

**Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra fyziologie**  
**Charles University, Faculty of Science**  
**Department of Physiology**

Doktorský studijní program: Fyziologie živočichů  
Doctoral study programme: Animal Physiology

Autoreferát disertační práce  
Summary of the Doctoral thesis



Buněčné a molekulární mechanismy aktivace teplotně citlivých TRP  
iontových kanálů  
Cellular and Molecular Mechanisms of Activation of Thermally Sensitive  
TRP Ion Channels

**Ing. Lucie Máčiková**

Školitel/ Supervisor: RNDr. Viktorie Vlachová, DrSc.

Praha, 2020

## **Doktorské studijní programy v biomedicině**

*Univerzita Karlova  
a Akademie věd České republiky*

Program: Fyziologie živočichů

Předseda oborové rady: doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Školící pracoviště: Fyziologický ústav AV ČR,  
oddělení Buněčné neurofyziologie

Autor: Ing. Lucie Máčiková

Školitel: RNDr. Viktorie Vlachová, DrSc.

S disertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách  
Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy.

## Abstrakt

Tranzientní receptorové potenciálové receptory (TRP) jsou kationtové kanály propustné pro jednomocné i dvojmocné ionty. Speciální skupina označovaná jako termoTRP zahrnuje TRP kanály aktivované přímo změnou teploty. TRPV3, vaniloidní termoTRP kanál typu 3, hojně exprimovaný v keratinocytech, je zapojen do regulace kožní homeostázy, detekce tepla, nocicepce a rozvoje pruritu. Výsledky předložené dizertační práce prokazují důležitou úlohu oblasti cytoplazmatického rozhraní, nacházejícího se mezi podjednotkami, v teplotní aktivaci TRPV3. Vzhledem k výrazné strukturní podobnosti vaniloidních receptorů vyslovujeme hypotézu, že identifikovaná oblast je důležitá pro teplotní citlivost i ostatních vaniloidních termoTRP receptorů (TRPV1, TRPV2 a TRPV4). Podařilo se prokázat, že TRPV3 může být substrátem pro ERK1/2 proteinkinázy (kinázy regulované mimobuněčným signálem 1 a 2) a identifikovat fosforylační místa TRPV3, která jsou cílem ERK1/2. Z nich byl klíčovým fosforylačním místem pro senzitivizaci zprostředkovanou ERK kinázou určen threonin 264. Toto místo může mít fyziologický/patofyziologický význam v procesech senzitivizace TRPV3 v lidských keratinocytech prostřednictvím MAPK signální kaskády. Tranzientní receptorový potenciálový kanál ankyrinového typu 1 (TRPA1) je polymodální senzor chladu, endogenních metabolitů produkovaných při zánětu a infekci a dráždivých látek exogenního původu. V rámci dizertační práce jsme určili podmínky, za jakých může specifická oblast cytoplazmatického C-konce lidského TRPA1 receptoru (L992-P1034) přímo interagovat s fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátem ( $PIP_2$ ). Na základě našich výsledků byl navržen mechanismus, kterým  $PIP_2$  může ovlivňovat aktivitu TRPA1 v nociceptivních neuronech. Potenciace TRPA1 závislá na vápníku je ovlivněna přítomností dvou specifických peptidů o sekvenci identické s lidským TRPA1 v oblasti L992-P1034. Mutace konzervovaného fenylylaninu 1020 v této oblasti významně snižuje aktivaci receptoru při negativním membránovém potenciálu. Prokázali jsme, že  $PIP_2$  zvyšuje aktivitu TRPA1 receptoru v buněčném modelu senzorických neuronů.

## **Abstract**

The transient receptor potential (TRP) are cation channels mostly permeable to both monovalent and divalent cations. ThermoTRP is a specific group of directly thermally activated TRP channels. The vanilloid transient receptor potential 3 (TRPV3) is an ion channel widely expressed in keratinocytes, that is implicated in the regulation of skin homeostasis, thermo-sensing, nociception and development of itch sensation. Our results show the importance of the cytoplasmic inter-subunit interface in the heat sensitivity of TRPV3. As there is a structural analogy within the vanilloid receptors, our hypothesis of the identified important region is supposed to be valid also for other thermally activated TRPV receptors (TRPV1, TRPV2 and TRPV4). We have proved that TRPV3 is a substrate for ERK1/2 protein kinase (kinase regulated by extracellular signal 1 and 2) and we have identified TRPV3 phosphorylation sites that may be direct targets for ERK1/2. Of these residues, threonine 264 has been shown to be the main phosphorylation site responsible for TRPV3 sensitization mediated by ERK kinase. In human keratinocytes, the phosphorylation might be physiologically and pathophysiologically important in processes of TRPV3 sensitization mediated by MAPK signaling pathway. The transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) channel is a polymodal sensor of cold, endogenous proalgesic agents and environmental irritant compounds. TRPA1 is involved in various pain conditions. In the thesis, we have determined the conditions for the interaction of the cytoplasmic C-terminal of human TRPA1 (L992-P1034) with phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) and we have proposed the mechanism of TRPA1 regulation by PIP<sub>2</sub> in native neurons. Calcium-dependent potentiation was strongly impacted by the presence of two specific TRPA1-derived peptides. Mutation of a conserved residue within the interaction region significantly decreased the activation of the channels at negative membrane potentials. In the cellular model of sensory neurons, PIP<sub>2</sub> positively regulated the activity of TRPA1 receptor.

## 1. Úvod

Transientní Receptorové Potentialové (TRP) je rodina neselektivních kationtových kanálů propouštějících pro monovalentní i bivalentní ionty. TRP iontové kanály se vyskytují téměř u všech organismů, v každé tkáni a buněčném typu, a s evolucí se některé z nich jen pozvolna měnily (1, 2). U savců jsou TRP kanály kódované 28 geny a řadí se podle strukturní homologie do 6 podrodin: TRPC (kanonické, klasické), TRPM (melastatinové), TRPV (vaniloidní), TRPA (ankyrinové), TRPP (polycystinové), TRPML (mukolipinové) (3). Mnoho z nich se uplatňuje v transdukcii různých chemických, teplotních, světelných a mechanických podnětů, a plní tak klíčovou úlohu molekulárních detektorů. Jsou tvořeny čtyřmi symetricky uspořádanými podjednotkami vytvářejícími centrální pór. Podjednotky tetrameru mohou být shodné (homotetramer), nebo odlišné (heterotetramer). Každá podjednotka je tvořena šesti transmembránovými segmenty (S1-S6), pórtočnou klíčkou mezi segmenty S5 a S6 a intracelulárními N- a C-konci. Na N-koncové oblasti se u TRPV, TRPC a TRPA kanálů nacházejí ankyrinové repetice (AR), které mohou plnit úlohu vazebných míst pro různé ligandy, nebo zajišťovat kontakt proteinů s cytoskeletem (4). TRP kanály, které lze přímo aktivovat změnami teploty, se označují termoTRP. Dosud je mezi termoTRP zařazeno nejméně 10 kanálů z celkového počtu 27 TRP proteinů vyskytujících se u člověka (2, 5-7). Molekulární mechanismus teplotní aktivace termoTRP kanálů zatím není jednoznačně objasněn a zůstává tématem odborných diskuzí. Charakteristickou vlastností teplotně aktivovaných TRP kanálů je polymodalita, tj. schopnost aktivace mnoha podněty různých modalit. TermoTRP kanály se významně uplatňují v buněčné signalizaci vápenatými ionty ( $\text{Ca}^{2+}$ ).

TRPA1 je polymodální termoTRP kanál zapojený v procesech nocicepce, zánětlivé a neuropatické bolesti, zejména zánětlivé chladové a mechanické hyperalgezie (8-11). Jeho aktivita TRPA1 je významně ovlivňována  $\text{Ca}^{2+}$ , tato regulace je bimodálního charakteru v závislosti na intracelulární koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$ : při nízké koncentraci je aktivita kanálu senzitivována, naopak v přítomnosti zvýšené koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  je kanál inaktivován (12). Na molekulární úrovni je tento proces řízen prostřednictvím kalmodulinu, který interaguje s karboxylovým koncem TRPA1 v oblasti L992-N1008 (13). Bylo prokázáno, že  $\text{PIP}_2$  moduluje

aktivitu většiny termoTRP kanálů, obecně je desenzitizace TRP kanálů řízena hladinou membránového PIP<sub>2</sub>, avšak úloha PIP<sub>2</sub> v regulaci TRPA1 však zatím není dostatečně prozkoumána (14, 15).

TRPV3 je nejvýznamnějším vaniloidním termoTRP kanálem z hlediska fyziologie a patofyziologie kůže (16). Nedávné studie ukázaly, že při selektivní inhibici TRPV3 forsythosidem B dochází ke zmírnění pruritu (17), při aplikaci ostholu dochází ke zmírnění projevů atopické dermatitidy (18). TRPV3 je aktivován teplotami vysoce překračujícími nocicepční práh (> 50 °C) a až při opakované, nebo déletrvajícím aplikaci je teplotní práh snížen k hodnotám 33-39 °C. Projevem funkčně závislé aktivace je hystereze otevírání a zavírání iontového kanálu (vrátkování) při aktivaci teplem nebo agonistou (19). Vedle funkčně závislé aktivace vykazuje TRPV3 unikátní vlastnost senzitivace, tzn. že zvyšuje svou aktivitu při opakované stimulaci. TRPV3 tvoří komplex s receptorem pro epidermální růstový faktor (EGF), jehož aktivace vede k senzitivaci TRPV3 kanálu skrze signalizační dráhy (20).

## 2. Cíle práce

1. Charakterizovat parametry teplotní aktivace rekombinantního lidského TRPV3 receptoru a určit podmínky, za kterých dochází k funkčně závislé senzitivaci. Na základě porovnání primárních sekvencí a dostupných struktur TRPV1 a TRPV3 identifikovat oblast TRPV3 receptoru, která by mohla být zodpovědná za funkčně závislou senzitivaci při aktivaci teplem. Popsat funkční úlohu této oblasti pomocí elektrofyziologických technik a určit možný molekulární mechanismus senzitivace.
2. Zjistit, zda epidermální růstový faktor (EGF) senzitivuje nativní TRPV3 v lidských keratinocytech a do jaké míry je tato senzitivace zprostředkována signální kaskádou MAPK (dráha mitogenem aktivovaných kináz). Určit, zda TRPV3 může být substrátovým proteinem pro ERK1/2 proteinkinázy (kinázy regulované mimobuněčným signálem 1 a 2). Identifikovat potenciální fosforylační místo TRPV3, které by mohlo být hlavním cílem ERK1/2.
3. Určit, zda a případně za jakých podmínek může specifická oblast cytoplazmatického C-konce lidského TRPA1 receptoru (L992-

P1034) přímo interagovat s fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátem (PIP<sub>2</sub>). Na základě biofyzikálních, biochemických, strukturních a elektrofyziologických experimentů se pokusit navrhnout mechanismus, kterým PIP<sub>2</sub> může ovlivňovat aktivitu TRPA1 v nociceptivních neuronech.

### 3. Materiál a metodika

#### 3.1 Chemikálie

Pro přípravu roztoků a při pokusech prováděných v laboratoři na oddělení buněčné neurofyziologie Akademie věd ČR byla používána upravená deionizovaná voda (H<sub>2</sub>O) ze stanice Purelab Flex, ELGA (UK) o výsledném odporu 18.2 MΩ.cm.

