenciálu -70 mV. Naše výsledky ukázaly, že mutant E570R je plně funkční (obr. 4.12.A), přímá elektrostatická interakce mezi R557 a E570 tedy není hlavní příčinou ztráty funkce u



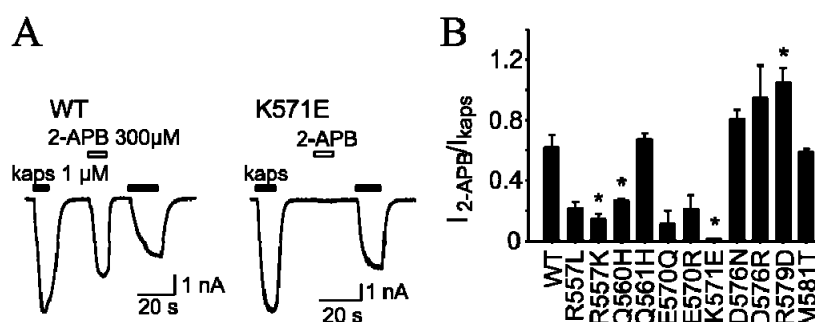
R557E mutace. Zvýšení pozitivního náboje v oblasti E570 však může ovlivnit rozložení elektrostatického náboje v S4-S5 oblasti a tím zvýšit míru jejího uplatnění ve vrátkování TRPV1 receptoru. Záměna E570 za glutamin (E570Q) nepoškodila hlavní parametry funkce receptoru, naproti tomu záměna za alanin vedla k významnému snížení napěťové i chemické citlivosti (obr. 4.11.B, str. 80) a lysin v této pozici neumožnil funkční expresi. Z těchto výsledků je vidět, že nejen polarita, ale také velikost či prostorová orientace daného aminokyselinového zbytku může být rozhodující pro správnou funkci kanálu. Podobně jako u R557E mutantu, záměna náboje u argininu v pozici 579 způsobila, že R579E konstrukt nebyl funkčně exprimován (obr. 4.12.). Kapsaicinem vyvolané proudy na pozitivním potenciálu i teplem indukovanou potenciací kapsaicinové odpovědi bylo možné částečně navrátit současnou záměnou nábojů u reziduí, které se podle homologního modelu (Brauchi et al., 2007) nacházejí ve vzájemné blízkosti: R557 s E570 ( $\sim 1.6 \text{ \AA}$ ) a D576 s R579 ( $\sim 3.3 \text{ \AA}$ ).



**Obr. 4.12.: Význam elektrostatických interakcí mezi dvojicemi R557/E570 a D576/R579.**  
*A, Časové záznamy průměrných membránových proudů z 3-5 buněk exprimujících daný typ mutantní varianty TRPV1 receptoru před a po aplikaci 10 μM kapsaicinu na membránovém potenciálu +90 mV. Záznam pro divoký typ receptoru (WT) je vyznačen přerušovanou čarou.*  
*B, Typické záznamy proudových odpovědí (dolní záznamy) z buněk exprimujících mutantní varianty TRPV1 receptorů vyvolaných aplikací lineárně se zvyšující teploty (horní záznamy) v kontrolním extracelulárním roztoku a v přítomnosti 10 μM kapsaicinu na membránovém potenciálu -70 mV. U R557E a R579E mutantů byla naměřena nespecifická odpověď na teplotní stimulaci.*

## Ztráta 2-APB citlivosti TRPV1 receptoru specifickou mutací

Chemickou citlivost testovaných mutantů jsme kromě kapsaicinu prověřovali i na 2-APB, který je společným aktivátorem TRPV1, TRPV2 a TRPV3 kanálů (Hu et al., 2004, Chung et al., 2004). Záměnou kladného náboje za záporný v poloze 571 (K571E) jsme získali funkčně zajímavý fenotyp TRPV1 kanálu, který byl ve všech sledovaných parametrech ( $V_{1/2}$ , kapsaicin,  $Q_{10}$ ) shodný s divokým typem receptoru s výjimkou citlivosti na 2-APB, která byla snížena více než 50x (obr. 4.13.).



**Obr. 4.13.: K571E mutace mění citlivost TRPV1 kanálu k 2-APB.** A, U mutantní varianty TRPV1 receptoru se záměněným nábojem v pozici 571 (K571E) došlo téměř úplné ztrátě citlivosti na 2-APB, elektrofyziologické proudy byly snímány z celých buněk udržovaných na konstantním membránovém potenciálu -70 mV. B, Odpovědi dalších mutantů testovaných na citlivost k 2-APB, mutace označené hvězdičkou označují statisticky významné změny proudových odpovědí ve srovnání s divokým typem receptoru, hodnoty amplitud vyvolaných 300  $\mu$ M 2-APB byly vztaženy k amplitudám vyvolaným 1  $\mu$ M kapsaicinem (kaps).

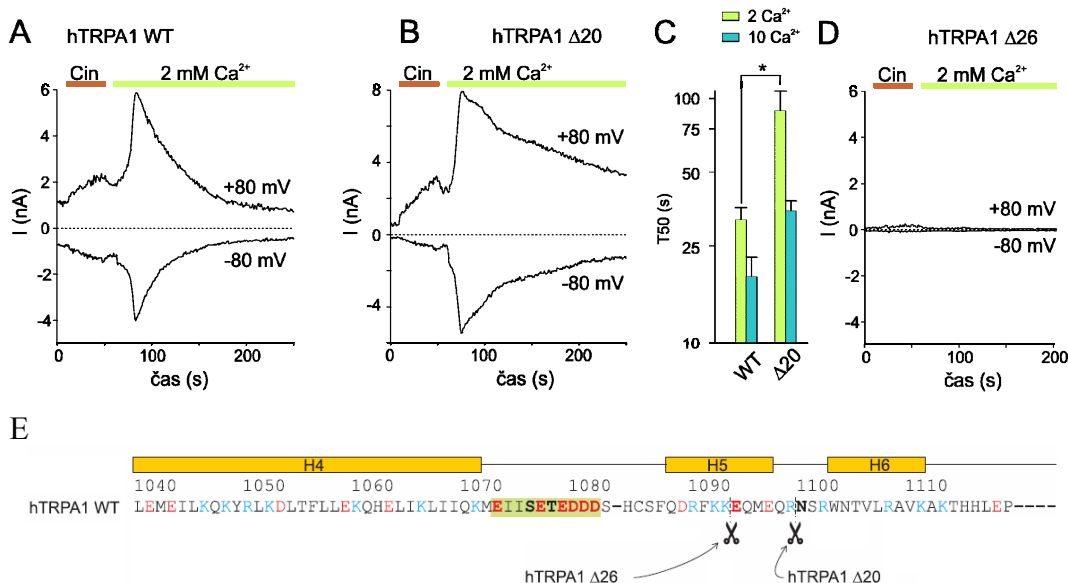
### 4.3. Úloha C-terminálního konce TRPA1 kanálu ve Ca<sup>2+</sup> aktivaci

Jedním z hlavních cílů předložené dizertační práce byla charakterizace C-terminální oblasti lidského TRPA1 receptoru se zaměřením na oblast bohatou na kyselá rezidua E<sup>1073</sup>I ISETEDDD<sup>1082</sup>, nacházející se mezi dvěma předposledními C-terminálními helixy H4-H5. Na základě homologie s funkčně významnou doménou vázajícími vápenaté ionty u napětím řízeného draselného kanálu (BK) (Yuan et al., 2010) jsme prověřovali hypotézu, zda TRPA1 může být modulován vápenatými ionty prostřednictvím této specifické domény na karboxylovém konci. Porovnávali jsme proto vliv zvýšené extracelulární koncentrace vápenatých iontů na membránové proudy vyvolané chemickou aktivací u konstruktů TRPA1 se zkráceným karboxylovým koncem a s neutralizovaným či změněným nábojem. Naše výsledky jednoznačně prokázaly důležitou funkci této kyselé oblasti ve vápníkové modulaci TRPA1 receptoru a naznačily, že se v modulaci může uplatňovat přímá vazba vápenatých iontů.

K publikaci (Sura et al., 2012) zabývající se zmíněnou problematikou jsem přispěla plánováním a přípravou řady mutantů a dvojmutantů hTRPA1 receptoru (např. S1083stop, Q1088stop, D1080N, D1082N a Δ20) a testováním povrchové exprese fluorescenčně značeného divokého receptoru a jeho mutantní formy D1080A.

#### **Distální část C-konce receptoru se účastní Ca<sup>2+</sup> inaktivace TRPA1**

První významný výsledek jsme získali po zkrácení karboxylového konce receptoru o 20 aminokyselin (hTRPA1Δ20). Došlo ke zpomalení Ca<sup>2+</sup>-závislé inaktivace kanálu (obr. 4.14.B,C), a to bez změny v aktivaci cinamalem či v míře Ca<sup>2+</sup> potenciace. Tento výsledek je v souladu s dřívější studií, která přinesla důkazy o tom, že inaktivace TRPA1 kanálu Ca<sup>2+</sup> probíhá nezávisle na jeho potenciaci (Wang et al., 2008). Tato studie prokázala, že na rozdíl od potenciace je k inaktivaci kanálu nezbytné, aby došlo k průchodu Ca<sup>2+</sup> aktivovaným kanálem, což znamená, že vazebné místo pro Ca<sup>2+</sup> ionty je dostupné blízkosti toku procházejících iontů.



**Obr. 4.14: Zkrácení C-konce TRPA1 receptoru odhalilo místo účastnící se  $\text{Ca}^{2+}$ -závislé inaktivace.** A, Časový záznam proudových odpovědí z celé buňky exprimující divoký typ lidského TRPA1 receptoru (WT) měřené na potenciálech +80 a -80 mV, nad proudovými odpověďmi je vyznačena délka aplikace 100  $\mu\text{M}$  cinamalu (Cin, hnědá čára) v nepřítomnosti extracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  s následnou aplikací extracelulárního roztoku obsahující 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (zelená čára). Shodný protokol jako v případě A, byl použit i pro mutantní varianty TRPA1 receptoru se zkrácenými C-konci o 20 aminokyselin (B.) a 26 aminokyselin (D.). C, Průměrná doba inaktivace ( $T_{50}$  – doba za kterou inhibice dosáhne poloviny maximální proudové odpovědi vyvolané  $\text{Ca}^{2+}$ -indukovanou potenciací odpovědi na cinamal) vyvolaná 2 či 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  u WT a zkrácené varianty (hTRPA1 $\Delta$ 20) TRPA1 receptoru, uvedené hodnoty představují průměrné hodnoty  $\pm$  SEM u nejméně 6 buněk WT receptoru a nejméně 3 buněk TRPA1 $\Delta$ 20, hvězdička značí významný pokles rychlosti  $\text{Ca}^{2+}$ -závislé inaktivace hTRPA1 $\Delta$ 20 mutantu ve srovnání s WT v přítomnosti roztoku obsahujícího 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . D, Mutantní forma receptoru se zkráceným C-koncem 26 reziduí ( $\Delta$ 26) neodpovídá na testované stimuly. E, Sekvence distální části C-konce lidské varianty WT TRPA1 s predikcí sekundární struktury, v sekvenci jsou obsaženy tři helixy H4, H5 a H6 (žluté obdélníky), oblast bohatá na kyselá rezidua je zvýrazněna zeleně, nůžky znázorňují místa zkrácení C-konce mutantů o 20 (hTRPA1 $\Delta$ 20) a 26 (hTRPA1 $\Delta$ 26) aminokyselin.

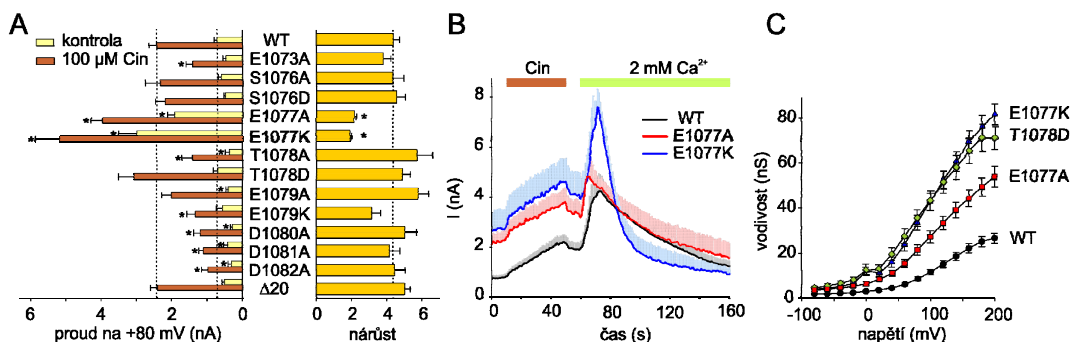
Po tomto zjištění nás zajímala funkce navazujícího cytoplazmatického H5 helixu (obr. 4.14.E). Přípravou a testováním receptoru s C-zkráceným koncem o 26 reziduí (hTRPA1 $\Delta$ 26), který na rozdíl od hTRPA1 $\Delta$ 20 neobsahoval polovinu navrženého H5 helixu, jsme nezískali měřitelné proudy ani na jeden z testovaných podnětů, což ukazuje na zásadní význam distálního konce v aktivaci nebo funkční expresi TRPA1 kanálu (obr. 4.14.D). Funkční analýza zkrácených variant (hTRPA1 $\Delta$ 26 a hTRPA1 $\Delta$ 20) tedy jednoznačně potvrdila, že distální konec receptoru představuje kritické modulační místo účastnící se  $\text{Ca}^{2+}$  inaktivace ankyrinového receptoru.

