

Abstrakt

Dizertační práce Studium vybraných TRP kanálů a jejich ligandů se zabývá charakterizací vazebných míst pro Ca^{2+} vazebné proteiny kalmodulin a S100A1 a fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát na intracelulárních amino- a karboxy-koncích členů podrodiny TRPV1, TRPV2, TRPV5 a TRPM3.

TRP kanály tvoří rodinu více než 30 různých iontových kanálů, které se v organismu účastní mnoha fyziologických procesů jako např. vnímání tepla, chladu, tlaku, změny pH nebo udržování stálé hladiny kationtů. Jsou tvořeny šesti transmembránovými doménami, pórem mezi pátou a šestou doménou a intracelulárním N- a C-koncem. Jsou uspořádány do vyšších celků homo- nebo heterotetramerů.

Funkce TRP kanálů je regulována řadou ligandů (např. Ca^{2+} vazebné proteiny, fosfatidylinositoly, ATP), které se váží na specializované vazebné domény přítomné na intracelulárních koncích.

Na C-koncích iontových kanálů TRPV2 a TRPV5 byly pomocí bioinformatických nástrojů navrženy vazebné domény pro kalmodulin (CaM), které jsou charakteristické výskytem konzervovaných hydrofobních reziduí na konkrétních pozicích. Pomocí měření stacionární anizotropie fluorescence byla potvrzena vazba těchto domén na CaM s vysokou afinitou a s využitím bodových mutací vybraných bazických reziduí byly určeny aminokyseliny mající významný vliv na tuto vazbu. Také byla potvrzena závislost vazby na přítomnosti Ca^{2+} .

Na N-konci TRPM3 byly identifikovány dvě CaM vazebné domény. Správnost a stabilita konstruktů byla ověřena pomocí hmotnostní spektrometrie a měřením spekter cirkulárního dichroismu. Pomocí metod stacionární anizotropie fluorescence a povrchové plazmonové rezonance byla určena vysoká vazebná afinita těchto konstruktů ke Ca^{2+} vázajícím proteinům CaM a S100A1, a byla také stanovena pozitivně nabitá rezidua, která hrají významnou roli ve vazbě na tyto proteiny. Byla také stanovena závislost vazby těchto konstruktů na přítomnosti vápenatých kationtů.

Pomocí metod měření stacionární anizotropie fluorescence a povrchové plazmonové rezonance byly identifikovány tři nezávislé PIP_2 vázající domény na N- a C-koncích iontového kanálu TRPV1. Navíc bylo zjištěno, že jedna doména na N-konci a jedna doména na C-konci se překrývají s dříve identifikovanými CaM vázajícími doménami, což zřejmě hraje důležitou roli v regulaci iontového kanálu TRPV1 pomocí těchto ligandů.