Pepton, agaróza a kvasniční extrakt byly pořízeny od SERVA (Německo), Nutrient agar č. 2 od Biolife (Itálie) a TBS 10x od Boston Bioproducts (USA). Oligonukleotidy pro cílenou mutagenezi byly syntetizovány společností Merck (Německo). Peptidy byly komerčně syntetizovány společností Biomatik (Kanada). Lipidy byly pořízeny od Avanti Polar Lipids (USA). Zbylé chemikálie byly pořízeny od Sigma (Česká republika).

#### 3.2 Mutageneze, buněčné linie a transfekce

Za účelem cílené bodové mutageneze byla použita komerčně dodávaná sada QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornie, USA). Pro každou mutaci byla navržena dvojice primerů (Merck, Německo). Expresní plasmidy nesoucí nemutované typy lidských TRPV3 a TRPA1 receptorů byly využity jako templáty pro cílenou mutagenezi. Ověřený produkt PCR reakce byl transformován do ultrakompetentních bakterií kmene XL10-Gold *E. Coli* a z označených kolonií byla vyizolována plazmidová DNA pomocí High-Speed Plasmid Mini (GeneAid, Taiwan) a osekvenovány společností Eurofins Genomics (Německo).

Pro pokusy v rozsahu předkládané dizertační práce byly využity tři typy buněčných linií: lidské embryonální ledvinové buňky (angl. Human embryonic kidney, HEK293T; ATCC, USA), diferencované immortalizované lidské kožní keratinocyty (HaCaT; CLS GmbH, Německo) a hybridní somatické buňky potkaních embryonálních ganglií zadních míšních kořenů (angl. Dorsal root ganglia, DRG) s myšními

neuroblastomovými buněčnými liniemi (F11; ECACC, Velká Británie). Buněčné linie byly sterilně kultivovány v inkubátoru při teplotě 37 °C pod atmosférou s obsahem 5% CO<sub>2</sub>, každé 2-3 dny byly při konfluentním nárůstu kultury pasážovány a pro potřeby elektrofyziologického měření nasazovány na 24 jamkové destičky se dnem upraveným kolagenem a poly-L-lysinem. Po 1-2 dnech od nasazení buněk na 24 jamkovou destičku prokryly buňky z 80% konfluentně dno jamek a byly připraveny k transfekci pomocí MATra (IBA GmbH, Německo) nebo Lipofectamin 2000 (Invitrogen, USA).

### 3.3 Elektrofyziologické měření metodou terčíkového zámku

Elektrofyziologická měření byla prováděná metodou terčíkového zámku v uspořádání měření z celé buňky (angl. *whole cell patch-clamp*) v režimu napěťového zámku, kdy byl zaznamenáván proud tekoucí skrz membránu snímané buňky při určeném membránovém potenciálu. Aparatura složená z invertovaného fluorescenčního mikroskopu Axiovert 135 (Zeiss, Německo) umístěného na antivibračním stole TMC (Technical Manufacturing), vybaveného manipulátorem MP-225 (Sutter Instrument, USA), aplikačním systémem s termočlánkem vyvinutým v naší laboratoři (21, 22), zesilovačem Axopatch 200B (Molecular Devices, USA), převodníkem pro digitalitaci analogových dat AD/DA Digidata 1440A (Molecular Devices, USA) a počítače s programem pCLAMP 10 (Molecular Devices, USA) sloužila k záznamu elektrofyziologických dat.

Měřicí mikroelektrody byly připraveny bezprostředně před experimentem na horizontálním tahači P-1000 (Sutter Instrument, USA) z tlustostěných trubiček z borosilikátového skla o vnějším průměru 1.5 mm typu GB150F-8P (Science products, Německo). Hroty mikroelektrod byly tepelně otaveny na výsledný odpor 3-5 MΩ.

Skleněné pipety byly plněny intracelulárním roztokem voleným dle buněčné linie a typu experimentu. Pro měření byly vybírány samostatné vitálně vypadající buňky exprimující zelený fluorescenční protein.

### 3.4 Vyhodnocení $Q_{10}$ teplotní aktivace

Systém pro rychlé a přesné ohřátí aplikovaných extracelulárních roztoků na buňky umožnil stanovit teplotní citlivost TRPV3 konstruktů. Teplota aplikovaných roztoků se lineárně zvyšovala z 25 °C až k 60 °C s maximální rychlostí ohřevu 30-50 °C.s<sup>-1</sup>. Proudové odpovědi byly



v prvním kroku zprůměrovány v teplotním rozsahu 0.25 °C a poté zlogaritmovány. Hodnoty logaritmu průměrné proudové odpovědi  $\log(I)$  byly vyneseny do grafu proti převrácené hodnotě termodynamické teploty  $1/T$  a z grafu byly vyhodnoceny parametry lineární oblasti závislosti nad teplotním prahem jednotlivých konstruktů.

Teplotní závislost studovaných konstruktů TRPV3 byla určena pomocí hodnoty  $Q_{10}$  teplotního koeficientu, který je definován vztahem (1), kde  $A_1$  a  $A_2$  jsou amplitudy proudů naměřených při teplotách  $T_1$  a  $T_2$ . Teplotní koeficient byl určen pomocí hodnoty aktivační energie  $E_A$  ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) vypočtené ze směrnice lineární oblasti grafu v rozsahu  $T_1$  a  $T_2$ .

$$Q_{10} = \left(\frac{A_2}{A_1}\right)^{\frac{10}{(T_2-T_1)}} \quad (1)$$

### 3.5 Studium interakce peptidů s lipidy

Pro studium interakce peptidů s lipidy a její charakterizace byly využity metody plazmonová vlnovodná rezonance (PWR), mikrofluidní difúzní dimenzování (MDS), infračervená spektrometrie typu pATR-FTIR, fluorescenční analýza membránové integrity lipozomů a cirkulární dichroizmus (CD). Detailní popis metod je uveden v dizertační práci či příslušných publikacích.

### 3.6 Statistické zpracování a sdružování průměrů dat

Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí programu SigmaPlot 10.0 (Systat Software, USA). U jednotlivých skupin dat bylo metodou jednofaktorové analýzy rozptylu (ANOVA) určeno, zda existují rozdíly v průměrných hodnotách. Pokud se skupiny lišily, porovnávaly se pomocí t-testu či testu Mann-Whitney.

Pro porovnání průměrných teplotních prahů jednotlivých konstruktů TRPV3 byl navržen postup sdružování průměrů dat. Proudové odpovědi byly nejprve zprůměrovány v intervalech 0.25 °C, poté byly znormalizovány na hodnotu průměru proudové odpovědi při teplotě 26 °C. Takto získaná data byla rozřazena do 35 intervalů napříč teplotami a zároveň napříč normalizovanými proudy. Rozřazená data byla poté zpětně sdružena a pro každý bod byly určeny odchylky teploty i odchylky normalizovaného proudu. Tento postup umožnil vyhodnotit teplotní prah konstruktů i přes jejich značnou variabilitu.

## 4. Výsledky a diskuse

### 4.1 Cytoplazmatické rozhraní mezi podjednotkami určuje charakteristiku teplotní aktivace TRPV3

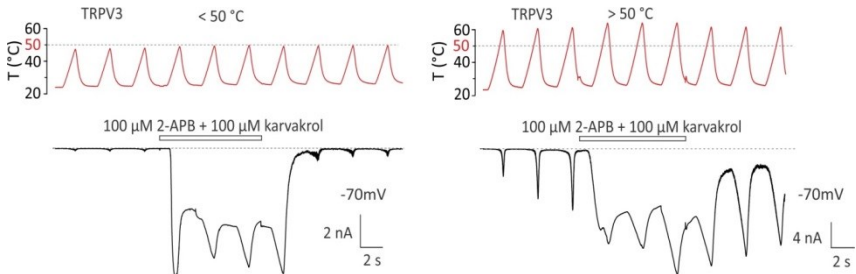
Ve fázi návrhu studie byla známa pouze krystalová struktura části intracelulárního N-konce myšního TRPV3 (23). Tato oblast receptoru obsahující ankyrinové repetice se nápadně liší od TRPV1 v konformaci smyčky mezi třetí (AR3) a čtvrtou (AR4) ankyrinovou repeticí, tzv. třetí smyčky. TRPV3 má v porovnání s TRPV1 vyšší teplotní práh pro aktivaci a vykazuje silnou funkčně závislou senzitivizaci, tj. při opakované aktivaci zvyšuje pravděpodobnost otevření, zatímco TRPV1 při opakované aktivaci desenzitivizuje. Protože primární sekvence N251-E257 v třetí smyčce je silně proměnlivá v rámci teplotně citlivých TRPV receptorů, zaměřili jsme se na tuto oblast s cílem zjistit, jaká je její úloha v aktivaci teplem.

Pro ověření funkční důležitosti nekonzervované části třetí smyčky byl přístupem cílené mutagenese vytvořen chimérický kanál TRPV3 s nahrazenou nekonzervovanou oblastí N251-E257 za odpovídající sekvenci potkaního TRPV1. Teplotní citlivost chiméry byla testována elektrofyziologickou technikou patch-clamp v uspořádání měření z celé buňky.

#### 4.1.1 Teplotní aktivace TRPV3 je funkčně závislá

Již dříve bylo ukázáno, že iniciační aktivace myšního TRPV3 receptoru vyžaduje teploty přesahující 50 °C a aktivační práh spolu s citlivostí (směrnicí) teplotní závislosti klesá při opakované stimulaci (6). Pro potvrzení funkční závislosti teplotní aktivace lidského ortologu TRPV3 heterologně transfekovaného pomocí MATra do HEK293T buněk byla použita metoda patch-clamp. Pomocí teplotního stimulatoru (21) byl na buňky aplikován kontrolní extracelulární roztok (150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES), jehož teplota byla lineárně zvyšována z 25 °C až k 60 °C v 3s intervalech s maximální rychlostí ohřevu 35 °C.s<sup>-1</sup>. Intracelulární roztok obsahoval 140 mM CsCl, 10 mM HEPES, 1 mM EGTA. V prvním kroku byly měřeny proudové odpovědi na tři opakované teplotní pulzy od 25 °C do teploty buď nedosahující 50 °C (Obr. 1 vlevo), nebo přesahující 50 °C (Obr. 1 vpravo). Pro určení maximální aktivační kapacity kanálu byly v obou případech buňky následně stimulovány třemi

teplotními pulzy v přítomnosti směsi dvou aktivátorů TRPV3, 2-APB (100  $\mu$ M) a karvakrolu (100  $\mu$ M).



**Obr.1: Počáteční aktivace lidského TRPV3 vyžaduje teploty přesahující 50 °C.** Reprezentativní proudové odpovědi TRPV3 vyvolané teplotními stimuly získané technikou patch-clamp v uspořádání měření z celé buňky TRPV3 přirozeného typu při napětí -70 mV v absenci či přítomnosti směsi agonistů (100  $\mu$ M 2-APB + 100  $\mu$ M karvakrol). Vlevo, teploty pod 50 °C. Vpravo, teploty nad 50 °C.