## Význam kyselých reziduí v mechanismu $\text{Ca}^{2+}$ modulace TRPA1

Metodami bodové mutagenese jsme se podrobně zaměřili na distální část karboxylového konce TRPA1 receptoru situovanou mezi H4 a H5 helixem ( $\text{E}^{1073}\text{I I S E T E D D D}^{1082}$ ), která je bohatá na kyselé aminokyseliny a vykazuje homologii s doménami, které představují vazebné místo pro vápenaté ionty u některých jiných iontových kanálů. Neutralizace záporně nabitého rezidua E1077 (E1077A) či záměna jeho náboje za kladný (E1077K) vyvolala konstitutivní aktivitu kanálů, signifikantně zvýšila amplitudy odpovědí na pozitivních membránových potenciálech a posunula práh pro napětřovou aktivaci k méně depolarizujícím hodnotám (obr. 4.15., str. 86). Bazální aktivita byla zřejmě příčinou toho, že u obou mutantů bylo pozorováno statisticky významné snížení míry potenciace cinamalové odpovědi extracelulárním vápníkem. Membránové proudy v buňkách exprimujících mutant se zaměněným nábojem (E1077K) na rozdíl od E1077A mutantu vykazovaly po přidání 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  zvýšenou rychlost inaktivace odpovědi vyvolaných cinamalem (obr. 4.15.B, str. 86). Jednou z možných interpretací těchto výsledků z hlediska možné vazby  $\text{Ca}^{2+}$  je vnesení kladného náboje na pozici 1077, které by mohlo simulovat přítomnost kladně nabitých iontů vápníku.

Uvnitř studované acidické oblasti jsme predikční analýzou odhalili konsensuální fosforylační motiv ( $\text{E}^{1073}\text{I I S E T E}^{1079}$ ) pro kaseinkinázu 2. Vzhledem k tomu, že pro podobný cytoplazmatický motiv byla prokázána úloha v řízení povrchové exprese příbuzných TRPP2 a TRPV4 iontových kanálů (Kottgen et al., 2005), vyšetřovali jsme možnost, že senzitivizující efekt mutantů E1077A a E1077K by mohl být odrazem jejich konstitutivně aktivního fenotypu díky zvýšené expresi funkčních kanálů na povrchu buněk. Testováním nefosforylovatelných variant S1076A, T1078A a mutantů S1076D a T1078D mimikujících fosforylaci jsme však očekávanou změnu ve fenotypu nepozorovali. Naopak u rezidua T1078A byla změna opačná, tj. pozorovali jsme pokles proudových odpovědí na depolarizační napětí i odpovědi na cinamal. Kromě E1077A mutantu se neutralizované formy receptoru (E1073A, S1076A, T1078A a E1079A) v rámci možného fosforylačního motivu projevovaly menšími či shodnými odpověďmi ve srovnání s divokým typem receptoru (obr. 4.15.A, str. 86). Domníváme se tedy, že popsané funkční rozdíly mutantů nejsou způsobeny změnou počtu receptorů v plazmatické membráně vlivem

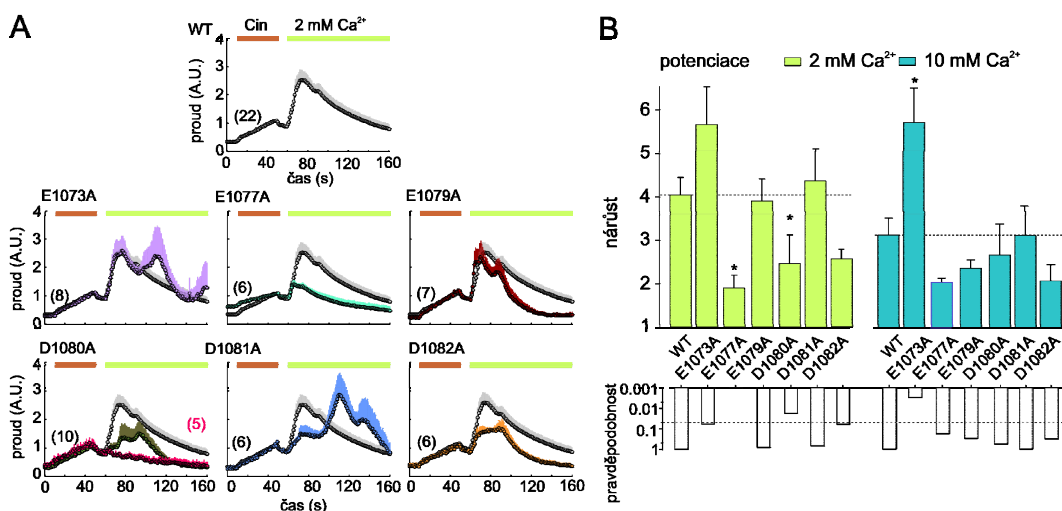
aktivity kaseinkinázy 2, ale jsou spíše důsledkem sterické či lokální změny TRPA1 proteinu.



**Obr. 4.15.: Mutace reziduí v C-terminální doméně mění citlivost TRPA1 kanálu na depolarizační napětí a cinamal.** A, Levý sloupec znázorňuje srovnání průměrných hodnot proudových odpovědí mutantních variant TRPA1 receptoru při +80 mV (kontrola - žluté sloupce) a po 40 s aplikaci 100  $\mu\text{M}$  cinamalu s divokým typem receptoru (WT); pravý sloupec znázorňuje relativní hodnoty nárůstu odpovědi v přítomnosti cinamalu na +80 mV, hodnoty představují průměr  $\pm$  SEM, svislé přerušované čáry jsou hodnoty pro WT, hvězdička představuje významné rozdíly mezi mutanty a WT. B, Průměrné hodnoty proudových odpovědí WT a mutantů (E1077A/K) měřených na +80 mV, mutanti se vyznačují bazální aktivitou, odlišnou rychlostí a velikostí  $\text{Ca}^{2+}$ -závislé inhibice receptoru, grafy představují průměrné hodnoty  $\pm$  SEM pro nejméně šest buněk. C, Posun vodivostně napěťové závislosti mutantních forem receptoru k méně depolarizujícímu napětí, hodnoty byly odečteny v místě ustáleného stavu I-V závislosti měřené po 20 mV skocích v rozmezí -80 do +200 mV, každá křivka byla získána nejméně z 8 buněk a představuje průměrnou hodnotu  $\pm$  SEM.

### Aminokyseliny D1080 , D1081 a D1082 se účastní $\text{Ca}^{2+}$ -indukované potenciace TRPA1

Postupnou neutralizací třech sousedních zbytků kyseliny asparagové jsme získali podobné fenotypy receptorů, které neměly poškozenou citlivost na cinamal, ale jejich kinetika  $\text{Ca}^{2+}$  potenciace byla dramaticky změněna. Nepřítomnost záporného náboje v této oblasti způsobila zpoždění a zpomalení rychlosti nástupu potenciace a snížení celkové míry potenciace (obr. 4.16., str. 87). Nejvýznamnější účinek mutace byl pozorován u konstruktu D1080A, u kterého v přítomnosti 2 mM extracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  polovina testovaných buněk nevykazovala žádnou potenciaci. Přidáním intracelulárního vápníku v koncentraci 100  $\mu\text{M}$  nedošlo v porovnání s divokým typem receptoru k zásadní změně míry potenciace, což vypovídá o tom, že reziduum D1080 ovlivňuje afinitu TRPA1 k vápenatým iontům. Potenciace cinamalové odpovědi vápenatými ionty byla oproti divokému typu receptoru pozměněna také v případech D1081A a D1082A mutantů.



**Obr. 4.16.: Neutralizace kyselých reziduí poškozuje Ca<sup>2+</sup>-potenciaci odpovědi vyvolaných cinamalem.** A, Průměrné hodnoty membránových proudů TRPA1 kanálů vyvolané 40 s expozicí cinamalem (hnědá čára) a následným přidáním roztoku obsahující 2 mM Ca<sup>2+</sup> (zelená čára) na membránovém potenciálu +80 mV, čísla v závorkách značí počet naměřených buněk, odpovědi jsou normalizovány na maximální hodnotu proudu vyvolanou aktivací cinamalem, křivka WT receptoru je pro srovnání součástí grafů mutantních receptorů. B, potenciace cinamalem vyvolaných odpovědí vynesena jako nárůst amplitud proudových odpovědí ± SEM indukovaná 2 mM a 10 mM Ca<sup>2+</sup> roztokem, hvězdička značí významné rozdíly mezi hodnotami získanými pro WT (horizontální přerušovaná čára) a mutantním receptorem.

## Vysoce afinitní místo pro vápenaté ionty

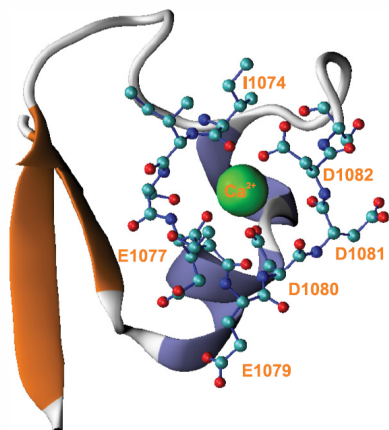
Zajímalo nás, zda studovaná oblast, bohatá na záporně nabitě aminokyseliny a významně modulující Ca<sup>2+</sup>-řizené děje TRPA1 receptoru, může představovat i vazebné místo pro vápenaté ionty.

Distální konec lidské varianty BK receptoru (Q<sup>885</sup>FLDQDDDD<sup>895</sup>) je stejně jako u TRPA1 receptoru bohatý na kyselé aminokyseliny a navíc je součástí vrátkovacího aparátu tohoto kanálu a má tedy funkci obdobnou té, kterou jsme pozorovali i pro daný úsek ankyrinového receptoru. Modelováním odpovídající části TRPA1 (I<sup>1074</sup>ISSETEDDD<sup>1083</sup>) za využití BK receptoru jako šablony a zadáním požadavků na hledání Ca<sup>2+</sup>-vazebné domény jsme získali pozitivní výsledek, který byl navíc v souladu s našimi experimentálními daty (obr. 4.17.).

```

hSlo BK 885 DTNVQFLDQD*DDDDPDTELY 904
hTRPA1 1070 QKMEI*I*SETE*EDDDSHCSFQD 1089
: : : : * * * . :

```



**Obr. 4.17.: Homologní model C-koncové oblasti TRPA1 receptoru na základě  $Ca^{2+}$ -vázací aktivací domény BK receptoru.**

Horní obrázek: Porovnání  $Ca^{2+}$ -vázací domény BK receptoru (hSlo) s C-koncovou doménou lidského TRPA1 receptoru, nejvíce konzervované aminokyseliny jsou označeny hvězdičkou. Dolní obrázek: Homologní model  $Ca^{2+}$ -vázacího místa TRPA1 receptoru na základě struktury BK receptoru jako templátu (BK/TRPA1 chiméra).

Získaný homologní model jsme podrobili molekulárně dynamické simulaci vazby  $Ca^{2+}$  ve sledovaném úseku deseti aminokyselin. Na základě simulace byla jako kritická místa interakce receptoru s  $Ca^{2+}$  označena rezidua D1080 a D1082. Další dvě rezidua (I1074 a E1077) byla v kontaktu s vápníkem přes karbonylový kyslík jejich hlavního řetězce. Zásadní význam aspartátů (D1080, D1082) byl potvrzen také další simulací zaměřenou na vliv mutantních forem na stabilitu vazby s  $Ca^{2+}$ , která se v případě D1080A a D1082A rozpadla.



## 5. DISKUZE

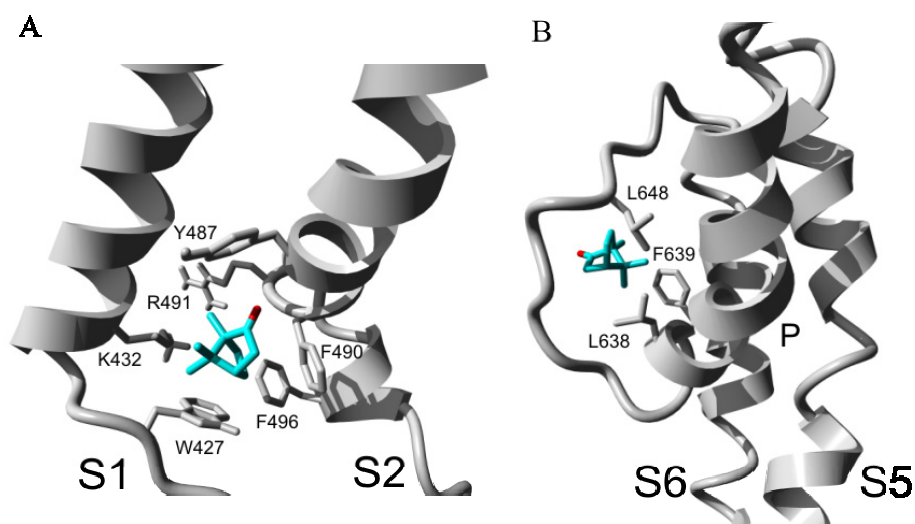
### 5.1. Mechanismus účinku kafru na TRPV1 kanál

V roce 2005 byla vůbec poprvé popsána schopnost kafru aktivovat a silně desenzitizovat TRPV1 kanál (Xu et al., 2005). V naší studii (Marsakova et al., 2012) jsme navázali na výsledky této původní práce a zabývali jsme se podrobným studiem molekulární podstaty modulace TRPV1 receptoru kafrem, jako jednou z možných příčin analgetických vlastností této látky, která se v tradiční medicíně využívá od nepaměti. Kromě vaniloidního receptoru podtypu 1, na nějž kafr působí jako částečný agonista, aktivuje kafr i další zástupce teplotně citlivých TRP kanálů, jako jsou teplem aktivovaný TRPV3 či chladem aktivovaný TRPM8 kanál, a naopak inhibuje jediného zástupce ankyrinové podrodiny TRP iontových kanálů TRPA1. Při hledání odpovědi na otázku, jakým mechanismem kafr moduluje TRPV1 kanál a které strukturní části receptoru jsou za to zodpovědné, jsme zvolili porovnání kinetických vlastností kafrových odpovědí s odpověďmi dobře popsaného typického agonisty kapsaicinu. Podrobně jsme charakterizovali účinek kafru v interakci s dalšími aktivátory TRPV1, jako jsou zvýšená teplota, snížené pH a depolarizující napětí.

#### **Pravděpodobná místa interakce kafru s TRPV1**

Naše výsledky podpořily hypotézu o působení kafru prostřednictvím pórového helixu. Tuto představu podporuje i predikce vazebného místa pro kafr metodou počítačového modelování. Jedno ze dvou nejpravděpodobnějších míst vazby kafru na TRPV1 byla právě oblast selektivního filtru (L638, F639) s leucinem v poloze 648 na sousední kličce mezi pórovým helixem a S6 doménou (obr. 5.1.B, str. 90). Uvedené výsledky z dokovacího experimentu byly získány s využitím lidské varianty receptoru jako templátu (Fernandez-Ballester et al., 2008), neboť je to v současnosti nejpřesnější model struktury vaniloidního receptoru. Shodných výsledků bylo však dosaženo i při použití krysí varianty receptoru (Brauchi et al., 2007). Dokovací experimenty tak poskytly podpůrné informace o tom, že by se kafr mohl přímo vázat do oblasti selektivního filtru kanálu. Tuto představu podporuje i částečně blokující efekt kafru, který byl pozorovatelný na elektrofyzilogickém

záznamu jako částečný návrat proudu po odmytí kafru (obr. 4.3.b znázorněně šipkou). Druhé ze dvou nejpravděpodobnějších predikovaných míst vazby molekuly kafru na receptor je lokalizováno na intracelulární straně rozhraní receptoru s lipidy, a to prostřednictvím interakcí aminokyselin na S1 (W427, K432) a S2 helixu (Y487, F490, R491, F496) (obr. 5.1.A). Tuto variantu vazebného místa jsme však dále experimentálně neověřovali a je otevřena pro další studie.



**Obr. 5.1.: Predikce vazebného místa pro kafr na TRPV1 receptoru.** A, První predikci určené vazebné místo pro kafr je lokalizované na rozhraní lipidové vrstvy a intracelulární části transmembránové domény S1 a S2, strukturní odchylka modelu byla určena v rozmezí RMSD hodnot 1.513 Å–2.592 Å. B, Druhé pravděpodobné místo interakce kafru s TRPV1 receptorem je uvnitř selektivního filtru tvořeno interakcemi reziduí pórového helixu s postraními zbytky aminokyselin z S6 domény, strukturní odchylka modelu byla určena hodnotami RMSD 0.965 Å–2.529 Å; jako templát byl použit model lidské varianty TRPV1 receptoru (Fernandez-Ballester et al., 2008). Detaily dokovacího experimentu jsou uvedeny v publikaci Marsakova et al., 2012, která je součástí příloh (viz kapitola 9).

## Kafrová modulace receptoru prostřednictvím PLC a PIP<sub>2</sub>

Ve srovnání s jinými agonisty TRPV1 receptoru má kafr nižší lipofilicitu ( $\log P = 2.2$  vs. kapsaicin  $\log P = 3.8$ ) a lze tedy předpokládat i pomalejší rychlost difúze do membrány (Ursu et al., 2010). Na úrovni receptoru se však účinek kafru projevuje rychlým nástupem aktivace, deaktivace a potenciace receptoru. Z tohoto důvodu nelze předpokládat, že modulace TRPV1 kanálu je odrazem bezprostředních změn fyzikálních vlastností plazmatické membrány, ale především výsledkem specifických interakcí této látky s receptorem. Pozorované změny na úrovni membrány mohou však zásadním způsobem souviset se strukturní změnou receptoru po aktivaci iontového kanálu.

Pomocí poměrového měření intracelulárního vápníku (data nejsou ukázána) jsme zjistili, že aktivace kafrem je ve srovnání s aktivací 1  $\mu$ M kapsaicinem doprovázena významně menším vtokem vápníku do buňky ( $\sim 50$  % maximální hodnoty vyvolané kapsaicinem), ale přesto je takovýto vtok schopný vyvolat aktivaci PLC dependentní kaskády. Výsledky fluorescenčních pokusů však ukazují, že aktivita PLC nemá zásadní vliv na kafrem indukovaný fenomén (obr 4.8., str. 75). Popsaný inhibiční účinek U73122 na FRET signál (výrazný pokles signálu při jeho aplikaci, obr. 4.8.A, str. 75) navíc podporuje nedávnou práci (Klein et al., 2011), která prokázala, že široce používaný tzv. inhibitor U73122 aktivuje některé podtypy PLC prostřednictvím kovalentní modifikace cysteinů. PLC $\delta$  touto látkou však ovlivněna není, což podporuje naši hypotézu, že účinek zvýšené citlivosti FRET signálu v přítomnosti kafru po aplikaci U73122 není způsoben nespecifickým účinkem na PH domény fluorescenčních sond, jejichž sekvence odpovídá prvním 174 N-koncovým aminokyselinám PLC $\delta$ .

Původní studie zabývající se účinky kafru ukázala, že membránové proudy zprostředkované aktivací TRPV1, vyvolané nízkými koncentracemi kafru, mohou být potencovány sloučeninami vznikajícími v místě zánětu, resp. aktivací receptorů spřažených s PLC dráhou (např. muskarinových receptorů M1, bradykininových receptorů) (Xu et al., 2005). Výsledkem aktivace těchto drah je hydrolýza PIP<sub>2</sub> a aktivace PKC. Oba tyto děje přispívají k potenciaci odpovědi i za relativně nízkých koncentrací kapsaicinu ( $\sim 20$  nM) a směřují k fosforylaci klíčového rezidua na vaniloidním TRPV1 receptoru serinu 502. Tento potenciační účinek závisí na přítomnosti zakotvujícího proteinu AKAP79/150, který tvoří signalizační komplex s PKC, PKA a kalcineurinem (Jeske et al., 2011). AKAP se váže se k C-terminálnímu konci TRPV1 receptoru (K735-N748) (Zhang et al., 2008).

Vratná redistribuce PIP<sub>2</sub> na vnitřním listu plazmatické membrány, kterou jsme pozorovali po extracelulární aplikaci kafru, může způsobovat různý stupeň asociace AKAP proteinu s receptorem, který kontroluje fosforylaci TRPV1 receptoru PKA a PKC (Jeske et al., 2011). V tomto ohledu je zajímavé, že jiné dva kafrem aktivovatelné TRP kanály TRPV3 (Doerner et al., 2011) a TRPM8 (Rohacs et al., 2005) jsou kriticky regulované PIP<sub>2</sub>.

## Účinek kafru na ostatní TRP kanály

Farmakologický účinek kafru na různé TRP iontové kanály je velmi rozmanitý. Kafr kromě aktivace a desenzitizace TRPV1 aktivuje ještě další dvě savčí varianty TRP kanálů exprimované na primárních nociceptorech či keratinocytech. Je agonistou teplem aktivovaného TRPV3 receptoru (Moqrich et al., 2005) a částečným agonistou chladem aktivovaného TRPM8 (Macpherson et al., 2006, Vogt-Eisele et al., 2007). Naopak kafr inhibuje chladem aktivovaného zástupce ankyrinové podskupiny TRP kanálů TRPA1 (Xu et al., 2005). Za plného agonistu je kafr považován jen u TRPV3 receptoru, u kterého opakovaná aplikace kafru má dokonce senzitivizující efekt (Moqrich et al., 2005). Pór TRPV3 kanálu se od póru TRPV1 liší o šest aminokyselin. Uvažovali jsme, že mutace genu TRPV1 receptoru N628G a L630F, kterými se pór nejvíce odlišuje od póru TRPV3, by mohly zvýšit citlivosti receptoru ke kafru. Zjistili jsme však, že oba mutantní konstrukty TRPV1 prokazovaly fenotyp divokého typu receptoru a neprojevovaly se pozměněnou kastrovou citlivostí. Je tedy možné, že kastrová citlivost TRPV3 receptoru spočívá mimo selektivní filtr a je determinována jinými oblastmi receptoru. Výsledky předložené dizertační práce naznačily další možnosti, které by mohly vést k identifikaci interakčního místa a domén důležitých pro aktivaci kaftrem. Jednou z možností, které z našich výsledků vyplývají je výměna celých pórových helixů mezi TRPV1 a TRPV3 receptory.

Z hlediska molekulární podstaty sensorických účinků kafru *in vivo* se jeví být nejpravděpodobnější společné působení čtyř TRP kanálů citlivých na kafr: TRPV3, TRPA1, TRPV1 a TRPM8. Na rozdíl od TRPV3 receptoru, který je exprimován na keratinocytech, tři zástupci TRP receptorů jsou společně exprimováni na nociceptorech. Prostřednictvím aktivace vaniloidního receptoru TRPV1 vyvolává kafr rychlé odpovědi následované silnou akutní desenzitizací a tachyfyfaxí, což by společně s inhibicí TRPA1 mohlo vysvětlit příčinu jeho analgetického účinku a pocitu tepla, kterým je aplikace kafru doprovázena (= aktivace TRPV1) (Green, 1990). Na kůži kafr vyvolává příjemný pocit tepla, který je však doprovázen následným pocitem chladu, což by mohlo být důsledkem aktivace právě mentolového receptoru TRPM8. Dosud nepublikované výsledky prokazují, že kafr účinně moduluje také některé K<sup>+</sup> kanály, které zásadním způsobem regulují excitabilitu sensorických neuronů. Je tedy možné, že fyziologický účinek kafru je

zprostředkován nejen TRP receptory, ale zároveň závisí také na typu iontových kanálů, které jsou s nimi společně exprimovány.

## **Účinek kafru na TRP ortology**

Předmětem studia řady laboratoří je otázka odlišné kastrové citlivosti u TRP ortologů. Většina dat uvedených v naší publikaci byla získána experimenty na kryší variantě vaniloidního receptoru, u které byl kafr popsán jako částečný agonista (Xu et al., 2005) (naše data ~ 30 % maximální odpovědi na 10  $\mu$ M kapsaicin). S překvapením jsme zjistili, že kafr téměř neaktivuje lidský ortolog TRPV1 receptoru (obr. 4.1.D, str. 67; ~ 1,3 % z maximální odpovědi na 10  $\mu$ M kapsaicin). Stejně jako u kryší varianty je však schopen potencovat a deaktivovat kapsaicinem vyvolané odpovědi. Jedním z dalších popsáných účinků (a kontroverzí) je schopnost kafru inhibovat lidskou variantu a aktivovat hmyzí varianty TRPA1 receptoru (Kohno et al., 2010). Kromě citlivosti na kafr se tyto různé varianty TRPA1 receptoru liší také v teplotní citlivosti. Na rozdíl od chladem aktivované savčí varianty je hmyzí forma receptoru aktivovaná teplem (> 34 °C). Nepochybně jsou tedy determinanty TRP receptorů určující kastrovou citlivost, ale i citlivost teplotní, evolučně konzervované.

Výsledky předložené dizertační práce prokazují důležitou úlohu vnější pórové domény v řízení vrátkování TRPV1 iontového kanálu kafrem. Získaná data navíc podporují současnou představu o tom, že pórová helikální doména představuje univerzální vrátkovací element TRPV1 kanálu i pro další aktivační modality, jako jsou napětí, teplo a protony. Výsledky našich experimentů naznačují, že kafr může navíc přímo interagovat s vrátkovacím mechanismem TRPV1 kanálu. V souhrnu, výsledky této části dizertační práce mohou přispět k bližšímu objasnění molekulárních mechanismů, kterými kafr moduluje teplotní citlivosti u lidí a může pomoci odhalit kritické determinanty pro nesporné pozitivní účinky této přírodní látky.

## 5.2. Funkční a strukturální úloha S4-S5 oblasti u teplem aktivovaných TRPV kanálů

Na základě topologického uspořádání jsou TRP iontové kanály řazeny mezi napětím aktivované iontové kanály (Latorre et al., 2007), jejich citlivost ke změnám membránového napětí je však o řád nižší oproti  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  a  $Na^+$  kanálům; některé TRP kanály jsou aktivovány až silně depolarizujícím napětím. Vaniloidní receptor typu 1 může být kromě kapsaicinu ( $EC_{50} = 0.5 \mu M$ ), protonů ( $pH < 6.8$ ), tepla ( $> 43 \text{ }^\circ C$ ) či 2-APB ( $EC_{50} = 197 \mu M$ ) aktivován depolarizujícím napětím ( $> +60 \text{ mV}$ ). Kapsaicinem vyvolaný proud TRPV1 kanálu je zvýšen teplem nebo roztokem o nižším pH (Tominaga et al., 1998), zatímco teplo, protony a kapsaicin zvyšují citlivost TRPV1 kanálu na depolarizační napětí (Brauchi et al., 2004, Matta and Ahern, 2007, Voets et al., 2004). Změny membránového potenciálu se tak mohou v přítomnosti jiných aktivátorů účinně uplatňovat v modulaci aktivačního prahu neuronů i za fyziologických podmínek.

Při hledání napěťového senzoru TRPV1 receptoru jsme se zabývali otázkou, do jaké míry by mohl být mechanismus transdukce napěťového podnětu analogický se strukturálně příbuznými  $K^+$  kanály, u kterých se předpokládá, že napěťový senzor je vytvářen kladně nabitými rezidui uvnitř S1-S4 modulu. Pro  $K^+$  a  $Na^+$  iontové kanály bylo prokázáno, že konformační změny v oblasti napěťového senzoru vyvolané změnou membránového potenciálu se uplatňují prostřednictvím oblasti mezi čtvrtým a pátým transmembránovým segmentem (S4-S5 oblast), jež bezprostředně předává signál do pórové oblasti S6 domény, která řídí vrátkování iontového kanálu (Bezanilla, 2008, Villalba-Galea et al., 2008).