Při opakované stimulaci TRPV3 kanálů přirozeného typu teplotními lineárními pulzy dosahujícími  $\sim 48$  °C byly vyvolány pouze velmi malé proudové odpovědi ( $154 \pm 21$  pA;  $n = 9$ ) se slabou teplotní závislostí v rozsahu 45-48 °C ( $Q_{10}$ , teplotní koeficient  $2.8 \pm 0.3$ ) (Obr. 1 vlevo). Naproti tomu směs agonistů vyvolala velké proudy již při teplotě 25 °C ( $5.3 \pm 0.3$  nA;  $n = 9$ ), které byly při  $\sim 40$  °C saturovány ( $9.8 \pm 1.7$  nA). Po odmytí agonisty se hladina membránového proudu vrátila na bazální úroveň. Další teplotní stimulace v kontrolním roztoku vyvolala opět jen malé odpovědi. Pokud však počáteční aktivační teplota přesáhla 50 °C, proudové odpovědi měly odlišný charakter, první teplotní odpověď dosahovala průměrné amplitudy  $1.7 \pm 0.6$  nA ( $n = 25$ ). Zatímco maximální proudové odpovědi se při opakované teplotní stimulaci zvyšovaly, práh pro aktivaci teplem se snižoval. Z těchto výsledků bylo zřejmé, že vysoká teplota přesahující 50 °C aktivuje lidský TRPV3 specificky a robustně. Při proložení lineární části proudově-teplotní závislosti (Arrheniův graf) přímkou dosahoval medián první teplotní odpovědi maximálního teplotního koeficientu  $Q_{10}$  22.2 (první a třetí kvartil 11.7 a 33.9) v intervalu teplot  $51.7 \pm 1.2$  °C až  $53.9 \pm 1.1$  °C. Hodnota mediánu  $Q_{10}$  následující odpovědi se statisticky významně snížila na 10.6

(první a třetí kvartil 7.2 a 12.6;  $n = 14$ ;  $P = 0.004$ , párový t-test) beze změny v teplotním rozsahu aktivace (od  $52.5 \pm 1.1$  °C do  $55.7 \pm 1.2$  °C). V lineární oblasti nižších teplot ( $25.9 \pm 0.4$  °C až  $34.4 \pm 1.2$  °C) se průměrná hodnota  $Q_{10}$  první teplotní odpovědi ( $1.8 \pm 0.1$ ) statisticky významně nelišila od druhé teplotní odpovědi ( $1.6 \pm 0.1$ ;  $P = 0.222$ ).

Naše data podporují dřívější zjištění získaná na myším TRPV3 (6) a navíc prokazují, že také lidský TRPV3 je aktivován vysokými teplotami, jejichž iniciální aktivační práh přesahuje 50 °C. Podobně jako myši TRPV3, lidský ortolog při opakované aktivaci silně senzitivizuje funkčně závislým způsobem.

#### *4.1.2 Třetí smyčka ankyrinové domény určuje funkční závislost teplotní senzitivizace TRPV3*

V dalším kroku jsme zkonstruovali mutantní formy lidského TRPV3 (hTRPV3), v nichž byla současně, nebo individuálně nahrazena rezidua v nekonzervované oblasti třetí smyčky ankyrinové domény analogickými rezidui potkaního ortologu TRPV1 (rTRPV1). Nejprve jsme vygenerovali plně chimérický kanál se sedmi záměnami TRPV3/V1(251-257), ve kterém byla nahrazena sekvence NPKYQHE sekvencí KKTKGRP a tento konstrukt byl funkčně charakterizován protokolem s teplotními lineárními pulzy od 25 °C do teplot přesahujících 50 °C. Teplotně vyvolané membránové proudy zprostředkované chimérickými TRPV3 kanály vykazovaly tonickou aktivitu při teplotě 25 °C a senzitivizovaly již při první teplotní stimulaci. Grafy průměrné normalizované závislosti proudu na teplotě vykazovaly v porovnání s přirozeným typem TRPV3 strmější sklon při teplotách okolo 40 °C a pozvolný sklon při teplotách vyšších.

Abychom upřesnili místo, které se rozhodujícím způsobem podílí na senzitivizovaném fenotypu kanálu, vytvořili jsme v dalším kroku dva chimérické konstrukty TRPV3, ve kterých byly zaměněny oblasti receptoru N251-Y254 a Q255-G257. Zatímco se mutace TRPV3/V1(255-257) nelišila od TRPV3 přirozeného typu, TRPV3/V1(251-254) vykazoval senzitivizovaný fenotyp. Maximální proudová odpověď vyvolaná první teplotní aplikací v kontrolním extracelulárním roztoku se nelišila od proudové odpovědi vyvolané aplikací směsi agonistů při 25 °C ( $P = 0.200$ , párový t-test;  $n = 13$ ), zatímco u přirozeného typu TRPV3 vzrostla proudová odpověď v přítomnosti směsi agonistů přibližně 16-krát ( $n = 15$ ).

Hodnota maximálního teplotního koeficientu  $Q_{10}$  první teplotní odpovědi se statisticky významně nelišila od hodnoty maximálního teplotního koeficientu  $Q_{10}$  následujících teplotních odpovědí (hodnoty mediánu 14.5 a 15.5;  $P = 0.804$ , párový t-test;  $n = 13$ ).

Analýza rozptylu jednoduchého třídění, one-way ANOVA, jednoznačně potvrdila rozdíly mezi konstrukty. Maximální hodnota  $Q_{10}$  a teplotní práh specifické aktivace chimerního receptoru byly statisticky významně sníženy u TRPV3/V1(251-257) a trojmutantního TRPV3/V1(251-254) kanálu ( $P < 0.001$ ), nikoliv u TRPV3/V1(255-257). Z toho důvodu se naše pozornost dále zaměřila na rezidua z oblasti 251-254.

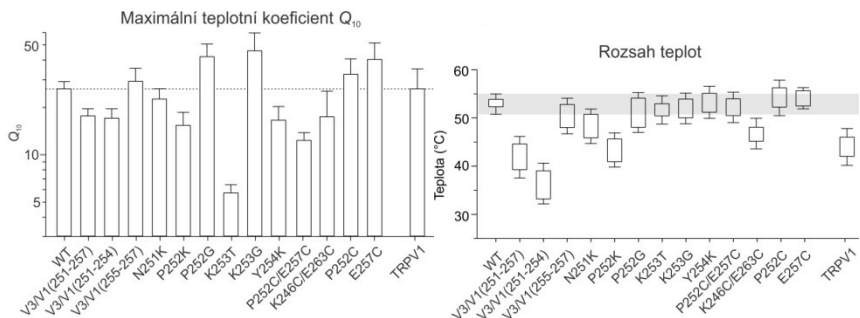
V další fázi projektu byla prozkoumána funkční úloha aminokyselin N251, P252, K253 a Y254 v teplotní aktivaci TRPV3. Výsledky ukázaly, že v oblasti třetí smyčky je pro funkci receptoru rozhodující velikost a flexibilita aminokyseliny v poloze 252, v menším rozsahu 253.

Abychom podrobněji zjistili mechanismus, kterým identifikovaná oblast třetí smyčky přispívá k teplotní aktivaci TRPV3 kanálu, dvojice reziduí ležící dle dostupného strukturního modelu (23) v těsné blízkosti jsme nahradili cysteiny: P252C/E257C a K246C/E263C.

Dvojmutace P252C/E257C statisticky významně ( $P = 0.004$ ;  $n = 5$ ) snížila sklon teplotní závislosti proudových odpovědí (na  $12.3 \pm 1.5$ ), zatímco proudy vyvolané kanály s jednocysteinovými záměnami P252C a E257C nebyly statisticky odlišné od kanálu přirozeného typu.

Pro účely porovnání míry senzitivace a teplotního prahu specifické aktivace kanálů byly vyhodnoceny maximální teplotní koeficienty  $Q_{10}$  a příslušné teplotní intervaly, ve kterých byla Arrheniova závislost lineární (korelační koeficient  $r^2$  0.98-0.99).

Statistické porovnání hodnot maximálních teplotních koeficientů  $Q_{10}$  a příslušných rozsahů teplot pro všechny testované konstrukty TRPV3 a pro potkaní TRPV1 je na obrázku 2.



**Obr.2: Statistické vyhodnocení  $Q_{10}$  a příslušných teplotních intervalů pro mutace ze třetí smyčky.** Vlevo, souhrnné maximální teplotní koeficienty pro všechny testované chiméry a mutace ve srovnání s lidským TRPV3 a potkaním TRPV1 přirozeného typu. Přerušovaná čára vyznačuje maximální  $Q_{10}$  TRPV3 přirozeného typu. Vpravo, průměrné rozsahy teploty, za kterých byla Arrheniova závislost lineární (korelační koeficient  $r^2$  0.98-0.99) a které byly použity pro výpočet maximálního  $Q_{10}$ . Šedá zóna ohraničuje spodní a horní limity teplotních rozsahů pro TRPV3 přirozeného typu.

Výsledky našich experimentů ukázaly, že nekonzervovaná oblast třetí smyčky ankyrinové domény je oblastí silně ovlivňující vlastnosti, teplotní práh i charakter teplotní závislosti TRPV3 receptoru. Intramolekulární kontakty ve třetí smyčce jsou jen částečně zodpovědné ze senzitivovaný fenotyp kanálu. Vzhledem k tomu, že konstrukty P252C a P252G vykazovaly stejný fenotyp jako TRPV3 kanál přirozeného typu, senzitivovaný fenotyp kanálu je dán spíše změnou velikosti rezidua na pozici 252 nežli změnou lokální flexibility.

#### 4.1.3 Cytoplazmatické rozhraní mezi podjednotkami řídí vrátkování TRPV3

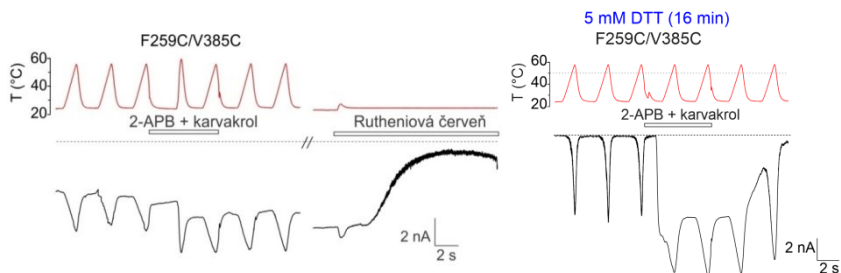
Dostupné struktury TRPV kanálů (24-30) odhalují blízkost centrální části třetí smyčky ankyrinové domény s  $\beta$  skládaným listem tvořeným  $\beta$  vlásenkou N-koncové membránové proximální domény (MPD) a C-koncovou smyčkou, který se obtáčí okolo  $\beta$  vlásenky a vytváří  $\beta$  skládaný list (24, 25).

Z porovnání struktur (24) myšího TRPV3 kanálu v otevřeném a v zavřeném stavu je patrný posuv sousedních podjednotek na rozhraní mezi

třetí smyčkou ankyrinové domény a  $\beta$  skládaným listem vedlejší podjednotky. Nejvýraznější změny vzdálenosti  $C\alpha$  atomů na rozhraní podjednotek byly pozorovány mezi F259 a Y382 (otevřený 8.3 Å, zavřený 9.6 Å), F259 a V385 (otevřený 6.6 Å, zavřený 7.3 Å) a H256 a E736 (otevřený 7.3 Å, zavřený 8.1 Å). Publikovaná struktura otevřeného stavu kanálu byla získána v přítomnosti agonisty 2-APB, a proto jsme si položili otázku, zda k podobnému posunu podjednotek může dojít i při aktivaci teplem.