V naší studii jsme se zaměřili na intracelulární oblast S4-S5 helixů, která je mezi vaniloidními zástupci TRP receptorů bohatá na konzervované pozitivně nabitě aminokyseliny. Kladně nabitá rezidua v této oblasti byla v nedávné studii identifikována jako součást napěťového senzoru u TRPM8 receptoru (Voets et al., 2007). S4-S5 oblast je však také hlavní součástí vrátkovacího mechanismu řady homologních napětím aktivovaných kanálů a zřejmě také TRPM8 kanálu (Catterall, 2010, Voets et al., 2007), což znemožňuje experimentálně oddělit od sebe místa důležitá jako napěťový senzor od obecně důležitých domén, jako je součást

vrátkovacího systému a vazebné místo pro agonistu (Boukalova et al., 2010, Voets et al., 2007).

## **Napěťový senzor TRPV1 receptoru**

Napětí je významným modulátorem teplotně citlivých TRP kanálů, který sám o sobě však není schopen maximální aktivace těchto kanálů (Matta et al., 2007). Na rozdíl od relativně dobře prozkoumaného mechanismu napěťové aktivace u napětím řízených  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  a  $Na^+$  kanálů, u TRP kanálů je o tomto mechanismu aktivace známo jen velmi málo. Jako klasický napěťový senzor  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  a  $Na^+$  kanálů je považována oblast S1-S4 helixů každé ze čtyř homologních podjednotek resp. zde přítomné nabitě aminokyselinové zbytky, které reagují na změnu membránového napětí svým přeorientováním. Změna ve strukturním uspořádání aminokyselinových zbytků je převedena S4-S5 klíčkou až k vrátkům kanálu. V rámci S1-S4 modulu jsou strukturně oddělena kyselá (S1-S3 helix) a bazická rezidua (S4 helix), přičemž v rámci S4 helixu jsou bazická rezidua (R a K) mezi sebou oddělena dvěma hydrofobními rezidui (Bezanilla, 2008). Tento tzv. S4 typ napěťového senzoru u TRPV receptorů není přítomen, neboť v S4 helixu je přítomen pouze jeden kladně nabitý aminokyselinový zbytek R557. Jediným zástupcem TRP iontových kanálů u kterého je napěťový senzor popsán je mentolový receptor. V případě TRPM8 receptoru zajišťují napěťovou citlivost dva kladně nabitě aminokyselinové zbytky v S4-S5 oblasti, která je mezi TRP receptory bohatá na kladně nabitá rezidua. Mutace R842A a K856A v této oblasti pozměnily nejen napěťovou, ale i teplotní a chemickou citlivost tohoto receptoru, což potvrdilo předpokládanou důležitou roli S4-S5 oblasti ve vrátkování TRPM8 kanálu (Voets et al., 2007). Podobná funkce některých aminokyselin v této oblasti byla navržena i u TRPV iontových kanálů (Myers et al., 2008, Xiao et al., 2008a).

## **Role aminokyselinových zbytků S4-S5 oblasti ve vrátkování TRPV1**

Jedním ze zcela konzervovaných reziduí v oblasti mezi S4 a S5 helixy vaniloidních receptorů je glycin. Mutace v této aminokyselině se u TRPV3 receptoru (G573S nebo G573C) vyskytuje přirozeně a je příčinou ztráty srsti a dermatitid u myši a krys (Asakawa et al., 2006). TRPV3 kanál s touto mutací je charakteristický spontánní aktivitou (Xiao et al., 2008b). Záměnou zmíněného konzervovaného glycinu za serin (G563S) u TRPV1 receptoru jsme získali obdobný konstitutivně

aktivní fenotyp jako u TRPV3. Kromě bazální aktivity byl G563S mutant typický velmi pomalou deaktivací kanálu, kterou bylo možné urychlit blokátorem otevřeného kanálu rutheniovou červení. Úloha konzervovaného glycinu by proto mohla spočívat ve flexibilním spojení S4 a S5 helixů a přímo souviset se změnami v rovnováze mezi otevřeným a zavřeným stavem kanálu. Tuto hypotézu podporuje také vysoká konzervovanost tohoto rezidua napříč teplotně citlivou podskupinou vaniloidních kanálů. Náhraza glycinu za méně flexibilní aminokyselinu pravděpodobně vede k poškození správného otevírání a zavírání u obou typů TRPV kanálů, stabilizuje jejich otevřený stav a vede k bazální aktivitě.

### **Ztráta 2-APB citlivosti TRPV1 receptoru specifickou mutací**

Významná funkce jediného rezidua K571E v chemické citlivosti TRPV1 receptoru nás vedla k přípravě a testování odpovídajících mutací pro TRPV2 a TRPV3 receptory (Hu et al., 2004, Chung et al., 2004). Po naměření proudových odpovědí homologních mutantů lidských variant TRPV2\_K527E a TRPV3\_K581E kanálů, jsme však s překvapením zjistili, že jejich citlivost k 2-APB byla na rozdíl od TRPV1\_K571E zachována. Ačkoli je tedy 2-APB společným aktivátorem uvedených vaniloidních receptorů, jeho vazebné místo, či způsob, jakým je informace o jeho vazbě předána k vrátkům těchto kanálů bude pravděpodobně spočívat v odlišných aminokyselinových zbytcích. Tuto teorii podporují i výsledky studie, která u lidského TRPV3 receptoru identifikovala specifický histidin, jehož záměna za asparagin (H426N) také selektivně poškodila citlivost na 2-APB (Hu et al., 2009). Existence uvedených reziduí, která specificky určují citlivost 2-APB jsou v souladu s představou, že různé strukturní části TRP receptorů jsou zodpovědné za zprostředkování aktivace různými typy podnětů a tyto části mohou být navzájem funkčně nezávislé. Kromě K571E byly ještě další dvě z testovaných mutací TRPV1 receptoru (R557K a Q560H) charakteristické významným poklesem 2-APB citlivosti (obr. 4.13.B, str. 82). Tato rezidua se také účastní aktivace (R557, Q560) a deaktivace (R557) kapsaicinem vyvolaných odpovědí (Boukalova et al., 2010), mohla by být proto součástí transdukční dráhy pro chemické podněty.

Na základě experimentálních dat předložené studie lze konstatovat, že mechanismy napěťové, teplotní a chemické citlivosti TRPV1, TRPV2 a TRPV3 kanálů jsou v rámci S4-S5 oblasti zprostředkovány jinými rezidui, a to i přesto, že je tato část receptorů mezi teplotně citlivými TRP kanály velice konzervovaná. Naše



studie navíc prokazuje, že transdukční dráha zprostředkovávající chemickou aktivaci TRPV1 receptoru sloučeninou 2-APB je oddělená od drah ostatních testovaných podnětů.

### 5.3. Úloha C-terminálního konce TRPA1 kanálu ve Ca<sup>2+</sup> aktivaci

Jediný zástupce ankyrinové podrodiny TRPA1 kanál je na vápník propustný neselektivní kationtový kanál, který je hojně exprimován v subpopulaci nociceptivních senzoričtých neuronů (Bautista et al., 2005, Story et al., 2003). Aktivace tohoto receptoru přímo vyvolává nociceptivní signalizaci, indukuje vasodilataci a neurogení zánět. TRPA1 je typický polymodální kanál, mezi jehož exogenní aktivátory patří celá řada iritantů včetně isothiokyanátů, cinamalu, allicinu, akroleinu a formaldehydu. Tento kanál aktivují také endogenní látky uvolňované při tkáňovém poškození či oxidativním stresem (např. prostaglandin J<sub>2</sub>, kyslíkové radikály a oxid dusnatý) (Chung et al., 2011). TRPA1 kanál se jako senzor endogenního tkáňového poškození a exogenního působení škodlivých látek podílí na mnoha patologických stavech, jako je chronická bolest či respirační a kardiovaskulární onemocnění (Geppetti et al., 2010, Chung et al., 2011, Pozsgai et al., 2010). Ankyrinový receptor je díky své aktivaci při teplotě nižší než 17 °C rovněž řazen mezi chladem aktivované kanály (Story et al., 2003) či mezi kanály aktivované depolarizací (> +100 mV).

Z fyziologického hlediska jsou nejdůležitějším aktivátorem TRPA1 kanálu samotné vápenaté ionty (Doerner et al., 2007, Zurborg et al., 2007), které v mikromolárních koncentracích ( $EC_{50} = 0.9-6 \mu\text{M}$ ) aktivují tento kanál z intracelulární strany (Doerner et al., 2007, Zurborg et al., 2007) a silně potencují chemické i napětím indukované odpovědi. Potenciace je většinou spojena s kompletní a nevratnou inaktivací kanálu, přičemž nástup potencované odpovědi i průběh inaktivace je urychlen při vyšších koncentracích vápníku (Wang et al., 2008). Podstata této z fyziologického hlediska velmi důležité Ca<sup>2+</sup> regulace TRPA1 receptoru je však na molekulární úrovni plná kontroverzí. V publikaci (Sura et al., 2012), která je součástí příloh (kapitola 9), jsme se zaměřili na studium funkce C-koncové konzervované oblasti receptoru, bohaté na kyselá rezidua

(E<sup>1073</sup>IISSETEDDD<sup>1082</sup>). Podařilo se nám prokázat její úlohu právě při Ca<sup>2+</sup> modulaci lidské varianty TRPA1 receptoru.

### **Distální část C-konce receptoru se účastní Ca<sup>2+</sup> inaktivace TRPA1**

Jako jediné dosud identifikované místo interakce vápenatých iontů s TRPA1 receptorem, které je zodpovědné za jeho aktivaci, bylo nalezeno na jeho N-terminálním konci, a to v rámci Ca<sup>2+</sup>-vázejícího motivu EF-hand (Doerner et al., 2007, Zurborg et al., 2007). Na základě nejnovější elektronové kryo-mikroskopické struktury TRPA1 kanálu je pravděpodobným místem dostupným pro Ca<sup>2+</sup> ionty procházející pórem také karboxylový konec receptoru, který v homotetramerickém uspořádání vytváří strukturu paralelní k plazmatické membráně a pomáhá utvářet vnitřní vestibul kanálu (Cvetkov et al., 2011). Na možný význam proximálního karboxylového konce ve vrátkování ankyrinového receptoru („S6-H1 modul“) upozornily již dříve publikované práce naší laboratoře (Benedikt et al., 2009, Samad et al., 2011). V rámci mé disertační práce se nám podařilo potvrdit také význam distální části C-konce, respektive roli posledních 20 aminokyselin tvořících H6 helix jako nezbytné součásti Ca<sup>2+</sup>-závislého inaktivačního mechanismu ankyrinového receptoru.

### **Význam kyselých reziduí v mechanismu Ca<sup>2+</sup> modulace TRPA1**

U mutantu T1078D jsme podobně jako u E1077K pozorovali signifikantní posun v proudově-napěťové křivce směrem k nižším hodnotám depolarizačního membránového potenciálu. Toto zjištění může znamenat, že aktivita TRPA1 kanálu může být řízena napětím prostřednictvím distální části karboxylového konce a napěťovým senzorem nebo S6-H1 modulem. Ve srovnání s draselnými kanály otevíranými depolarizací je napěťová závislost TRPA1 velmi slabá (Karashima et al., 2009). Předpokládá se, že napěťový senzor, který dosud u TRPA1 nebyl identifikován, není s největší pravděpodobností situován v oblasti S4 helixu, neboť tento úsek neobsahuje nabitě aminokyseliny. Nedávná studie (Kremeyer et al., 2010) upozornila na možnou úlohu oblasti S4-S5 v modulaci TRPA1 vápenatými ionty. U lidského TRPA1 receptoru byl v této oblasti identifikován asparagin N855, po jehož záměně za serin došlo při klidovém membránovém potenciálu k pětinasobnému zvýšení proudové odpovědi na cinamal, mentol a endogenní aldehyd 4-hydroxynonenal. Při odstranění vápenatých iontů z extracelulárního

prostředí byla u divokého typu i u mutantu N855S posunuta napětěová citlivost přibližně o +20 mV, což odpovídá senzitivizujícímu vlivu  $\text{Ca}^{2+}$ . Toto chování odpovídá alosterickému modelu aktivace TRPA1 kanálu dvěma odlišnými podněty: vápenatými ionty a depolarizujícím napětím (Salazar et al., 2011). U N855S mutantu byl však navíc v nepřítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  pozorován pokles kooperativity napětěově závislé aktivace, což autoři interpretovali jako možný účinek  $\text{Ca}^{2+}$  na regulaci aktivity kanálu prostřednictvím S4 domény. Podle predikce membránové topologie TRPA1 se však N855 nenachází v S4 doméně, ale v oblasti mezi doménami S4 a S5, je tedy možné, že mutace N855S destabilizuje zavřenou konformaci kanálu zodpovědnou za více účinků ve vrátkování kanálu (Smith-Maxwell et al., 1998) a je konzistentní s navrženou funkční úlohou S4-S5 oblasti ve vrátkování i jiných teplotně citlivých kanálů (Boukalova et al., 2010, Brauchi et al., 2007, Voets et al., 2007).

### **Aminokyseliny D1080 , D1081 a D1082 se účastní $\text{Ca}^{2+}$ -indukované potenciace TRPA1**

Abychom se přesvědčili, že identifikované fenotypy mutantních receptorů nejsou výsledkem změn míry exprese receptorů v plazmatické membráně, porovnávali jsme odpovědi na současnou aplikaci dvojice aktivátorů (cinamal a depolarizující napětí; depolarizační napětí a určená extracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ ), což odhalilo značné rozdíly v kapacitě křížové sensitizace a prokázalo schopnost i méně potencovaných mutantů vyvolat plnou odpověď. Někteří mutanti navíc vykazovali specificky pozměněnou odpověď na určitý podnět - např. proudově-napětěová závislost T1078D byla kineticky odlišná od divokého typu receptoru. Vyloučili jsme také, že potenciální fosforylační oblast pro kaseinkinázu 2 ovlivňuje množství funkčních receptorů v membráně. Pro nejvíce ovlivněný D1080A mutant jsme porovnávali povrchovou expresi s divokým typem receptoru, a to prostřednictvím intenzitních histogramů fluorescence. Nemůžeme však vyloučit, že některé ze studovaných aminokyselin se neúčastní akutních změn počtu TRPA1 kanálů v membráně po jejich chemické aktivaci (Schmidt et al., 2009). Ve zmíněné publikaci z roku 2009 byl popsán nárůst počtu TRPA1 receptorů na membráně sensorických neuronů indukovaný aplikací aktivátoru TRPA1 receptoru z hořčičného oleje (AITC). Jedná se zcela jistě o velmi komplexní a fyziologicky velmi důležitý mechanismus, který zatím však nebyl detailně prozkoumán.

## Vysoce afinitní místo pro vápenaté ionty

Věrohodnost získaného modelu, který je uveden ve výsledcích (obr. 4.17., str. 88), podporuje skutečnost, že jsme u elektrofyziologických odpovědí jednotlivých mutantů E1073, E1077, D1080, D1081 a D1082 nepozorovali změnu odpovědi na cinamal, ale rezidua se ukázala být mnohem důležitější při modulaci  $\text{Ca}^{2+}$ . S cílem podpořit význam identifikovaných aminokyselinových zbytků uvnitř studované oblasti jsme provedli elektrofyziologická měření mutantů, které měly neutralizované dvojice nábojů: E1077Q/E1079Q, E1079Q/D1081N a D1080N/D1082N. Ani jedna z těchto variant mutantů však neprodukovala měřitelný proud, a to na žádné testované podněty.

Tyto experimenty společně s výše uvedenými vypovídají o strukturní důležitosti záporně nabitě domény karboxylového konce lidského ankyrinového receptoru. Předkládaná disertační práce tak přispěla k identifikaci specifické oblasti nezbytné pro správnou modulaci TRPA1 kanálu řízenou  $\text{Ca}^{2+}$  a napětím a rovněž jako pravděpodobné místo vazby  $\text{Ca}^{2+}$  iontů.

## 6. SOUHRN

### 6.1. Mechanismus účinku kafru na TRPV1 kanál

- A) Kafr aktivuje TRPV1 receptor koncentračně závislým způsobem s hodnotou  $EC_{50} \sim 5$  mM na membránovém potenciálu +70 mV. Amplitudy kafrové odpovědi dosahují  $23 \pm 22$  % a  $71 \pm 22$  % na -70 a +70 mV odpovědi TRPV1 na 10  $\mu$ M kapsaicin. Expozice 10 mM kafru po dobu 15 s vyvolá akutní nevratnou desenzitizaci TRPV1 kanálu charakterizovanou časovou konstantou  $T_{50} = 3.7$  s  $\pm$  1.6 na -70 mV, která je nezávislá na velikosti amplitudy.
- B) Rychlá kinetika aktivace, deaktivace kafrových odpovědí TRPV1 a úplná vratnost kafrém zprostředkované potenciace kapsaicinových odpovědí podporuje hypotézu, že kafr aktivuje TRPV1 kanál prostřednictvím přímé interakce. Účinek kafru na TRPV1 kanál výrazně vzroste synergistickým působením dalších modalit, jako je teplo, kapsaicin či depolarizační napětí. Membránové proudy zprostředkované TRPV1 kanálem vyvolané nízkým pH (pH = 6.8) jsou kafrém potencovány jen mírně.
- C) Kafrová citlivost TRPV1 kanálu je dána vnějším pórovým helixem situovaným mezi S5-S6 helixy, včetně T633 rezidua, který je nezbytný také pro aktivaci kanálu protony. Na základě našich výsledků se přikláníme k hypotéze, že pórový helix tvoří pohyblivou bariéru resp. univerzální vrátkovací element, který pod vlivem různých aktivátorů včetně kafru reguluje vstup iontů do buňky.

Dokovací experimenty ukázaly na dvě pravděpodobná místa interakce kafru s receptorem: oblast pórového helixu mezi S5-S6 (L638, L648 a F639) a oblast na rozhraní helixů S1-S2 (W427, K432, Y487, R491, F490 a F496). První predikované místo - vnější pór iontového kanálu - je v souladu s funkčním testováním této oblasti a představuje tak pravděpodobné místo interakce kafru s TRPV1 receptorem.

- D) Fluorescenční pokusy ukázaly, že kafr na intracelulární straně plazmatické membrány vyvolává změnu v distribuci PIP<sub>2</sub>. Tato změna je opačná (zvýšení dostupnosti) ve srovnání s efektem typického agonisty TRPV1 kanálu kapsaicinem (štěpení PIP<sub>2</sub>). Kafr indukuje koncentračně závislý, rychlý, vratný a opakovatelný nárůst FRET signálu nezávisle na přítomnosti receptorů a aktivitě PLC.

## 6.2. Funkční a strukturální úloha S4-S5 oblasti u teplem aktivovaných TRPV kanálů

- A) Záměnou některých nabitých aminokyselin (R557, E570, D576 a R579) v rámci S4-S5 oblasti došlo k poškození napěťové, chemické a teplotní citlivosti TRPV1 kanálu. Arginin 557 a aspartát 576 byly navrženy jako součást napěťového senzoru TRPV1 kanálu.

Mezi dvojicemi aminokyselin R557-E570 a D576-R579 existuje funkční interakce, která pravděpodobně není zprostředkována přímo elektrostatickou interakcí jejich nábojů.

Záměnou lysinu v poloze 571 za glutamát (K571E) došlo ke ztrátě citlivosti TRPV1 receptoru k molekule 2-APB.

M581T, G563S, R557A a R557K mutace způsobily poškození deaktivace TRPV1 kanálu, což vypovídá o roli těchto aminokyselin, resp. S4-S5 oblasti, v regulaci vrátkování.

- B) U mutantů TRPV2 (K529A) a TRPV3 (K581A) receptorů s homologní záměnou rezidua K571E u TRPV1 nebyla pozorována změna citlivosti vůči 2-APB. Ani záměny homologní k mutacím, které u TRPV1 vyvolaly změnu v teplotní citlivosti, nezměnily významným způsobem fenotyp TRPV2 a TRPV3 receptorů.

### 6.3. Úloha C-terminálního konce TRPA1 kanálu ve Ca<sup>2+</sup> aktivaci

- A) TRPA1 konstrukt se zkráceným C-koncem o 20 aminokyselin ( $\Delta 20$ ) byl charakteristický pomalejší inaktivací závisící na extracelulárním Ca<sup>2+</sup>. Druhý konstrukt zkrácený o dalších šest aminokyselin ( $\Delta 26$ ) již nevedl k funkční expresi kanálů a nebyly pozorovány proudové odpovědi ani na jeden z testovaných podnětů (depolarizační napětí, 100  $\mu$ M cinamal a roztok obsahující 2 mM Ca<sup>2+</sup>).
- B) Funkčním testováním TRPA1 konstruktů s mutacemi v oblasti distálního C-konce (E<sup>1073</sup>I ISETEDDD<sup>1082</sup>) se ukázalo, že přítomnost čtyř záporně nabitých reziduí E1077, D1080, D1081 a D1082 je nezbytná pro správný časový průběh a míru potenciace vyvolané vápníkem a napětím stejně jako inaktivace odpovědí vyvolaných cinamalem.
- C) Dva aminokyselinové zbytky aspartátu D1080 a D1082 byly na základě homologního modelu a počítačové simulace vazby vápníku do oblastí kyselých aminokyselin karboxylového konce navrženy jako místa interakce TRPA1 receptoru s ionty vápníku.

## 7. ZÁVĚR

Polymodální TRPV1 a TRPA1 iontové kanály jsou klíčovými molekulami, které na primárních sensorických neuronech zajišťují detekci podnětů, jež vyvolávají u člověka bolest a uplatňují se v mechanismech chemické, tepelné a mechanické nocicepce za fyziologických i patofyziologických podmínek. Při studiu těchto receptorů jsme získali nové poznatky, které mohou přispět k hlubšímu porozumění mechanismů chronických bolestivých stavů a mohou pomoci při cíleném hledání účinných látek pro jejich léčbu.

### 7.1. Mechanismus účinku kafru na TRPV1 kanál

Potvrdili jsme výchozí hypotézu, že kafr je částečným agonistou TRPV1 receptoru, jehož mechanismus působení je nezávislý na vazebném místě pro vanilloidy. Kafrová modulace TRPV1 receptoru je zprostředkována rychlou konformační změnou extracelulárního pórového helixu, která ovlivňuje rovnováhu aktivace iontového kanálu mezi otevřeným a zavřeným stavem. Pórový helix představuje pravděpodobně i místo interakce kafru s receptorem. Dalším možným místem interakce byla navržena oblast mezi transmembránovými doménami S1 a S2. Na modulaci kafrových odpovědí TRPV1 receptoru se může také podílet zvýšená dostupnost  $PIP_2$ , která byla v přítomnosti kafru experimentálně pozorována.

Závěrem lze říci, že se nám podařilo navrhnout molekulární mechanismus aktivace TRPV1 kanálu látkou s analgetickým účinkem, kterou představuje kafr. Získané poznatky o strukturní modulaci TRPV1 kanálu mohou přispět k poznání mechanismu, jakým kafr moduluje teplotní citlivost *in vivo*.



## 7.2. Funkční a strukturální úloha S4-S5 oblasti u teplem aktivovaných TRPV kanálů

Funkčním testováním nabitých aminokyselin v intracelulární oblasti S4-S5 helixů byly identifikovány čtyři nabité aminokyseliny (R557, E570, D576 a R579), které se účastní napěťové, chemické a teplotní aktivace TRPV1 kanálu. Navzdory vysoké konzervovanosti S4-S5 oblasti mezi TRPV1, TRPV2 a TRPV3 receptory není význam jejich homologních aminokyselin pro funkci těchto kanálů shodný. Neočekávaným zjištěním bylo, že chemická citlivost TRPV1 kanálu k 2-APB je dána jediným aminokyselinovým zbytkem v této oblasti, a to lysinem 571.

## 7.3. Úloha C-terminálního konce TRPA1 kanálu ve $\text{Ca}^{2+}$ aktivaci

Podářilo se nám potvrdit výchozí hypotézu, že úsek kyselých aminokyselin v distální části karboxylového konce TRPA1 receptoru se účastní jeho vápníkové modulace a představuje možné místo interakce receptoru s vápenatými ionty. Zjistili jsme, že oblast posledních 20 aminokyselin karboxylového konce TRPA1 je nezbytná pro komplexní průběh inaktivace cinamalem vyvolaných proudových odpovědí závislé na vápenatých iontech.

## 8. SEZNAM PUBLIKACÍ

### Impaktované publikace

Marsakova L, Touska F, Teisinger J, Vlachova V. Pore helix domain is critical to camphor sensitivity of transient receptor potential vanilloid 1 channel. *Anesthesiology*. 2012; 116(4):903-917. (IF = 5.359, rok: 2011)

Sura L, Zima V, Marsakova L, Hynkova A, Barvik I, Vlachova V. C-terminal acidic cluster is involved in the Ca<sup>2+</sup>-induced regulation of the human TRPA1 channel. *J Biol Chem*. 2012; 287(20):18067–18077. (IF = 4.773, rok: 2011)

Boukalova S, Marsakova L, Teisinger J, Vlachova V. Conserved residues within the putative S4-S5 region serve distinct functions among thermosensitive vanilloid transient receptor potential (TRPV) channels. *J Biol Chem*. 2010; 285:41455-41462. (IF = 5.328, rok: 2010)

Touska F, Marsakova L, Teisinger J, Vlachova V. A "cute" desensitization of TRPV1. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011; 12:122-129. (IF = 2.805, rok: 2011)

### Neimpaktované publikace

Marsakova L, Vlachova V. Kafr: Účinná látka s neznámým mechanismem působení. *Bolest*. 2012; ročník 15, číslo 1.

Uvedené publikace jsou součástí příloh.

## **9. PŘÍLOHY**

## 10. LITERATURA

1. Ahern GP. Activation of TRPV1 by the satiety factor oleoylethanolamide. *J Biol Chem.* 2003;278:30429-30434.
2. Ahern GP, Brooks IM, Miyares RL, Wang XB. Extracellular cations sensitize and gate capsaicin receptor TRPV1 modulating pain signaling. *J Neurosci.* 2005;25:5109-5116.
3. Ahern GP, Wang X, Miyares RL. Polyamines are potent ligands for the capsaicin receptor TRPV1. *J Biol Chem.* 2006;281:8991-8995.
4. Akopian AN, Ruparel NB, Jeske NA, Hargreaves KM. Transient receptor potential TRPA1 channel desensitization in sensory neurons is agonist dependent and regulated by TRPV1-directed internalization. *J Physiol.* 2007;583:175-193.
5. Andersson DA, Gentry C, Moss S, Bevan S. Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J Neurosci.* 2008;28:2485-2494.
6. Andersson DA, Gentry C, Moss S, Bevan S. Clioquinol and pyrithione activate TRPA1 by increasing intracellular Zn<sup>2+</sup>. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:8374-8379.
7. Andrade EL, Meotti FC, Calixto JB. TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs. *Pharmacol Ther.* 2012;133:189-204.
8. Aneiros E, Cao L, Papakosta M, Stevens EB, Phillips S, Grimm C. The biophysical and molecular basis of TRPV1 proton gating. *EMBO J.* 2011;30:994-1002.
9. Asakawa M, Yoshioka T, Matsutani T, Hikita I, Suzuki M, Oshima I, Tsukahara K, Arimura A, Horikawa T, Hirasawa T, et al. Association of a mutation in TRPV3 with defective hair growth in rodents. *J Invest Dermatol.* 2006;126:2664-2672.
10. Baccaglioni PI, Hogan PG. Some rat sensory neurons in culture express characteristics of differentiated pain sensory cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983;80:594-598.
11. Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian A. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron.* 2004;41:849-857.
12. Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, Yamoah EN, Basbaum AI, Julius D. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell.* 2006;124:1269-1282.
13. Bautista DM, Movahed P, Hinman A, Axelsson HE, Sterner O, Hogestatt ED, Julius D, Jordt SE, Zygmunt PM. Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:12248-12252.
14. Benedikt J, Samad A, Etrich R, Teisinger J, Vlachova V. Essential role for the putative S6 inner pore region in the activation gating of the human TRPA1 channel. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Research.* 2009;1793:1279-1288.
15. Bessac BF, Sivula M, von Hehn CA, Escalera J, Cohn L, Jordt SE. TRPA1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons. *J Clin Invest.* 2008;118:1899-1910.