Připravili jsme proto konstrukty, ve kterých byly prostorově blízké aminokyselinové zbytky nahrazeny cysteiny (F259C/Y382C, F259C/V385C, H256C/E736C a P252C/Y382C/W380C) s cílem umožnit tvorbu disulfidických můstků, a testovali jsme vlastnosti teplotní aktivace konstruktů.

Buňky exprimující F259C/V385C nebo F259/Y382C vykazovaly vysoký klidový proud při teplotě 25 °C na membránovém potenciálu -70 mV, jež byl zcela blokovatelný nespecifickým blokátorem TRP kanálů rutheniovou červení (10  $\mu$ M). Teplotní odpovědi zprostředkované F259C/V385C a v menší míře F259/Y382C byly senzitivizovány, což podpořilo naši hypotézu, že kanál může být stabilizován v otevřeném stavu disulfidickými můstky vytvářenými mezi blízkými rezidui na rozhraní podjednotek. Naproti tomu mutace H256C/E736C byla rezistentní k teplotním podnětům tak, že vysoké teploty ~60°C vyvolávaly jen malé proudové odpovědi. E736C se statisticky významně nelišil od H256C/E736C, což vyloučilo hypotézu funkčně významné tvorby disulfidických můstků mezi těmito dvěma rezidui. Naproti tomu F259C, V385C a Y382A se lišily od cysteinových dvojmutantů a nevykazovaly bazální aktivitu při teplotě 25°C. To nasvědčuje tvorbě disulfidických můstků mezi blízkými rezidui a podporuje naši hypotézu o významu ve stabilizaci otevřeného stavu kanálu. Abychom ověřili existenci disulfidických můstků mezi rezidui F259C a V385C, kultura HEK293T buněk exprimujících F259C/V385C konstrukt byla inkubována v kultivačním médiu s obsahem 5 mM redukčního činidla dithiothreitol (DTT) po dobu 16 minut. Buňky byly následně elektrofyziologicky testovány standardním protokolem. Inkubací dvojcysteinové mutace v DTT byl potlačen bazální proud a navrácena vysoká teplotní citlivost kanálu (Obr. 3).



**Obr.3: Reprezentativní proudové odpovědi TRPV3 s vnesenými záměnami v pozicích F259C/V385C vyvolané teplotními podněty, snímané technikou patch-clamp z HEK293T buněk při membránovém potenciálu  $-70$  mV. Vlevo, konstrukt F259C/V385C vykazoval výraznou bazální aktivitu, která byla zcela blokovatelná nespecifickým blokátorem rutheniovou červeň (10 mM). Vpravo, bazální aktivita F259C/V385C konstruktů byla potlačena inkubací 16 min v 5 mM DTT.**

#### 4.1.4 Modelování molekulární dynamiky TRPV3

Na základě získaných výsledků jsme se pokusili navrhnout hypotézu o možném mechanismu, kterým by signál o teplotním podnětu mohl být ze třetí smyčky ankyrinové domény převáděn do vrátek receptoru a tam ovlivnit vrátkování kanálu. Využili jsme simulace molekulární dynamiky proteinů (viz kapitola 3.13 Simulace molekulární dynamiky). Struktura zavřeného TRPV3 kanálu (PDB ID: 6DVW) byla podrobena molekulárně dynamické simulaci při teplotách 300 K ( $\sim 27$  °C), 330 K ( $\sim 57$  °C) a 400 K ( $\sim 127$  °C). Trajektorie molekul ze simulací v délce 50 ns byly vyhodnoceny a vyobrazeny ve formě stužkového diagramu středních kvadratických odchylek (RMSD).

Z diagramu je patrné, že při zahřátí molekuly se silně zvýší flexibilita smyčky 3 a smyčky 4 ankyrinové domény, zatímco oblast  $\beta$ -skládaného listu, membránová proximální doména a TRP-helix zůstávají poměrně rigidní. Z toho plyne, že rigidní oblast by mohla přenášet teplotní signál ze třetí smyčky ankyrinové oblasti na rozhraní sousedních podjednotek do vrátek kanálu.

#### 4.1.5 Diskuze

Naše výsledky prokazují strukturní blízkost oblasti kolem F259 z cytoplazmatického N-konce TRPV3 receptoru s membránovou proximální doménou vedlejší podjednotky (rezidua V385 a Y382). Pomocí



záměn aminokyselinových reziduí za cysteiny jsme ukázali, že propojení pozic C259 s C385 nebo C382 disulfidickými můstky stabilizuje iontový kanál v otevřeném stavu a dramaticky sníží jeho charakteristiku teplotní závislosti. Na základě porovnání publikovaných struktur myšního TRPV3 v zavřené a otevřené konformaci byla dříve vyslovena hypotéza, že se oblasti tvořící rozhraní mezi podjednotkami při aktivaci chemickým agonistou 2-APB vzájemně posunují (24). Naše výsledky tuto hypotézu podporují a navíc ukazují, že k podobným konformačním změnám může docházet i při aktivaci teplem. Zjistili jsme navíc, že jediná mutace v oblasti rozhraní (E736C) může naopak zvýšit aktivační energii kanálu natolik, že práh pro aktivaci teplem převyšuje 60 °C a současně se sníží zjevná afinita pro agonisty. Jediná mutace tak pravděpodobně může stabilizovat kanál v uzavřeném stavu. Tyto výsledky jsou silně podpořeny nedávnou publikací (31) ve které byly identifikovány interakce mezi reziduí podjednotkového rozhraní, které jsou závislé na chemicky (2-APB) aktivovaném stavu kanálu (Q313, W739, W742, K743 a K169, E751 a D752).

Jak může být převáděna informace o teplotních změnách prostředí z cytoplazmatického rozhraní TRPV3 a ovlivnit tak funkci vrátkování kanálu? A jak mohou záměny v centrální části třetí smyčky ankyrinové domény ovlivnit senzitivovaný stav kanálu? Je známo, že pro správné sbalení ankyrinových repetitív jsou nutné dvě až tři konsenzuální sekvence a při porušení sekvence může dojít ke změně vedení signálu v rámci ankyrinové domény jako celku (30, 32). Funkční změny způsobené mutacemi v našem případě pravděpodobně nejsou způsobeny narušením sbalení ankyrinových repetitív, jelikož třetí smyčka je silně proměnlivou flexibilní oblastí. U strukturně příbuzného teplotně aktivovaného TRPV1 receptoru byly v posledních letech intenzivně studovány molekulární mechanismy teplotní aktivace (33-37) a bylo odhaleno několik domén podléhajících konformačním změnám vlivem teplotní stimulace. Bylo navrženo několik možných mechanismů teplotní aktivace. Podle jedné z teorií (35) je kanál teplotně otevřen poté, co se série konformačních změn vyvolaných teplotním působením přenesou z periferních částí receptoru až do oblasti póru kanálu. Předpokládané pohyby směřující z C-koncové oblasti přes TRP-doménu, membránovou proximální doménu až po raménka transmembránové oblasti, které by mohly být univerzální pro

TRPV rodinu, jsou patrné i z porovnání nedávno publikovaných struktur kanálu v otevřeném a zavřeném stavu (24, 37-39). Zodpovědná rezidua jsou u myšího a lidského TRPV3 konzervovaná a odpovídají reziduíům E334-R375, R363-L373 a E364-T378. Signály z třetí smyčky ankyrinové domény by mohly být přenášeny do vrátek právě těmito kontakty v rámci jedné podjednotky, obdobně jako je tomu u TRPV1, nekonzervovaná klička třetí smyčky TRPV3 je však velmi flexibilní a je s MPD propojena velmi flexibilní oblastí čtvrté a páté smyčky ARD. Jak ukazují naše simulace molekulární dynamiky, signál by mohl být přenášen prostřednictvím rozhraní sousedních podjednotek z třetí smyčky ARD na  $\beta$ -skládaný list složený ze třech vláken vedlejší podjednotky. Tento kontakt by mohl posilovat senzitivovaný stav receptoru a převádět signál na MPD doménu zodpovědnou za teplotní citlivost, dále na S2-S3 raménko, TRP doménu a potenciálně až do vrátek. Důsledkem mutací analyzovaných v rámci naší studie by mohlo být narušení schopnosti vzájemného posuvu v oblasti rozhraní a převodu signálu do vrátek (důsledek mutace F259C/V385C). Kromě toho může mít vliv na stabilitu konformace kanálu v jeho vodivém stavu také hydratace póru (21, 35).

Kromě výsledků se záměnami aminokyselinových zbytků za cysteiny byly pozorovány změny v rovnovážném stavu mezi otevřeným a zavřeným stavem kanálu i u chiméry TRPV3 s TRPV1 sekvencí (251-254), u jednobodových záměn P252K, K253T a jejich kombinací s mutací D414A, lokalizované v MPD. Tato doména byla dříve identifikována jako hlavní činitel funkčně závislé senzitivace TRPV3 (6), naše výsledky však nenasvědčují přímé interakci centrální části třetí smyčky s MPD.

#### **4.2 Funkční regulace TRPV3 kanálu fosforylací**

Na TRPV3 kanálech exprimovaných endogenně v HaCaT buněčných liniích byly metodou patch-clamp snímány membránové proudy v přítomnosti epidermálního růstového faktoru (EGF) a selektivních inhibitorů mitogenem aktivovaných proteinkináz (ERK). Potvrdili jsme, že lidský TRPV3 je regulován receptorem pro epidermální růstový faktor (EGFR) prostřednictvím mitogenem aktivovaných proteinkinázových drah (MAPK) a určili potenciální fosforylační místa v oblasti N-terminální ankyrinové domény.

#### 4.2.1 Predikce a testování potenciálních fosforylačních míst

Za použití kombinace různých predikčních serverů (Predikin, KinasePhos2, ScanSite, PPSP, GPS 3.0, Musite, NetPhorest, Disphos, PKIS) byla vyhledána potenciální fosforylační místa lidského TRPV3 pro ERK kinázu. Celkem bylo na N-konci TRPV3 vyhledáno 8 ERK 1/2 konsenzuálních míst o sekvenci (P $X$ (S/T)P), čtyři z nich obsahující P $X$ SP motiv: Ser<sup>60</sup>, Ser<sup>85</sup>, Ser<sup>88</sup>, Ser<sup>102</sup> a čtyři s P $X$ TP motivem: Thr<sup>35</sup>, Thr<sup>96</sup>, Thr<sup>264</sup>, Thr<sup>343</sup>.