16. Bezanilla F. How membrane proteins sense voltage. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9:323-332.
17. Bhawe G, Hu HJ, Glauner KS, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS, Gereau RWt. 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.* 2003;100:12480-12485.
18. Bhawe G, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS, Gereau RWt. cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. *Neuron.* 2002;35:721-731.
19. Boukalova S, Marsakova L, Teisinger J, Vlachova V. Conserved residues within the putative S4-S5 region serve distinct functions among thermosensitive vanilloid transient receptor potential (TRPV) channels. *J Biol Chem.* 2010;285:41455-41462.
20. Brauchi S, Orio P, Latorre R. Clues to understanding cold sensation: thermodynamics and electrophysiological analysis of the cold receptor TRPM8. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:15494-15499.
21. Brauchi S, Orta G, Mascayano C, Salazar M, Raddatz N, Urbina H, Rosenmann E, Gonzalez-Nilo F, Latorre R. Dissection of the components for PIP2 activation and thermosensation in TRP channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:10246-10251.
22. Brauchi S, Orta G, Salazar M, Rosenmann E, Latorre R. A hot-sensing cold receptor: C-terminal domain determines thermosensation in transient receptor potential channels. *J Neurosci.* 2006;26:4835-4840.
23. Calixto JB, Kassuya CA, Andre E, Ferreira J. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. *Pharmacol Ther.* 2005;106:179-208.
24. Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science.* 2000;288:306-313.
25. Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature.* 1999;398:436-441.
26. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 1997;389:816-824.
27. Catterall WA. Ion channel voltage sensors: structure, function, and pathophysiology. *Neuron.* 2010;67:915-928.
28. Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature.* 2003;426:517-524.
29. Cordero-Morales JF, Gracheva EO, Julius D. Cytoplasmic ankyrin repeats of transient receptor potential A1 (TRPA1) dictate sensitivity to thermal and chemical stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:E1184-1191.
30. Cosens DJ, Manning A. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature.* 1969;224:285-287.
31. Cvetkov TL, Huynh KW, Cohen MR, Moiseenkova-Bell VY. Molecular Architecture and Subunit Organization of TRPA1 Ion Channel Revealed by Electron Microscopy. *J Biol Chem.* 2011;286:38168-38176.
32. Dai Y, Wang S, Tominaga M, Yamamoto S, Fukuoka T, Higashi T, Kobayashi K, Obata K, Yamanaka H, Noguchi K. Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. *J Clin Invest.* 2007;117:1979-1987.

33. Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, et al. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*. 2000;405:183-187.
34. Dittert I, Benedikt J, Vyklicky L, Zimmermann K, Reeh PW, Vlachova V. Improved superfusion technique for rapid cooling or heating of cultured cells under patch-clamp conditions. *J Neurosci Methods*. 2006;151:178-185.
35. Dittert I, Vlachová V, Knotková H, Vitásková Z, Vyklický L, Kress M, Reeh PW. A technique for fast application of heated solutions of different composition to cultured neurones. *J Neurosci Methods*. 1998;82:195-201.
36. Diver JM, Sage SO, Rosado JA. The inositol trisphosphate receptor antagonist 2-aminoethoxydiphenylborate (2-APB) blocks Ca<sup>2+</sup> entry channels in human platelets: cautions for its use in studying Ca<sup>2+</sup> influx. *Cell Calcium*. 2001;30:323-329.
37. Doerner JF, Gisselmann G, Hatt H, Wetzel CH. Transient receptor potential channel A1 is directly gated by calcium ions. *J Biol Chem*. 2007;282:13180-13189.
38. Doerner JF, Hatt H, Ramsey IS. Voltage- and temperature-dependent activation of TRPV3 channels is potentiated by receptor-mediated PI(4,5)P<sub>2</sub> hydrolysis. *J Gen Physiol*. 2011.
39. Dong XP, Wang X, Xu H. TRP channels of intracellular membranes. *J Neurochem*. 2010;113:313-328.
40. Everaerts W, Gees M, Alpizar YA, Farre R, Leten C, Apetrei A, Dewachter I, van Leuven F, Vennekens R, De Ridder D, et al. The capsaicin receptor TRPV1 is a crucial mediator of the noxious effects of mustard oil. *Curr Biol*. 2011;21:316-321.
41. Everaerts W, Nilius B, Owsianik G. The vanilloid transient receptor potential channel TRPV4: from structure to disease. *Prog Biophys Mol Biol*. 2010;103:2-17.
42. Fernandez-Ballester G, Ferrer-Montiel A. Molecular modeling of the full-length human TRPV1 channel in closed and desensitized states. *J Membr Biol*. 2008;223:161-172.
43. Fonfria E, Murdock PR, Cusdin FS, Benham CD, Kelsell RE, McNulty S. Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family. *J Recept Signal Transduct Res*. 2006;26:159-178.
44. Gallego-Sandin S, Rodriguez-Garcia A, Alonso MT, Garcia-Sancho J. The endoplasmic reticulum of dorsal root ganglion neurons contains functional TRPV1 channels. *J Biol Chem*. 2009;284:32591-32601.
45. Garami A, Pakai E, Oliveira DL, Steiner AA, Wanner SP, Almeida MC, Lesnikov VA, Gavva NR, Romanovsky AA. Thermoregulatory phenotype of the Trpv1 knockout mouse: thermoeffector dysbalance with hyperkinesia. *J Neurosci*. 2011;31:1721-1733.
46. Garcia-Martinez C, Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, Merino JM, Ferrer-Montiel A. Identification of an aspartic residue in the P-loop of the vanilloid receptor that modulates pore properties. *J Biol Chem*. 2000;275:32552-32558.
47. Garcia-Sanz N, Fernandez-Carvajal A, Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, Fajardo-Sanchez E, Fernandez-Ballester G, Ferrer-Montiel A. Identification of a tetramerization domain in the C terminus of the vanilloid receptor. *J Neurosci*. 2004;24:5307-5314.

48. Gaudet R. A primer on ankyrin repeat function in TRP channels and beyond. *Mol Biosyst.* 2008;4:372-379.
49. Gaudet R. TRP channels entering the structural era. *J Physiol.* 2008;586:3565-3575.
50. Gavva NR, Tamir R, Klionsky L, Norman MH, Louis JC, Wild KD, Treanor JJ. Proton activation does not alter antagonist interaction with the capsaicin-binding pocket of TRPV1. *Mol Pharmacol.* 2005;68:1524-1533.
51. Geppetti P, Patacchini R, Nassini R, Materazzi S. Cough: The Emerging Role of the TRPA1 Channel. *Lung.* 2010;188 Suppl 1:S63-68.
52. Goswami C, Hucho TB, Hucho F. Identification and characterisation of novel tubulin-binding motifs located within the C-terminus of TRPV1. *J Neurochem.* 2007;101:250-262.
53. Graepel R, Fernandes ES, Aubdool AA, Andersson DA, Bevan S, Brain SD. 4-oxo-2-nonenal (4-ONE): evidence of transient receptor potential ankyrin 1-dependent and -independent nociceptive and vasoactive responses in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;337:117-124.
54. Gracheva EO, Ingolia NT, Kelly YM, Cordero-Morales JF, Hollopeter G, Chesler AT, Sanchez EE, Perez JC, Weissman JS, Julius D. Molecular basis of infrared detection by snakes. *Nature.* 2010;464:1006-1011.
55. Green BG. Sensory characteristics of camphor. *J Invest Dermatol.* 1990;94:662-666.
56. Guler AD, Lee H, Iida T, Shimizu I, Tominaga M, Caterina M. Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *J Neurosci.* 2002;22:6408-6414.
57. Harteneck C, Plant TD, Schultz G. From worm to man: three subfamilies of TRP channels. *Trends Neurosci.* 2000;23:159-166.
58. Hellwig N, Plant TD, Janson W, Schafer M, Schultz G, Schaefer M. TRPV1 acts as proton channel to induce acidification in nociceptive neurons. *J Biol Chem.* 2004;279:34553-34561.
59. Hill K, Schaefer M. TRPA1 is differentially modulated by the amphipathic molecules trinitrophenol and chlorpromazine. *J Biol Chem.* 2007;282:7145-7153.
60. Hinman A, Chuang HH, Bautista DM, Julius D. TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:19564-19568.
61. Holzer P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience.* 1988;24:739-768.
62. Horowitz LF, Hirdes W, Suh BC, Hilgemann DW, Mackie K, Hille B. Phospholipase C in living cells: activation, inhibition, Ca<sup>2+</sup> requirement, and regulation of M current. *J Gen Physiol.* 2005;126:243-262.
63. Hu H, Bandell M, Petrus MJ, Zhu MX, Patapoutian A. Zinc activates damage-sensing TRPA1 ion channels. *Nat Chem Biol.* 2009;5:183-190.
64. Hu H, Grandl J, Bandell M, Petrus M, Patapoutian A. Two amino acid residues determine 2-APB sensitivity of the ion channels TRPV3 and TRPV4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:1626-1631.
65. Hu HJ, Bhawe G, Gereau RWt. Prostaglandin and protein kinase A-dependent modulation of vanilloid receptor function by metabotropic glutamate receptor 5: potential mechanism for thermal hyperalgesia. *J Neurosci.* 2002;22:7444-7452.

66. Hu HZ, Gu Q, Wang C, Colton CK, Tang J, Kinoshita-Kawada M, Lee LY, Wood JD, Zhu MX. 2-aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3. *J Biol Chem.* 2004;279:35741-35748.
67. Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, Tognetto M, Petros TJ, Krey JF, Chu CJ, et al. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:8400-8405.
68. Hwang SW, Cho H, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Jung J, Cho S, Min KH, Suh YG, Kim D, et al. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:6155-6160.
69. Chaudhury S, Bal M, Belugin S, Shapiro MS, Jeske NA. AKAP150-mediated TRPV1 sensitization is disrupted by calcium/calmodulin. *Mol Pain.* 2011;7:34.
70. Cheng W, Yang F, Liu S, Colton CK, Wang C, Cui Y, Cao X, Zhu MX, Sun C, Wang K, et al. Heteromeric heat-sensitive transient receptor potential channels exhibit distinct temperature and chemical response. *J Biol Chem.* 2012;287:7279-7288.
71. Christensen AP, Corey DP. TRP channels in mechanosensation: direct or indirect activation? *Nat Rev Neurosci.* 2007;8:510-521.
72. Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI, Chao MV, Julius D. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-mediated inhibition. *Nature.* 2001;411:957-962.
73. Chung MK, Guler AD, Caterina MJ. TRPV1 shows dynamic ionic selectivity during agonist stimulation. *Nat Neurosci.* 2008;11:555-564.
74. Chung MK, Jung SJ, Oh SB. Role of TRP channels in pain sensation. *Adv Exp Med Biol.* 2011;704:615-636.
75. Chung MK, Lee H, Mizuno A, Suzuki M, Caterina MJ. 2-aminoethoxydiphenyl borate activates and sensitizes the heat-gated ion channel TRPV3. *J Neurosci.* 2004;24:5177-5182.
76. Chung MK, Lee H, Mizuno A, Suzuki M, Caterina MJ. TRPV3 and TRPV4 mediate warmth-evoked currents in primary mouse keratinocytes. *J Biol Chem.* 2004;279:21569-21575.
77. Jeske NA, Por ED, Belugin S, Chaudhury S, Berg KA, Akopian AN, Henry MA, Gomez R. A-kinase anchoring protein 150 mediates transient receptor potential family V type 1 sensitivity to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *J Neurosci.* 2011;31:8681-8688.
78. Jiang LH, Gamper N, Beech DJ. Properties and therapeutic potential of transient receptor potential channels with putative roles in adversity: focus on TRPC5, TRPM2 and TRPA1. *Curr Drug Targets.* 2011;12:724-736.
79. Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Hogestatt ED, Meng ID, Julius D. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature.* 2004;427:260-265.
80. Jordt SE, Julius D. Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. *Cell.* 2002;108:421-430.
81. Jordt SE, Tominaga M, Julius D. Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:8134-8139.