Za použití přístupu cílené mutagenese byla všechna navržená potenciální fosforylační místa individuálně nahrazena kyselinou asparagovou (Asp, D) s úmyslem vnést do vybraných fosforylačních míst záporný náboj. Takto připravené konstrukty plazmidů kódujících mutantní TRPV3 kanály byly individuálně tranzientně transfekovány do HaCaT buněk a podrobeny elektrofyzilogickému měření. Na buňky byl čtyřikrát po dobu 30 s aplikován agonista 2-APB o koncentraci 50  $\mu$ M, po každé aplikaci následovalo odmytí trvající 30 s. Na závěr měření byla po dobu 10 s aplikována směs agonistů o saturující koncentraci (200  $\mu$ M 2-APB a 150  $\mu$ M karvakrol). Proudová odpověď vyvolaná směsí agonistů byla považována za maximální proudovou odpověď saturovaných kanálů a byla používána jako referenční hodnota. Konstrukt T264D vykazoval statisticky signifikantně vyšší amplitudy proudových odpovědí na první aplikaci agonisty než přirozený typ TRPV3. T264D a T343D nebyly senzitivovány při opakované stimulaci 50  $\mu$ M 2-APB. První proudová odpověď mutantu T264D se statisticky nelišila od čtvrté odpovědi a dosahovala asi 7% proudové odpovědi vyvolané aplikací směsi agonistů o saturující koncentraci. Na rozdíl od receptoru přirozeného typu, mutant T264D většinou dosáhl stabilní úrovně již během 30 s proudové odpovědi, která se dále nezvyšovala. Proudové vyvolané opakovanou stimulací 2-APB u kanálů s mutací na pozici T343D byly obtížně detekovatelné a statisticky signifikantně menší v porovnání s ostatními konstrukty. Čtvrtá proudová odpověď vyvolaná agonistou byla stejně velká jako první a dosahovala pouze 0.3 % proudové odpovědi vyvolané směsí agonistů o saturující koncentraci. Také mutant T35D vykazoval signifikantně menší iniciální proudovou odpověď v porovnání s TRPV3 přirozeného typu, ale senzitivoval ve srovnatelné míře jako kanály přirozeného typu, proto na něj nebyla soustředěna další pozornost při hledání hlavního fosforylačního

místa. Až na výjimku konstruktů S85D byly hodnoty proudových odpovědí vyvolaných aplikací směsi agonistů o saturující koncentraci srovnatelné mezi mutantními kanály a kanály přirozeného typu TRPV3. Fosfomimikující mutace T264D senzitivizovala kanál bez změny ve velikosti maximální proudové odpovědi vyvolané saturující koncentrací směsi agonistů, jak jsme očekávali v případě potenciace kanálu MEK kinázou. Z toho důvodu bylo reziduum T264 vybráno za hlavního kandidáta na fosforylační místo pro fosforylaci ERK 1/2 kinázou a zvoleno klíčovým aminokyselinovým zbytkem pro další experimenty vedoucí k objasnění jeho role ve funkci TRPV3 receptoru.

#### *4.2.2 Regulace TRPV3 pomocí ERK fosforylace*

Další část experimentů byla prováděna na tranzientně transfekovaných HEK293T buněčných liniích. Ke změně expresního systému bylo přistoupeno z důvodu, aby se potvrdil fenotyp mutace T264 nezávisle na expresním systému a v neposlední řadě aby bylo zamezeno interferenci s endogenně exprimovanými TRPV3 kanály v HaCaT buněčných liniích.

Pro měření proudových odpovědí z kanálů nesoucích mutaci na pozici T264 byl použit analogický protokol jako při stimulaci HaCaT buněk. Testovány byly kanály TRPV3 přirozeného typu, mutace T264D, a také nově připravené kanály s fosfomimikující mutací T264E a mutací T264A, u které jsme předpokládali, že zamezí fosforylaci. Všeobecný charakter proudových odpovědí přirozeného typu TRPV3 a T264D se shodoval s experimenty na HaCaT buňkách. Proudové odpovědi vyvolané první aplikací agonisty 2-APB u T264D byly statisticky významně vyšší v porovnání s TRPV3. Při opakované stimulaci nesenzitivizoval T264D ani T264E, jejich první a čtvrté proudové odpovědi se statisticky významně nelišily. Zatímco proudové odpovědi kanálů přirozeného typu dosahovaly při čtvrté aplikaci trojnásobku velikosti odpovědi iniciální, u mutace T264A vzrostly dvakrát. První až čtvrtá proudová odpověď T264D byla statisticky významně vyšší v porovnání s kanály přirozeného typu, zatímco velikosti proudových odpovědí vyvolaných saturující koncentrací směsi agonistů nebyly u žádných mutací signifikantně rozdílné od kanálu přirozeného typu. Tyto výsledky podporují naši hypotézu, že T264 je potenciálním fosforylačním místem TRPV3 receptoru.

#### 4.2.3 Nadměrná exprese ERK1 podporuje specifickou fosforylaci Thr264

V dalším kroku byly TRPV3 přirozeného typu a kanály s mutací T264A koexprimovány s ERK1 kinázou v HEK293T buňkách za účelem objasnit, zda ERK kináza funkčně ovlivňuje TRPV3 kanál. Zvýšená exprese ERK1 měla za následek velký nárůst proudových odpovědí vyvolaných 2-APB v buňkách exprimujících přirozený typ TRPV3, které při opakované stimulaci nesenzitizovaly a podobaly se svým fenotypem fosfomimikujícím mutacím T264D a T264E. Proudové odpovědi konstruktů T264A se naproti tomu nezměnily. Průměrné amplitudy proudových odpovědí vyvolaných saturující koncentrací směsi agonistů se při zvýšené expresi ERK1 v obou případech statisticky nelišily ( $P = 0.230$ ). Výsledky naznačují, že threonin 264 je možným místem fosforylace TRPV3 receptoru zprostředkované ERK1 kinázou.

#### 4.2.4 Snížení míry potenciace indukované EGF u mutace T264A

Abychom ověřili úlohu threoninu 264 v podmínkách blízkých nativnímu prostředí, porovnávali jsme odpovědi TRPV3 přirozeného typu a T264A přechodně exprimovaných v HaCaT buňkách. Buňky byly opakovaně stimulovány nízkou koncentrací (50  $\mu\text{M}$ ) 2-APB. Aplikace agonisty trvala pokaždé 10 s (následovaná omýváním extracelulárním roztokem s intervalem 30 sekund mezi aplikacemi agonisty). Po čtyřech opakováních byly buňky inkubovány 1 min v EGF (20  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) a po skončení inkubace byly opět standardně stimulovány nízkou koncentrací 2-APB. Na závěr měření byla aplikovaná po dobu 10 s směs agonistů o saturující koncentraci 200  $\mu\text{M}$  2-APB a 150  $\mu\text{M}$  karvakrol. V porovnání s amplitudou první odpovědi TRPV3 na 2-APB, vzrostla 8. odpověď šestkrát, zatímco u T264A pouze čtyřikrát. Čtvrtá odpověď na 2-APB po inkubaci buněk v EGF dosáhla 11 % odpovědi na saturující koncentraci směsi agonistů v případě přirozeného typu kanálu, ale jen 2 % v případě kanálu s mutací T264A.

V souhrnu naše výsledky potvrzují klíčový význam rezidua T264 v potenciaci TRPV3 působením EGF.

#### 4.2.5 Diskuze

Studie, ve které jsme určovali hlavní fosforylační místo TRPV3 pro ERK1/2 kinázu, vycházela z původního pozorování Cheng a kol. (20),

kteří odhalili regulační mechanismus aktivace TRPV3 prostřednictvím EGFR receptoru v keratinocytech u myši. Podařilo se nám potvrdit podobná pozorování i pro TRPV3 exprimované v buňkách HaCaT, odvozených z lidských keratinocytů. Autoři v původní studii navrhli, že aktivace EGFR prostřednictvím signalizačních drah PLC a částečně MAPK zvyšuje aktivitu TRPV3. V našich pokusech jsme potvrdili zapojení těchto signalizačních drah v potenciaci TRPV3 v HaCaT buňkách inkubovaných v EGF aplikaci inhibitorů MEK (U0126, PD98059), která je součástí MAPK kaskády. Dále se nám podařilo ukázat, že v prostředí prostém  $\text{Ca}^{2+}$  tyto inhibitory zcela brání potenciaci vyvolané EGF, to by naznačovalo, že senzitivace TRPV3 by mohla být řízena MAPK signalizační dráhou nezávisle na PLC signalizační dráze.

Při bližším zkoumání fosforylačních míst se nám v rámci další studie podařilo odhalit hlavní aminokyselinový zbytek threonin 264, který je lokalizován na N-konci třetí smyčky ankyrinové domény. Threonin 264 je hlavním fosforylačním místem TRPV3 v senzitivaci zprostředkované ERK1 kinázou. Z porovnání sekvencí ankyrinových domén pro známé TRPV kanály je zřejmé, že threonin 264 se nachází v oblasti konzervované jen v rámci TRPV3 proteinů (23), regulace prostřednictvím tohoto rezidua je nejspíše specifická pro TRPV3.

Autoři krystalové struktury ARD domény TRPV3 (23) publikovali atypickou konformaci třetí smyčky, která je sklopená přes druhou smyčku a je interakcemi s AR3 v této pozici stabilizována. Nejnovější struktury celého receptoru zveřejněné v nedávné době (24, 25) však tuto konformaci nezaznamenávají a zdá se, že původně určená atypická konformace je buď krystalizačním artefaktem, nebo se mění v důsledku přítomnosti vedlejší podjednotky. Autorům atypického uspořádání (23) se však také podařilo funkčně dokázat, že porušením hydrofobních interakcí stabilizujících tuto atypickou konformaci dojde k vážnému poškození citlivosti TRPV3 k agonistovi 2-APB. Threonin 264 přímo sousedí se stabilizační oblastí třetí smyčky, je tedy možné, že interakcí threoninu 264 s ERK1 se mění konformace smyčky, a že tato strukturální změna významně ovlivňuje funkčnost celého kanálu. Blízkost T264 a asparaginu N242, odkud je TRPV3 účinně regulován prolyl hydroxylací (40), ještě více podporuje naši představu o souvislostech buněčných signalizačních drah zapojených v udržení kožní homeostáze.

### **4.3 Oblast TRPA1 receptoru interagující s membránovými fosfolipidy reguluje aktivaci TRPA1 na fyziologických membránových potenciálech**

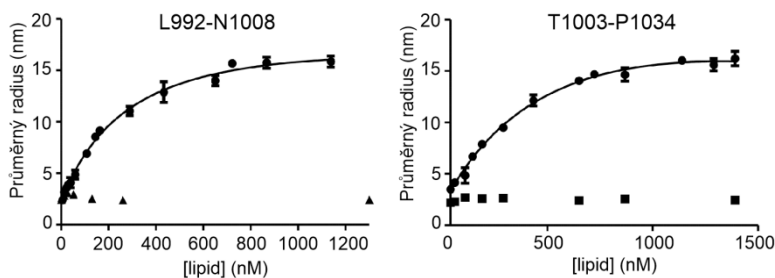
Tato část předložené práce navazuje na předchozí studie laboratoře, ve kterých se podařilo prokázat ovlivnění funkce TRPA1 kanálu interakcí s membránovými fosfolipidy. Byla identifikována řada pozitivně nabitých aminokyselin v oblasti C-konce, která interagují s membránovými fosfolipidy (41) a zjištěna vysoká afinita peptidu o sekvenci odpovídající oblasti I964-L992 TRP-like domény k membránovému  $PIP_2$  (42). Z později publikované struktury TRPA1 vyplynulo, že  $PIP_2$  kromě této oblasti může interagovat s receptorem také v prostoru mezi podjednotkami, v místě postranní fenestrace, tj. intracelulární oblasti rozhraní mezi podjednotkami, vytvářející prostor pro kontakt receptorů s membránovými lipidy (43). Pomocí serveru AntiBP (<http://crdd.osdd.net/raghava/antibp/index.html>) byla na základě primární sekvence určena oblast proximálního C-konce TRPA1 jako oblast s antibakteriální aktivitou, tedy potenciálně interagující s  $PIP_2$ . Dostupná cryo-EM struktura receptoru (PDB 3J9P) v maximálním rozlišení 4.24 Å má špatně rozlišenou oblast kličky Y1006-Q1031. Pro další analýzu byly navrženy peptidy na základě dvou vybraných sekvencí dosahujících vysokého skóre pravděpodobnosti antibakteriální aktivity a tedy potenciální interakce s membránovými fosfolipidy: první sekvence odpovídající oblasti strukturně nerozlišené části receptoru T1003-P1034, druhá L992-N1008 odpovídající části TRPA1 vázající kalmodulin (13), překrývající částečně C-konec první sekvence. Cílem studie bylo objasnit, zda navržené peptidy mohou interagovat s  $PIP_2$ , zda se vazebné místo pro  $PIP_2$  či jiné membránové fosfolipidy může překrývat s vazebným místem pro kalmodulin a o toto vazebné místo účinně kompetovat při aktivaci receptorů.

#### *4.3.1 Povrchová vazba peptidů k membránovým fosfolipidům s $PIP_2$*

Abychom zjistili, zda navržené peptidy mohou interagovat s membránovými fosfolipidy, využili jsme kombinaci různých biofyzikálních přístupů ve spolupráci s pracovištěm Dr. Isabely Alves v Bordeaux. V případě modelové membrány složené z čistého POPC nebyly zaznamenány žádné změny v posunu pozic rezonancí, tedy nedocházelo k interakci mezi planární membránou a peptidy při zvyšujících se

koncentracích až do 10  $\mu\text{M}$ . V případě modelové membrány s obsahem 5 %  $\text{PIP}_2$  docházelo se zvyšující se koncentrací peptidů ke změnám v s- a p- rezonancích. Přestože bylo možné křivky proložit teoretickou hyperbolicou saturační křivkou, vzhledem k rozlišovací schopnosti přístroje ( $\leq 5$  mdeg) nebylo možné určit rovnovážnou disociační konstantu  $K_D$  mezi peptidy a lipidy. V přítomnosti 20%  $\text{PIP}_2$  a 80% POPC v modelové membráně nedošlo v dalším navýšení amplitudy rezonance.

Pro určení  $K_D$  byla využita technika MDS, kdy je sledována změna velikosti SMALP v návaznosti na interakci s peptidy. Data jsou konzistentní s PWR, peptidy se nevázaly ke SMALP složených pouze z POPC. V případě SMALP o složení POPC/ $\text{PIP}_2$  (9/1 mol.mol<sup>-1</sup>) byla prokázána vazba obou peptidů s afinitami v rozmezí 300 – 700 nM (Obr. 4, Tab. 1).



**Obr.4: Interakce peptidů L992-N1008 a T1003-P1034 se SMALP složenými z POPC (trojúhelníky a čtverce) nebo směsí POPC/ $\text{PIP}_2$  9/1 mol.mol<sup>-1</sup> (kolečka) měřené metodou MDS. Průměrný hydrodynamický radius při titraci peptidu SMALP zaznamenaný po každém navýšení koncentrace lipidů. Chybové úsečky značí SD, byly provedeny 3 opakování pro každý typ experimentu.**

Následně byl pomocí stejné techniky pozorován vliv přítomnosti vápenatých iontů (2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) na afinitu interakce mezi SMALP o složení POPC/ $\text{PIP}_2$  (9/1 mol.mol<sup>-1</sup>) a oběma peptidy (Tab. 1). Přítomnost vápenatých iontů v pufru snížila afinitu obou peptidů ke SMALP s obsahem  $\text{PIP}_2$ .



**Tab.1:** Vazebné afinity (uvedené v nM koncentracích) získané pomocí MDS pro peptidy L992-N1008 a T1003-P1034 ke SMALP složených z POPC a směsi POPC/ PIP<sub>2</sub> v prostředí prostém vápenatých iontů a v jejich přítomnosti. Data jsou uvedena jako střední hodnota ± SD (n = 3).

LIPID/PEPTID	L992-N1008	T1003-P1034
POPC	bez vazby	bez vazby
POPC/PIP <sub>2</sub> (9/1 mol.mol <sup>-1</sup> ) bez Ca <sup>2+</sup>	330 ± 68	685 ± 114
POPC/PIP <sub>2</sub> (9/1 mol.mol <sup>-1</sup> ) s 2 mM Ca <sup>2+</sup>	425 ± 95	720 ± 123

Peptid L992-N1008 vykazoval vyšší afinitu než T1003-P1034, což je zřejmě dáno vyšším nábojem (2 pro L992-N1008, 1 pro T1003-P1034), a tedy silnějšími elektrostatickými interakcemi mezi peptidem a negativně nabitým fosfolipidem.

Pro potvrzení vazby k lipidům a ve snaze určit sekundární strukturu peptidu s vyšší afinitou (L992-N1008) byla použita technika *pATR-FTIR*. Peptid vykazoval podobné pozice vazeb a dichroický poměr CH<sub>2</sub> valenčních vibrací symetrických (2852 cm<sup>-1</sup>) a antisymetrických (2923 cm<sup>-1</sup>) v obou polaritách. Signály pro amid I (1640 cm<sup>-1</sup>) a amid II (1535 cm<sup>-1</sup>) pozorované po inkubaci se po odmytí snížily na úroveň detekčního limitu metody, proto nemohla být tato metoda využita k určení sekundární struktury a orientace peptidu L992-N1008.

V dalším kroku byla testována míra narušení integrity LUV s obsahem PIP<sub>2</sub> přítomností peptidů L992-N1008 a T1003-P1034 metodou fluorescenční analýzy měřením fluorescence internalizovaného sulforhodaminu B. Slabá pertubace membrány byla potvrzena i výsledky *pATR-FTIR* a PWR, kdy další zvyšování obsahu PIP<sub>2</sub> v modelové membráně nezvýšilo signál, ani nezměnilo rezonanci. Nebyl pozorován žádný únik sulforhodaminu B z lipozomů ani při nejvyšším použitím poměru peptid/lipid (P/L) 1/10.

Z našich výsledků vyplývá, že k interakci mezi peptidy a lipidy dochází pouze v přítomnosti PIP<sub>2</sub> a vazba je pouze povrchová, nejpravděpodobněji dochází k elektrostatickým interakcím mezi anionaktivními lipidy a kladně nabitými peptidy.

#### 4.3.2 Domněle interagující oblast TRPA1 s PIP<sub>2</sub> kompetuje o místo s komplexem Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin

V nedávné době bylo ukázáno, že komplex Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin se váže na TRPA1 v oblasti L992-L1008 a zvyšuje aktivaci kanálu při fyziologických membránových potenciálech (13). Jaká je úloha PIP<sub>2</sub> v nociceptivních neuronech za fyziologických podmínek je stále předmětem intenzivního studia. Je známo, že PIP<sub>2</sub> reguluje aktivitu mnoha receptorů včetně TRPV1, který je exprimován společně s TRPA1 (14). Testovali jsme možnost, že PIP<sub>2</sub> se může za nativních podmínek vázat na stejné místo TRPA1 receptoru, ze kterého je komplex Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin uvolněn v závislosti na hladině intracelulární koncentrace Ca<sup>2+</sup>.

Pro zachování podmínek blízkých nativnímu prostředí byla elektrofyziologická měření prováděna na F11 buněčných liniích, které jsou hybridními somatickými buňkami embryonálních potkaních zadních kořenů mišních a myších neuroblastomů. Předpokládali jsme, že pokud Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin kompetuje s PIP<sub>2</sub> o stejné vazebné místo, měla by nitrobuňčná perfúze specifickými peptidy (L992-L1008 nebo T1003-P1034) prokazovat dominantně negativní účinek na aktivitu TRPA1, tj. vázat se na receptor a snížit tak účinnost nejen Ca<sup>2+</sup>/kalmodulinu (13), ale také na PIP<sub>2</sub>. Účinek zvýšení intracelulárního množství peptidů by měl být závislý na nitrobuňčné koncentraci Ca<sup>2+</sup>.

Proudové odpovědi snímané bezprostředně (30-50 s) po protržení membrány měly zřetelně pomalejší aktivační fázi než odpovědi buněk, u kterých byla dodržena doba 5-6 min perfúze intracelulárním roztokem. Na konci 10s aplikace byla amplituda odpovědi na karvakrol statisticky významně nižší u kontrolních buněk (median 8.5 pA/pF; n = 12) oproti buňkám snímaným s intracelulárním roztokem obsahujícím peptid T1003-P1034 (median 18.7 pA/pF; n = 6, P = 0.044). Přidání 500 μM Ca<sup>2+</sup> do extracelulárního roztoku zvýšilo přibližně 8-krát odpověď snímanou 30-50 s po protržení buňky. Nebyla nalezena žádná korelace mezi amplitudami proudových odpovědí a potenciací vyvolanou přítomností vápenatých iontů (Spearmanův korelační koeficient -0.0979, P = 0.749; n = 12). Přítomnost peptidu T1003-P1034 v intracelulárním roztoku statisticky významně (P = 0.028, n = 6) snížil míru potenciace TRPA1 vyvolané vápenatými ionty, obdobně jako bylo již dříve popsáno u peptidu L992-N1008 (13).

Tyto výsledky naznačují, že sekvence L992-N1008 a T1003-P1034 jsou důležitou oblastí TRPA1 receptoru uplatňující se v potenciaci vápenatými ionty. Výsledky rovněž podporují hypotézu, že komplex  $\text{Ca}^{2+}$ /kaldmodulin může účinně kompetovat o stejné (nebo částečně se překrývající) vazebné místo s  $\text{PIP}_2$ .

#### 4.3.3 Změny ve struktuře receptoru vyvolané přítomností $\text{PIP}_2$

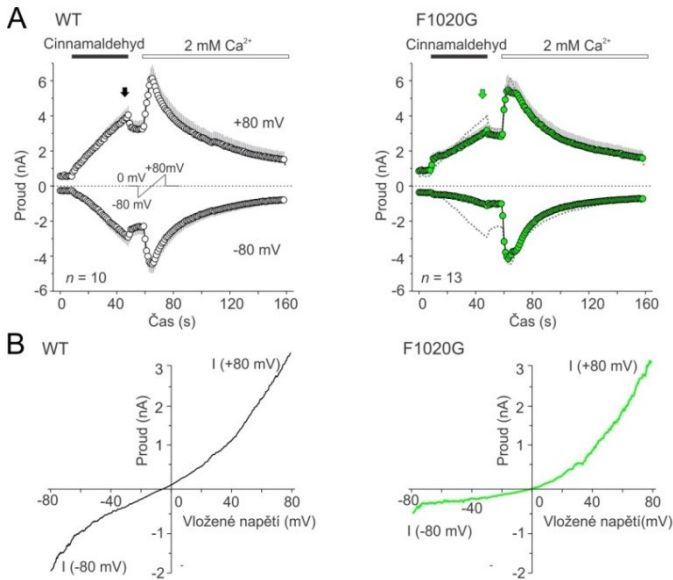
Dostupná struktura TRPA1 receptoru není doposud zcela rozlišena v oblasti Y1006-Q1031. Pomocí serveru PSIPRED (44) byla predikována sekundární struktura této části receptoru. Predikce s vysokou jistotou určila helikální charakter oblasti F1017-L1023 peptidu T1003-P1034. Z Coulombovy hustoty proložené strukturou TRPA1 získanou pomocí kryoelektronové mikroskopie je patrné, že nerozlišená část receptoru obsahuje ve flexibilní oblasti T1003-P1034 raménka sekundární strukturu obsahující helix. Je zřejmé, že struktura nerozlišené části receptoru by mohla být s  $\text{PIP}_2$  v kontaktu. Jejich vzájemné strukturní ovlivnění bylo předmětem dalších experimentů.