82. Jordt SE, Tominaga M, Julius D. Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:8134-8139.
83. Jung J, Hwang SW, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Kim WB, Kim D, Oh U. Capsaicin binds to the intracellular domain of the capsaicin-activated ion channel. *J Neurosci*. 1999;19:529-538.
84. Karashima Y, Damann N, Prenen J, Talavera K, Segal A, Voets T, Nilius B. Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1. *J Neurosci*. 2007;27:9874-9884.
85. Karashima Y, Prenen J, Meseguer V, Owsianik G, Voets T, Nilius B. Modulation of the transient receptor potential channel TRPA1 by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate manipulators. *Pflugers Arch*. 2008.
86. Karashima Y, Prenen J, Talavera K, Janssens A, Voets T, Nilius B. Agonist-induced changes in Ca(2+) permeation through the nociceptor cation channel TRPA1. *Biophys J*. 2010;98:773-783.
87. Karashima Y, Talavera K, Everaerts W, Janssens A, Kwan KY, Vennekens R, Nilius B, Voets T. TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:1273-1278.
88. Katsura H, Obata K, Mizushima T, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Fukuoka T, Tokunaga A, Sakagami M, Noguchi K. Antisense knock down of TRPA1, but not TRPM8, alleviates cold hyperalgesia after spinal nerve ligation in rats. *Exp Neurol*. 2006;200:112-123.
89. Kedei N, Szabo T, Lile JD, Treanor JJ, Olah Z, Iadarola MJ, Blumberg PM. Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem*. 2001;276:28613-28619.
90. Kim AY, Tang Z, Liu Q, Patel KN, Maag D, Geng Y, Dong X. Pirt, a phosphoinositide-binding protein, functions as a regulatory subunit of TRPV1. *Cell*. 2008;133:475-485.
91. Kim BJ, Kim MT, Jeon JH, Kim SJ, So I. Involvement of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the desensitization of canonical transient receptor potential 5. *Biol Pharm Bull*. 2008;31:1733-1738.
92. Kim D, Cavanaugh E, Simkin D. Inhibition of Transient Receptor Potential A1 by Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008.
93. Kim KY, Bang S, Han S, Nguyen YH, Kang TM, Kang KW, Hwang SW. TRP-independent inhibition of the phospholipase C pathway by natural sensory ligands. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;370:295-300.
94. Klein RM, Ufret-Vincenty CA, Hua L, Gordon SE. Determinants of molecular specificity in phosphoinositide regulation: PI(4,5)P2 is the endogenous lipid regulating TRPV1. *J Biol Chem*. 2008.
95. Klein RR, Bourdon DM, Costales CL, Wagner CD, White WL, Williams JD, Hicks SN, Sondek J, Thakker DR. Direct activation of human phospholipase C by its well known inhibitor u73122. *J Biol Chem*. 2011;286:12407-12416.
96. Knowlton WM, Bifolck-Fisher A, Bautista DM, McKemy DD. TRPM8, but not TRPA1, is required for neural and behavioral responses to acute noxious cold temperatures and cold-mimetics in vivo. *Pain*. 2010;150:340-350.
97. Kohno K, Sokabe T, Tominaga M, Kadowaki T. Honey bee thermal/chemical sensor, AmHsTRPA, reveals neofunctionalization and loss of transient receptor potential channel genes. *J Neurosci*. 2010;30:12219-12229.

98. Koplas PA, Rosenberg RL, Oxford GS. The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci.* 1997;17:3525-3537.
99. Kottgen M, Benzing T, Simmen T, Tauber R, Buchholz B, Feliciangeli S, Huber TB, Schermer B, Kramer-Zucker A, Hopker K, et al. Trafficking of TRPP2 by PACS proteins represents a novel mechanism of ion channel regulation. *EMBO J.* 2005;24:705-716.
100. Kremeyer B, Lopera F, Cox JJ, Momin A, Rugiero F, Marsh S, Woods CG, Jones NG, Paterson KJ, Fricker FR, et al. A gain-of-function mutation in TRPA1 causes familial episodic pain syndrome. *Neuron.* 2010;66:671-680.
101. Kuner R. Central mechanisms of pathological pain. *Nat Med.* 2010;16:1258-1266.
102. Kwan KY, Allchorne AJ, Vollrath MA, Christensen AP, Zhang DS, Woolf CJ, Corey DP. TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron.* 2006;50:277-289.
103. Latorre R, Brauchi S, Orta G, Zaelzer C, Vargas G. ThermoTRP channels as modular proteins with allosteric gating. *Cell Calcium.* 2007;42:427-438.
104. Leffler A, Fischer MJ, Rehner D, Kienel S, Kistner K, Sauer SK, Gavva NR, Reeh PW, Nau C. The vanilloid receptor TRPV1 is activated and sensitized by local anesthetics in rodent sensory neurons. *J Clin Invest.* 2008;118:763-776.
105. Li M, Yu Y, Yang J. Structural biology of TRP channels. *Adv Exp Med Biol.* 2011;704:1-23.
106. Lishko PV, Procko E, Jin X, Phelps CB, Gaudet R. The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron.* 2007;54:905-918.
107. Liu B, Qin F. Functional control of cold- and menthol-sensitive TRPM8 ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Neurosci.* 2005;25:1674-1681.
108. Liu L, Simon SA. Capsaicin-induced currents with distinct desensitization and Ca<sup>2+</sup> dependence in rat trigeminal ganglion cells. *J Neurophysiol.* 1996;75:1503-1514.
109. Liu L, Simon SA. The influence of removing extracellular Ca<sup>2+</sup> in the desensitization responses to capsaicin, zingerone and olvanil in rat trigeminal ganglion neurons. *Brain Res.* 1998;809:246-252.
110. Long SB, Campbell EB, Mackinnon R. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K<sup>+</sup> channel. *Science.* 2005;309:897-903.
111. Lukacs V, Thyagarajan B, Varnai P, Balla A, Balla T, Rohacs T. Dual regulation of TRPV1 by phosphoinositides. *J Neurosci.* 2007;27:7070-7080.
112. Macpherson LJ, Dubin AE, Evans MJ, Marr F, Schultz PG, Cravatt BF, Patapoutian A. Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature.* 2007;445:541-545.
113. Macpherson LJ, Geierstanger BH, Viswanath V, Bandell M, Eid SR, Hwang S, Patapoutian A. The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. *Curr Biol.* 2005;15:929-934.
114. Macpherson LJ, Hwang SW, Miyamoto T, Dubin AE, Patapoutian A, Story GM. More than cool: promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds. *Mol Cell Neurosci.* 2006;32:335-343.

115. Marsakova L, Touska F, Krusek J, Vlachova V. Pore helix domain is critical to camphor sensitivity of transient receptor potential vanilloid 1 channel. *Anesthesiology*. 2012;116:903-917.
116. Marsch R, Foeller E, Rammes G, Bunck M, Kossl M, Holsboer F, Zieglgansberger W, Landgraf R, Lutz B, Wotjak CT. Reduced anxiety, conditioned fear, and hippocampal long-term potentiation in transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-deficient mice. *J Neurosci*. 2007;27:832-839.
117. Matta JA, Ahern GP. Voltage is a partial activator of rat thermosensitive TRP channels. *J Physiol*. 2007;585:469-482.
118. Matta JA, Cornett PM, Miyares RL, Abe K, Sahibzada N, Ahern GP. General anesthetics activate a nociceptive ion channel to enhance pain and inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:8784-8789.
119. McKemy DD, Neuhausser WM, Julius D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*. 2002;416:52-58.
120. Mercado J, Gordon-Shaag A, Zagotta WN, Gordon SE. Ca<sup>2+</sup>-dependent desensitization of TRPV2 channels is mediated by hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Neurosci*. 2010;30:13338-13347.
121. Meseguer V, Karashima Y, Talavera K, D'Hoedt D, Donovan-Rodriguez T, Viana F, Nilius B, Voets T. Transient receptor potential channels in sensory neurons are targets of the antimycotic agent clotrimazole. *J Neurosci*. 2008;28:576-586.
122. Mizumura K, Sugiura T, Katanosaka K, Banik RK, Kozaki Y. Excitation and sensitization of nociceptors by bradykinin: what do we know? *Exp Brain Res*. 2009;196:53-65.
123. Moiseenkova-Bell VY, Stanciu LA, Serysheva, II, Tobe BJ, Wensel TG. Structure of TRPV1 channel revealed by electron cryomicroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:7451-7455.
124. Montell C, Rubin GM. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*. 1989;2:1313-1323.
125. Moqrich A, Hwang SW, Earley TJ, Petrus MJ, Murray AN, Spencer KS, Andahazy M, Story GM, Patapoutian A. Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science*. 2005;307:1468-1472.
126. Muraki K, Iwata Y, Katanosaka Y, Ito T, Ohya S, Shigekawa M, Imaizumi Y. TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. *Circ Res*. 2003;93:829-838.
127. Myers BR, Bohlen CJ, Julius D. A yeast genetic screen reveals a critical role for the pore helix domain in TRP channel gating. *Neuron*. 2008;58:362-373.
128. Nagata K, Duggan A, Kumar G, Garcia-Anoveros J. Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *J Neurosci*. 2005;25:4052-4061.
129. Nagy I, Santha P, Jancso G, Urban L. The role of the vanilloid (capsaicin) receptor (TRPV1) in physiology and pathology. *Eur J Pharmacol*. 2004;500:351-369.
130. Neeper MP, Liu Y, Hutchinson TL, Wang Y, Flores CM, Qin N. Activation properties of heterologously expressed mammalian TRPV2: evidence for species dependence. *J Biol Chem*. 2007;282:15894-15902.

131. Niemeyer BA. Structure-function analysis of TRPV channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2005;371:285-294.
132. Nilius B, Owsianik G. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol.* 2011;12:218.
133. Nilius B, Prenen J, Owsianik G. Irritating channels: the case of TRPA1. *J Physiol.* 2011;589:1543-1549.
134. Numazaki M, Tominaga T, Takeuchi K, Murayama N, Toyooka H, Tominaga M. Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:8002-8006.
135. Numazaki M, Tominaga T, Toyooka H, Tominaga M. Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase Cepsilon and identification of two target serine residues. *J Biol Chem.* 2002;277:13375-13378.
136. Obata K, Katsura H, Mizushima T, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Fukuoka T, Tokunaga A, Tominaga M, Noguchi K. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *J Clin Invest.* 2005;115:2393-2401.
137. Ohta T, Imagawa T, Ito S. Involvement of transient receptor potential vanilloid subtype 1 in analgesic action of methylsalicylate. *Mol Pharmacol.* 2009;75:307-317.
138. Oseguera AJ, Islas LD, Garcia-Villegas R, Rosenbaum T. On the mechanism of TBA block of the TRPV1 channel. *Biophys J.* 2007;92:3901-3914.
139. Patapoutian A, Tate S, Woolf CJ. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8:55-68.
140. Patel KN, Dong X. Itch: Cells, Molecules, and Circuits. *ACS Chem Neurosci.* 2011;2:17-25.
141. Patel KN, Liu Q, Meeker S, Udem BJ, Dong X. Pirt, a TRPV1 modulator, is required for histamine-dependent and -independent itch. *PLoS One.* 2011;6:e20559.
142. Patil MJ, Jeske NA, Akopian AN. Transient receptor potential V1 regulates activation and modulation of transient receptor potential A1 by Ca<sup>2+</sup>. *Neuroscience.* 2010;171:1109-1119.
143. Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S, et al. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell.* 2002;108:705-715.
144. Peier AM, Reeve AJ, Andersson DA, Moqrich A, Earley TJ, Hergarden AC, Story GM, Colley S, Hogenesch JB, McIntyre P, et al. A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science.* 2002;296:2046-2049.
145. Phelps CB, Wang RR, Choo SS, Gaudet R. Differential regulation of TRPV1, TRPV3, and TRPV4 sensitivity through a conserved binding site on the ankyrin repeat domain. *J Biol Chem.* 2010;285:731-740.
146. Pingle SC, Matta JA, Ahern GP. Capsaicin receptor: TRPV1 a promiscuous TRP channel. *Handb Exp Pharmacol.* 2007:155-171.
147. Plant TD, Strotmann R. Trpv4. *Handb Exp Pharmacol.* 2007:189-205.
148. Plant TD, Strotmann R. TRPV4: A Multifunctional Nonselective Cation Channel with Complex Regulation. 2007.
149. Pozsgai G, Bodkin JV, Graepel R, Bevan S, Andersson DA, Brain SD. Evidence for the pathophysiological relevance of TRPA1 receptors in the cardiovascular system in vivo. *Cardiovasc Res.* 2010;87:760-768.
150. Prescott ED, Julius D. A modular PIP2 binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity. *Science.* 2003;300:1284-1288.

151. Rajala RV, Anderson RE. Focus on molecules: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>). *Exp Eye Res.* 2010;91:324-325.
152. Ramsey IS, Moran MM, Chong JA, Clapham DE. A voltage-gated proton-selective channel lacking the pore domain. *Nature.* 2006;440:1213-1216.
153. Rathee PK, Distler C, Obreja O, Neuhuber W, Wang GK, Wang SY, Nau C, Kress M. PKA/AKAP/VR-1 module: A common link of Gs-mediated signaling to thermal hyperalgesia. *J Neurosci.* 2002;22:4740-4745.
154. Reaves BJ, Wolstenholme AJ. The TRP channel superfamily: insights into how structure, protein-lipid interactions and localization influence function. *Biochem Soc Trans.* 2007;35:77-80.
155. Reeh PW, Kress M. Molecular physiology of proton transduction in nociceptors. *Curr Opin Pharmacol.* 2001;1:45-51.
156. Rohacs T. Phosphoinositide regulation of non-canonical transient receptor potential channels. *Cell Calcium.* 2009;45:554-565.
157. Rohacs T, Lopes CM, Michailidis I, Logothetis DE. PI(4,5)P<sub>2</sub> regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat Neurosci.* 2005;8:626-634.
158. Rohacs T, Nilius B. Regulation of transient receptor potential (TRP) channels by phosphoinositides. *Pflugers Arch.* 2007;455:157-168.
159. Rosenbaum T, Gordon-Shaag A, Munari M, Gordon SE. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin. *J Gen Physiol.* 2004;123:53-62.
160. Ryu S, Liu B, Qin F. Low pH potentiates both capsaicin binding and channel gating of VR1 receptors. *J Gen Physiol.* 2003;122:45-61.
161. Ryu S, Liu B, Yao J, Fu Q, Qin F. Uncoupling proton activation of vanilloid receptor TRPV1. *J Neurosci.* 2007;27:12797-12807.
162. Salazar H, Jara-Oseguera A, Hernandez-Garcia E, Llorente I, Arias O, II, Soriano-Garcia M, Islas LD, Rosenbaum T. Structural determinants of gating in the TRPV1 channel. *Nat Struct Mol Biol.* 2009;16:704-710.
163. Salazar H, Llorente I, Jara-Oseguera A, Garcia-Villegas R, Munari M, Gordon SE, Islas LD, Rosenbaum T. A single N-terminal cysteine in TRPV1 determines activation by pungent compounds from onion and garlic. *Nat Neurosci.* 2008;11:255-261.
164. Salazar M, Moldenhauer H, Baez-Nieto D. Could an allosteric gating model explain the role of TRPA1 in cold hypersensitivity? *J Neurosci.* 2011;31:5554-5556.
165. Samad A, Sura L, Benedikt J, Ettrich R, Minofar B, Teisinger J, Vlachova V. The C-terminal basic residues contribute to the chemical- and voltage-dependent activation of TRPA1. *Biochem J.* 2011;433:197-204.
166. Sanchez SA, Tricerri MA, Gratton E. Laurdan generalized polarization fluctuations measures membrane packing micro-heterogeneity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:7314-7319.
167. Sawada Y, Hosokawa H, Hori A, Matsumura K, Kobayashi S. Cold sensitivity of recombinant TRPA1 channels. *Brain Res.* 2007;1160:39-46.
168. Sawada Y, Hosokawa H, Matsumura K, Kobayashi S. Activation of transient receptor potential ankyrin 1 by hydrogen peroxide. *Eur J Neurosci.* 2008;27:1131-1142.
169. Shigematsu H, Sokabe T, Danev R, Tominaga M, Nagayama K. A 3.5-nm structure of rat TRPV4 cation channel revealed by Zernike phase-contrast cryoelectron microscopy. *J Biol Chem.* 2010;285:11210-11218.

170. Shin J, Cho H, Hwang SW, Jung J, Shin CY, Lee SY, Kim SH, Lee MG, Choi YH, Kim J, et al. Bradykinin-12-lipoxygenase-VR1 signaling pathway for inflammatory hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:10150-10155.
171. Schmidt M, Dubin AE, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian A. Nociceptive signals induce trafficking of TRPA1 to the plasma membrane. *Neuron*. 2009;64:498-509.
172. Schumacher MA, Eilers H. TRPV1 splice variants: structure and function. *Front Biosci*. 2010;15:872-882.
173. Schwarz S, Greffrath W, Busselberg D, Treede RD. Inactivation and tachyphylaxis of heat-evoked inward currents in nociceptive primary sensory neurones of rats. *J Physiol*. 2000;528:539-549.
174. Smith-Maxwell CJ, Ledwell JL, Aldrich RW. Uncharged S4 residues and cooperativity in voltage-dependent potassium channel activation. *J Gen Physiol*. 1998;111:421-439.
175. Smith GD, Gunthorpe MJ, Kelsell RE, Hayes PD, Reilly P, Facer P, Wright JE, Jerman JC, Walhin JP, Ooi L, et al. TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature*. 2002;418:186-190.
176. Staruschenko A, Jeske NA, Akopian AN. Contribution of TRPV1-TRPA1 interaction to the single channel properties of the TRPA1 channel. *J Biol Chem*. 2010;285:15167-15177.
177. Steenland HW, Ko SW, Wu LJ, Zhuo M. Hot receptors in the brain. *Mol Pain*. 2006;2:34.
178. Stein AT, Ufret-Vincenty CA, Hua L, Santana LF, Gordon SE. Phosphoinositide 3-kinase binds to TRPV1 and mediates NGF-stimulated TRPV1 trafficking to the plasma membrane. *J Gen Physiol*. 2006;128:509-522.
179. Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, et al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell*. 2003;112:819-829.
180. Stucky CL, Dubin AE, Jeske NA, Malin SA, McKemy DD, Story GM. Roles of transient receptor potential channels in pain. *Brain Res Rev*. 2009;60:2-23.
181. Studer M, McNaughton PA. Modulation of single-channel properties of TRPV1 by phosphorylation. *J Physiol*. 2010;588:3743-3756.
182. Suh BC, Hille B. PIP2 is a necessary cofactor for ion channel function: how and why? *Annu Rev Biophys*. 2008;37:175-195.
183. Sura L, Zima V, Marsakova L, Hynkova A, Barvik I, Vlachova V. C-terminal acidic cluster is involved in Ca<sup>2+</sup>-induced regulation of human transient receptor potential ankyrin 1 channel. *J Biol Chem*. 2012;287:18067-18077.
184. Szallasi A, Blumberg PM. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev*. 1999;51:159-212.
185. Takahashi N, Kuwaki T, Kiyonaka S, Numata T, Kozai D, Mizuno Y, Yamamoto S, Naito S, Knevels E, Carmeliet P, et al. TRPA1 underlies a sensing mechanism for O<sub>2</sub>. *Nat Chem Biol*. 2011;7:701-711.
186. Talavera K, Gees M, Karashima Y, Meseguer VM, Vanoirbeek JA, Damann N, Everaerts W, Benoit M, Janssens A, Vennekens R, et al. Nicotine activates the chemosensory cation channel TRPA1. *Nat Neurosci*. 2009;12:1293-1299.

187. Talavera K, Yasumatsu K, Voets T, Droogmans G, Shigemura N, Ninomiya Y, Margolskee RF, Nilius B. Heat activation of TRPM5 underlies thermal sensitivity of sweet taste. *Nature*. 2005;438:1022-1025.
188. Taylor-Clark TE, Ghatta S, Bettner W, Udem BJ. Nitrooleic acid, an endogenous product of nitrative stress, activates nociceptive sensory nerves via the direct activation of TRPA1. *Mol Pharmacol*. 2009;75:820-829.
189. Taylor-Clark TE, McAlexander MA, Nassenstein C, Sheardown SA, Wilson S, Thornton J, Carr MJ, Udem BJ. Relative contributions of TRPA1 and TRPV1 channels in the activation of vagal bronchopulmonary C-fibres by the endogenous autacoid 4-oxononenal. *J Physiol*. 2008;586:3447-3459.
190. Taylor-Clark TE, Udem BJ, Macglashan DW, Jr., Ghatta S, Carr MJ, McAlexander MA. Prostaglandin-induced activation of nociceptive neurons via direct interaction with transient receptor potential A1 (TRPA1). *Mol Pharmacol*. 2008;73:274-281.
191. Tian W, Fu Y, Wang DH, Cohen DM. Regulation of TRPV1 by a novel renally expressed rat TRPV1 splice variant. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006;290:F117-126.
192. Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*. 1998;21:531-543.
193. Tominaga M, Wada M, Masu M. Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:6951-6956.
194. Toro CA, Arias LA, Brauchi S. Sub-cellular distribution and translocation of TRP channels. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011;12:12-23.
195. Tousova K, Vyklicky L, Susankova K, Benedikt J, Vlachova V. Gadolinium activates and sensitizes the vanilloid receptor TRPV1 through the external protonation sites. *Mol Cell Neurosci*. 2005;30:207-217.
196. Trebak M, Lemonnier L, DeHaven WI, Wedel BJ, Bird GS, Putney JW, Jr. Complex functions of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in regulation of TRPC5 cation channels. *Pflugers Arch*. 2009;457:757-769.
197. Trevisani M, Siemens J, Materazzi S, Bautista DM, Nassini R, Campi B, Imamachi N, Andre E, Patacchini R, Cottrell GS, et al. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:13519-13524.
198. Tsavaler L, Shapero MH, Morkowski S, Laus R. Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer Res*. 2001;61:3760-3769.
199. Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:509-544.
200. Turina AV, Nolan MV, Zygadlo JA, Perillo MA. Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. *Biophys Chem*. 2006;122:101-113.
201. Ufret-Vincenty CA, Klein RM, Hua L, Angueyra J, Gordon SE. Localization of the PIP2 sensor of TRPV1 ion channels. *J Biol Chem*. 2011;286:9688-9698.
202. Ursu D, Knopp K, Beattie RE, Liu B, Sher E. Pungency of TRPV1 agonists is directly correlated with kinetics of receptor activation and lipophilicity. *Eur J Pharmacol*. 2010;641:114-122.

203. Valente P, Garcia-Sanz N, Gomis A, Fernandez-Carvajal A, Fernandez-Ballester G, Viana F, Belmonte C, Ferrer-Montiel A. Identification of molecular determinants of channel gating in the transient receptor potential box of vanilloid receptor 1. *FASEB J*. 2008;22:3298-3309.
204. van der Wal J, Habets R, Varnai P, Balla T, Jalink K. Monitoring agonist-induced phospholipase C activation in live cells by fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem*. 2001;276:15337-15344.
205. Vannier B, Peyton M, Boulay G, Brown D, Qin N, Jiang M, Zhu X, Birnbaumer L. Mouse *trp2*, the homologue of the human *trpc2* pseudogene, encodes mTrp2, a store depletion-activated capacitative Ca<sup>2+</sup> entry channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:2060-2064.
206. Vay L, Gu C, McNaughton PA. The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. *Br J Pharmacol*. 2012;165:787-801.
207. Venkatachalam K, Zheng F, Gill DL. Regulation of canonical transient receptor potential (TRPC) channel function by diacylglycerol and protein kinase C. *J Biol Chem*. 2003;278:29031-29040.
208. Villalba-Galea CA, Sandtner W, Starace DM, Bezanilla F. S4-based voltage sensors have three major conformations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:17600-17607.
209. Vlachova V, Teisinger J, Sušánková K, Lyfenko A, Ettrich R, Vyklicky L. Functional role of C-terminal cytoplasmic tail of rat vanilloid receptor 1. *J Neurosci*. 2003;23:1340-1350.
210. Voets T, Droogmans G, Wissenbach U, Janssens A, Flockerzi V, Nilius B. The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature*. 2004;430:748-754.
211. Voets T, Owsianik G, Janssens A, Talavera K, Nilius B. TRPM8 voltage sensor mutants reveal a mechanism for integrating thermal and chemical stimuli. *Nat Chem Biol*. 2007;3:174-182.
212. Vogt-Eisele AK, Weber K, Sherkheli MA, Vielhaber G, Panten J, Gisselmann G, Hatt H. Monoterpenoid agonists of TRPV3. *Br J Pharmacol*. 2007;151:530-540.
213. Vos MH, Neelands TR, McDonald HA, Choi W, Kroeger PE, Puttfarcken PS, Faltynek CR, Moreland RB, Han P. TRPV1b overexpression negatively regulates TRPV1 responsiveness to capsaicin, heat and low pH in HEK293 cells. *J Neurochem*. 2006;99:1088-1102.
214. Vriens J, Appendino G, Nilius B. Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels. *Mol Pharmacol*. 2009;75:1262-1279.
215. Wang C, Hu HZ, Colton CK, Wood JD, Zhu MX. An alternative splicing product of the murine *trpv1* gene dominant negatively modulates the activity of TRPV1 channels. *J Biol Chem*. 2004;279:37423-37430.
216. Wang H, Wang DH, Galligan JJ. P2Y2 receptors mediate ATP-induced resensitization of TRPV1 expressed by kidney projecting sensory neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;298:R1634-1641.
217. Wang S, Dai Y, Fukuoka T, Yamanaka H, Kobayashi K, Obata K, Cui X, Tominaga M, Noguchi K. Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. *Brain*. 2008;131:1241-1251.
218. Wang S, Lee J, Ro JY, Chung MK. Warmth suppresses and desensitizes damage-sensing ion channel TRPA1. *Mol Pain*. 2012;8:22.



219. Wang YY, Chang RB, Waters HN, McKemy DD, Liman ER. The nociceptor ion channel TRPA1 is potentiated and inactivated by permeating calcium ions. *J Biol Chem.* 2008;283:32691-32703.
220. Watanabe H, Vriens J, Suh SH, Benham CD, Droogmans G, Nilius B. Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *J Biol Chem.* 2002;277:47044-47051.
221. Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science.* 2000;288:1765-1769.
222. Xu H, Blair NT, Clapham DE. Camphor activates and strongly desensitizes the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel in a vanilloid-independent mechanism. *J Neurosci.* 2005;25:8924-8937.
223. Xu H, Delling M, Jun JC, Clapham DE. Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nat Neurosci.* 2006;9:628-635.
224. Xu H, Ramsey IS, Kotecha SA, Moran MM, Chong JA, Lawson D, Ge P, Lilly J, Silos-Santiago I, Xie Y, et al. TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature.* 2002;418:181-186.
225. Yuan P, Leonetti MD, Pico AR, Hsiung Y, MacKinnon R. Structure of the human BK channel Ca<sup>2+</sup>-activation apparatus at 3.0 Å resolution. *Science.* 2010;329:182-186.
226. Zhang X, Huang J, McNaughton PA. NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *Embo J.* 2005;24:4211-4223.
227. Zhang X, Li L, McNaughton PA. Proinflammatory mediators modulate the heat-activated ion channel TRPV1 via the scaffolding protein AKAP79/150. *Neuron.* 2008;59:450-461.
228. Zhu W, Oxford GS. Phosphoinositide-3-kinase and mitogen activated protein kinase signaling pathways mediate acute NGF sensitization of TRPV1. *Mol Cell Neurosci.* 2007;34:689-700.
229. Zimmermann K, Lennerz JK, Hein A, Link AS, Kaczmarek JS, Delling M, Uysal S, Pfeifer JD, Riccio A, Clapham DE. 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.* 2011;108:18114-18119.
230. Zurborg S, Yurgionas B, Jira JA, Caspani O, Heppenstall PA. Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca<sup>2+</sup>. *Nat Neurosci.* 2007;10:277-279.