Se záměrem potvrdit sekundární strukturu nerozlišené části receptoru a objasnit její změny v přítomnosti  $\text{PIP}_2$  byly peptidy podrobeny spektroskopickým experimentům cirkulárního dichroizmu. Ze získaných dat lze usoudit, že oba peptidy jsou vysoce nestrukturované se zastoupením  $\beta$ -skládaného listu. U peptidu L992-N1008 bylo prokázáno také zastoupení helikální struktury. Z dat vyplývá, že při interakci nedochází ke změnám při přechodu peptidů z prostředí složeného z POPC do POPC/ $\text{PIP}_2$  (5% a 20%  $\text{PIP}_2$ ) v poměrech v rozsahu 1/50 až 1/10 P/L. Pomocí BeStSel algoritmu (45) bylo vypočteno zastoupení sekundárních struktur s obsahem 0.8-6.9 %  $\alpha$ -helixu, 26.2-34.2 % antiparalelního  $\beta$ -skládaného listu, 15.3-17 % očky a 47.7-54.1 % neuspořádané struktury.

#### 4.3.4 Konzervovaný F1020 přispívá ke stabilizaci vrátek TRPA1

Z porovnání sekvencí oblasti proximálního C-konce TRPA1 proteinu 65 různých druhů obratlovců je patrná vysoká konzervovanost fenylyalaninu F1020. Tento aminokyselinový zbytek je situován v centrální části určeného krátkého helikálního úseku, který je v těsné (~5 Å) blízkosti funkčně důležitých oblastí receptoru: páté transmembránové domény (R875) a S2-S3 kličky (F800 a M801). Konzervovaný fenylyalanin F1020 byl nahrazen glycinem s cílem narušit predikovanou helikální strukturu.

Přirozený TRPA1 a mutace F1020G byly tranzientně transfekovány do HEK293T buněk za pomoci MATra (magnetem asistovaná transfekce) částic a následně funkčně testován pomocí elektrofyziologické techniky patch-clamp v režimu snímání z celé buňky. Byly snímány membránové proudy vyvolané parciálním agonistou cinnamaldehydem (100  $\mu$ M) aplikovaným v extracelulárním roztoku bez vápenatých iontů a poté byl aplikován extracelulární roztok obsahující 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (Obr. 5). Na buňky byl současně aplikován frekvencí 1Hz napěťový pulz jdoucí lineárně od -80 mV na +80 mV rychlostí 1  $\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$ . Mutace F1020G oproti přirozenému TRPA1 (WT) vedla k silnému umístění proudů měřených bez přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  na záporných potenciálech, jak je patrné z proudově-napěťové charakteristiky vyhodnocené po 30 s od počátku aplikace agonisty. U konstruktu F1020G dosahoval průměrný proud na záporných membránových potenciálech třetinové hodnoty proudu oproti kanálu přirozeného typu ( $-1.0 \pm 0.1$  nA oproti  $-2.9 \pm 0.5$  nA pro WT,  $P \leq 0.001$ ;  $n = 13$  a 10). V extracelulárním roztoku obsahujícím 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  se amplitudy proudů F1020G nelišily od proudů zprostředkovaných kanály přirozeného typu ( $-4.0 \pm 0.5$  nA oproti  $-4.4 \pm 0.5$  nA při napětí -80 mV;  $P = 0.554$ ; a  $5.6 \pm 0.7$  oproti  $6.1 \pm 0.8$  nA při napětí +80 mV;  $P = 0.637$ ;  $n = 13$  a 10).



**Obr.5: Mutace F1020G ovlivňuje aktivaci TRPA1 vyvolanou chemicky a napětím.** A, Průměrné proudy vyvolané 100  $\mu$ M cinnamaldehydem snímané v režimu z celé buňky technikou patch-clamp z HEK293T exprimujících TRPA1 v prostředí bez Ca<sup>2+</sup> a poté v 2mM Ca<sup>2+</sup>, měřené při lineárně rostoucím napětí od -80 do +80 mV rychlostí 1 V.s<sup>-1</sup>. SEM jsou vyznačeny jako šedé vertikální čáry, *n* je počet buněk. Vlevo, průměrné proudy zprostředkované přirozeným typem TRPA1 (WT). Vpravo, průměrné proudy snímané z buněk exprimujících mutantní konstrukt F1020G. Šedou přerušovanou čarou je podkreslen průměr proudů snímaných z TRPA1 přirozeného typu. B, Proudově-napětíová charakteristika vynesená v časech vyznačených šipkami v A (černá pro WT vlevo, zeleně F1020G vpravo).

Z výsledků je patrné, že F1020 je součástí oblasti proximálního C-konce, která přispívá k aktivaci TRPA1 na záporných (tedy fyziologických) membránových potenciálech zejména v podmínkách slabě aktivovaných stavů receptoru (tj. například v přítomnosti subsaturujících koncentrací agonistů, nebo při změnách redukční/oxidační rovnováhy).

#### 4.3.5 Diskuze

Přestože literatura zabývající se určením úlohy PIP<sub>2</sub> v regulaci TRPA1 je rozsáhlá, není dosud jednotný názor, zda fosfoinositidy jsou pro funkci TRPA1 nezbytné (46), zda je TRPA1 fosfoinositidy inhibován (14, 47, 48), aktivován (49) či jimi není vůbec regulován (50).

Obecně je známo, že fosfoinositidy se k proteinům vážou pomocí elektrostatických interakcí mezi svým kladně nabitým řetězcem a partnerem se záporným nábojem. Na TRPA1 bylo navrženo mnoho možných interakčních míst pro fosfoinositidy (41, 42, 49, 51). Konkrétně pro vazbu PIP<sub>2</sub> byly navrženy prototypické sekvence, tzv. pleckstrin homologní domény, nalezené na aminovém konci (R46-K56, K443-K448, K592-R605) a na distálním karboxylovém konci (K1092-R1097) (49). Podle funkčních studií provedených v minulosti naším týmem (41, 52) a z dostupných strukturních studií (43) se z tohoto hlediska jeví C-konec jako velmi pravděpodobná regulační oblast TRPA1. Witschas a kol. (42) zmapovali C-konec TRPA1 proteinu za použití speciálního bioinformatického přístupu, serveru AntiBP. Pomocí serveru AntiBP byla s nejvyšším skóre překvapivě předpovězena sekvence F1017-Q1031, která obsahuje jen jednu bazickou aminokyselinu. Dle aminokyselinového složení nenabitě sekvence F1017-Q1031 interagující domény usuzujeme, že interakce s fosfoinositidy by mohla být usnadněna hydrofobními a/nebo aromatickými aminokyselinami. Možným kandidátem hlavního rezidua je fenylalanin F1020, který je silně konzervovaný u více než 65 TRPA1 proteinů savců.

V rámci studie se nám podařilo dokázat, že pro interakci sekvencí L992-N1008 a T1003-P1034 s membránovými fosfolipidy je nezbytná přítomnost PIP<sub>2</sub>. Podařilo se nám ukázat, že vazba je silná, avšak pouze povrchová a při interakci dochází jen k minimálnímu narušení membránové integrity.

Námi studované sekvence se překrývají s vazebným místem pro Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin, které bylo u TRPA1 kanálu v nedávné době identifikováno (13). Je známo, že častým mechanismem regulace kanálů je kompetice PIP<sub>2</sub> a kalmodulinu, ke kterému dochází u TRPV1 (53) nebo jiných iontových kanálů, jako u draslíkových napěťově závislých kanálů typu Kv7 (54). V rámci experimentů se nám podařilo ukázat, že sekvence odpovídající kalmodulin vazebnému místu (L992-N1008) i sekvence částečně se s ním překrývající (T1003-P1034) jsou schopné vázat PIP<sub>2</sub> s klesající afinitou v přítomnosti vápenatých iontů Ca<sup>2+</sup>. Bylo prokázáno, že aktivita TRPA1 kanálu je zvyšována nízkými koncentracemi Ca<sup>2+</sup> a naopak snižována vysokými koncentracemi Ca<sup>2+</sup> (13, 50) a oba procesy závisí na vazbě Ca<sup>2+</sup>/kalmodulinu. Naše výsledky ukazují, že při snížení

koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  pod bazální úroveň se zvyšuje zjevná afinita kanálu k neelektrofilnímu agonistovi karvakuolu. Usuzujeme, že  $\text{PIP}_2$  by na TRPA1 mohl za bazálních koncentrací  $\text{Ca}^{2+}$  kompetovat o vazebné místo pro  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmmodulin. V této souvislosti je zajímavá skutečnost, že mezi pacienty trpícími astmatem byl identifikován polymorfismus na pozici histidinu 1018 (H1018R), který se nalézá jen dvě místa od F1020. Za jakých fyziologických stavů by mohla být regulace TRPA1 pomocí  $\text{PIP}_2$  relevantní? V našich experimentech (55) záměna histidinu 1018 za arginin zvýšila afinitu TRPA1 kanálu k  $\text{PIP}_2$  a měla za následek pozměněné vrátkování kanálu na fyziologických membránových potenciálech.

TRPA1 je aktivován velkým množstvím chemicky rozmanitých pronociceptivních agonistů generovaných za různých patologických bolestivých stavů. Lze proto předpokládat, že cílené ovlivnění TRPA1 antagonisty bude účinnější, než mnoho jiných léčiv zaměřených na jednotlivé nociceptivní signální dráhy. Existují studie, které prokazují, že farmakologické nebo genetické blokování TRPA1 účinně a bez významných vedlejších účinků zmírňuje mechanickou a chladovou přecitlivělost v různých experimentálních modelech patofyziologické bolesti. Potenciální antagonisté TRPA1 působící periferně budou pravděpodobně optimální pro zmírnění primární hyperalgezie (jako je zánět vyvolaný senzitivací periferních nervových zakončení), zatímco centrálně působící antagonisté mohou být vhodné pro zmírnění bolestivých stavů souvisejících s centrální senzitivací (jako jsou sekundární hyperalgezie a taktilní alodynzie způsobené různými typy periferních poranění). Bylo prokázáno, že analgetické a protizánětlivé účinky jednoho z nejvíce využívaných analgetik ibuprofenu jsou zprostředkovány metabolitem ibuprofen-acyl glukuronidem, který působí antagonisticky na TRPA1 receptor (56). Také metabolit nejčastěji používaného analgetika paracetamolu *N*-acetyl-*p*-benzochinonimin, NAPQI, aktivuje a následně funkčně desenzibilizuje TRPA1 (57). Vyhledávání specifických antagonistů TRPA1 je však jen jednou ze současných cest farmakologického výzkumu.

Účinní antagonisté teplotně citlivých TRP kanálů nejen blokují nadměrnou aktivitu receptorů, ale také brání plnění jejich přirozené (obraně) fyziologické úlohy. Značná pozornost se proto v současné době zaměřuje také na vyhledávání možností, jak ovlivnit specifickou modalitu

aktivace receptorů, a to jen tu, která je důsledkem patofyziologických podmínek. Naše výsledky potvrzují, že procesy fosforylace, nebo regulace membránovými lipidy mohou být jedním z budoucích směrů výzkumu.

## **5. Závěry**

Současný rozvoj pokročilých metod kryoelektronové mikroskopie umožnil bližší poznání molekulární podstaty aktivace a modulace TRP receptorů ve vztahu k jejich struktuře. Objasnění mechanismů, kterými se mohou tyto iontové kanály podílet na vzniku řady závažných chronických zánětlivých a bolestivých onemocnění, je nezbytným předpokladem pro vyhledávání nových přístupů a možností jejich farmakologického ovlivnění.

Studie zaměřené na poznání molekulární podstaty teplotní aktivace lidského TRPV3 a jeho regulace signálními drahami upřesňují funkční úlohu rozhraní mezi podjednotkami kanálu a umožňují bližší určení chemické struktury látek s možným blokujícím účinkem. Výsledky předložené dizertační práce přispívají k vysvětlení nežádoucích důsledků lokálního působení tepla, které mohou doprovázet stavy po popálení. Cílené potlačení procesu funkčně závislé senzitivace TRPV3, kterým je zvyšována aktivita receptoru až o několik řádů, by mohlo v klinické praxi představovat významný způsob léčby chronických zánětlivých kožních onemocnění včetně atopické dermatitidy.

Z výsledků dizertační práce vyplývá, že pro aktivitu TRPA1 receptoru je důležité správné složení buněčné membrány a je-li porušeno, receptor může být senzitivován, což je děj, který se uplatňuje při některých neurogenních bolestivých a zánětlivých onemocněních. Tento iontový kanál představuje nejen molekulární detektor pro vnější podněty na nervových zakončeních peptidergenních sensorických neuronů. Je také citlivým senzorem reaktivních forem kyslíku v endoteliálních buňkách uplatňujícím se ve vazodilataci mozkových tepen. Aktivace TRPA1 v keratinocytech, epitelu rohovky a různých typech fibroblastů stimuluje výlev zánětlivých mediátorů. Specifická úloha TRPA1 byla prokázána také v procesech spojených s patogenními infekcemi, v jejichž důsledku vznikají toxické bakteriální produkty.

Současné poznatky o funkci a struktuře teplotně aktivovaných TRP kanálů prokazují, že kromě vyhledávání látek s přímým působením je nutné vzít v úvahu i další možnosti, kterými by bylo možné aktivitu těchto



receptorů specificky ovlivnit. Hlavním cílem základního výzkumu v tomto směru je nejen přesné určení funkčních domén a poznání mechanismů aktivace, ale také identifikace důležitých interakčních proteinů a membránových lipidů, které jsou pro správnou funkci těchto iontových kanálů nezbytné.

## 6. Literatura

1. Minke B. 2010. *Journal of neurogenetics* 24: 216-33
2. Laing RJ, Dhaka A. 2016. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 22: 171-87
3. Blair NT, Carvacho I, Chaudhuri D, Clapham DE, DeCaen P, et al. Transient Receptor Potential channels. IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY
4. Phelps CB, Wang RR, Choo SS, Gaudet R. 2010. *Journal of Biological Chemistry* 285: 731-40
5. Zhang F, Hanson SM, Jara-Oseguera A, Krepiy D, Bae C, et al. 2016. *eLife* 5
6. Liu B, Qin F. 2017. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114: 1589-94
7. Tan C-H, McNaughton PA. 2016. *Nature* 536: 460-3
8. Vangeel L, Voets T. 2019. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*
9. Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, et al. 2003. *Cell* 112: 819-29
10. Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, et al. 2004. *Nature* 427: 260-5
11. Nilius B, Appendino G, Owsianik G. 2012. *Pflugers Archiv (European Journal of Physiology)* 464: 425-58
12. Laursen WJ, Bagriantsev SN, Gracheva EO. 2014. *Curr Top Membr* 74: 89-112
13. Wang YY, Chang RB, Allgood SD, Silver WL, Liman ER. 2011. *Journal of General Physiology* 137: 493-505
14. Hasan R, Leeson-Payne AT, Jaggar JH, Zhang X. 2017. *Scientific Reports* 7: 45098
15. Akopian AN, Ruparel NB, Jeske NA, Hargreaves KM. 2007. *J Physiol* 583: 175-93
16. Rohacs T. 2015. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 467: 1851-69
17. Nilius B, Biro T. 2013. *Exp Dermatol* 22: 447-52
18. Zhang H, Sun X, Qi H, Ma Q, Zhou Q, et al. 2019. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 368: 21-31
19. Qu Y, Wang G, Sun X, Wang K. 2019. *Molecular pharmacology*

20. Liu B, Yao J, Zhu MX, Qin F. 2011. *Journal of General Physiology* 138: 509-20
21. Cheng X, Jin J, Hu L, Shen D, Dong XP, et al. 2010. *Cell* 141: 331-43
22. Dittert I, Benedikt J, Vyklicky L, Zimmermann K, Reeh PW, Vlachova V. 2006. *J Neurosci Methods* 151: 178-85
23. Dittert I, Vlachová V, Knotková H, Vitásková Z, Vyklický L, et al. 1998. *J Neurosci Methods* 82: 195-201
24. Shi DJ, Ye S, Cao X, Zhang R, Wang K. 2013. *Protein & cell* 4: 942-50
25. Singh AK, McGoldrick LL, Sobolevsky AI. 2018. *Nature Structural & Molecular Biology* 25: 805-13
26. Zubcevic L, Herzik MA, Jr., Wu M, Borschel WF, Hirschi M, et al. 2018. *Preprint at bioRxiv*
27. Liao M, Cao E, Julius D, Cheng Y. 2013. *Nature* 504: 107-12
28. Cao E, Liao M, Cheng Y, Julius D. 2013. *Nature* 504: 113-8
29. Huynh KW, Cohen MR, Jiang J, Samanta A, Lodowski DT, et al. 2016. *Nature communications* 7: 11130
30. Deng ZQ, Paknejad N, Maksaev G, Sala-Rabanal M, Nichols CG, et al. 2018. *Nature Structural & Molecular Biology* 25: 252-60
31. Zubcevic L, Herzik MA, Jr., Chung BC, Liu Z, Lander GC, Lee SY. 2016. *Nature Structural & Molecular Biology* 23: 180-6
32. Zubcevic L, Borschel WF, Hsu AL, Borgnia MJ, Lee SY. 2019. *eLife* 8
33. Zheng W, Qin F. 2015. *The Journal of General Physiology* 145: 443-56
34. Wen H, Qin F, Zheng W. 2016. *Proteins* 84: 1938-49
35. Chugunov AO, Volynsky PE, Krylov NA, Nolde DE, Efremov RG. 2016. *Scientific Reports* 6: 33112
36. Raymond KA, Twomey EC, Wei Y. 2014. *Journal of Integrated OMICS* 4: 79-86
37. Melnick C, Kaviany M. 2018. *Journal of Theoretical Biology* 444: 38-49
38. Gao Y, Cao E, Julius D, Cheng Y. 2016. *Nature* 534: 347-51
39. Kasimova MA, Yazici A, Yudin Y, Granata D, Klein ML, et al. 2018. *The Journal of Physical Chemistry Letters* 9: 1260-4
40. Karttunen S, Duffield M, Scrimgeour NR, Squires L, Lim WL, et al. 2015. *Journal of Cell Science* 128: 225-31
41. Samad A, Sura L, Benedikt J, Ettrich R, Minofar B, et al. 2011. *Biochemical Journal* 433: 197-204
42. Witschas K, Jobin ML, Korkut DN, Vladan MM, Salgado G, et al. 2015. *Biochimica et Biophysica Acta* 1848: 1147-56
43. Paulsen CE, Armache JP, Gao Y, Cheng Y, Julius D. 2015. *Nature* 520: 511-7
44. Buchan DWA, Jones DT. 2019. *Nucleic acids research* 47: W402-W7
45. Micsonai A, Wien F, Kernya L, Lee YH, Goto Y, et al. 2015. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112: E3095-103

46. Moparthy L, Survery S, Kreir M, Simonsen C, Kjellbom P, et al. 2014. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 16901-6
47. Kim D, Cavanaugh EJ. 2007. *J Neurosci* 27: 6500-9
48. Dai Y, Wang S, Tominaga M, Yamamoto S, Fukuoka T, et al. 2007. *J Clin Invest* 117: 1979-87
49. Karashima Y, Prenen J, Meseguer V, Owsianik G, Voets T, Nilius B. 2008. *Pflugers Arch* 457: 77-89
50. Wang YY, Chang RB, Waters HN, McKemy DD, Liman ER. 2008. *J Biol Chem* 283: 32691-703
51. Zimova L, Sinica V, Kadkova A, Vyklicka L, Zima V, et al. 2018. *Science signaling* 11
52. Sura L, Zima V, Marsakova L, Hynkova A, Barvik I, Vlachova V. 2012. *Journal of Biological Chemistry* 287: 18067-77
53. Lata S, Sharma BK, Raghava GP. 2007. *BMC bioinformatics* 8: 263
54. Matsuzaki K. 2009. *Biochimica et Biophysica Acta* 1788: 1687-92
55. Grycova L, Lansky Z, Friedlova E, Obsilova V, Janouskova H, et al. 2008. *Biochem Biophys Res Commun* 375: 680-3
56. Alberdi A, Gomis-Perez C, Bernardo-Seisdedos G, Alaimo A, Malo C, et al. 2015. *Journal of cell science* 128: 4014-23
57. De Logu F, Li Puma S, Landini L, Tuccinardi T, Poli G, et al. 2019. *Pharmacological research* 142: 127-39
58. Andersson DA, Gentry C, Alenmyr L, Killander D, Lewis SE, et al. 2011. *Nat Commun* 2: 551

## 1. Introduction

The transient receptor potential (TRP) superfamily consists of a large number of cation channels that are mostly permeable to both monovalent and divalent cations. TRPs are expressed in almost every organism, tissue and cell type. Some of the TRP channels were only slightly changing with evolution (1, 2). The 28 mammalian TRP channels can be subdivided into six main subfamilies: the TRPC (canonical), TRPV (vanilloid), TRPM (melastatin), TRPP (polycystin), TRPML (mucolipin), and the TRPA (ankyrin) groups (3).

TRPs transduce various stimuli including chemical, thermal, light and mechanical ones. TRPs play critical roles of molecular detectors. The channels are formed by a tetramer of a pore-forming subunits that can be identical (homotetramer) or they can differ (heterotetramer). Each subunit consists of six transmembrane segments (S1-S6), pore-forming loop between segments S5 and S6 and intracellular N- and C-termini. At the N-terminus in TRPV, TRPC and TRPA, there is an ankyrin repeat domain (ARD) which can serve as a ligand binding domain or enables interaction of proteins with cytoskeleton (4). ThermoTRP is a specific group of directly thermally activated TRP channels. Up to date, at least 10 out of 27 human TRP proteins are recognized to be a thermoTRP (2, 5-7). Clearly, there is still no definitive answer as to whether thermally activated channels use a local, domain-based, mechanism for sensing the temperature, or whether a global response, distributed over the channel structure, is underlying their strong thermal sensitivity, and is a hot topic of many discussions.

Polymodality, the ability to be activated by stimuli of various modalities, is a characteristic property for thermoTRP channels. They play a crucial role in calcium cell signaling.

The transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) channel is a polymodal sensor involved in nociception, inflammatory and neuropathic pain, specifically in inflammatory cold and mechanical hyperalgesia (8-11). Cytosolic calcium modulates the activity of TRPA1 in a bimodal manner so that  $\text{Ca}^{2+}$  activates or potentiates the channel at low concentrations and inactivates it at higher concentrations (12). The proposed molecular mechanism involves  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing calmodulin that preassociates with the C-terminal region of TRPA1 (L992-N1008) and

enables the channel to distinctly respond to diverse  $\text{Ca}^{2+}$  signals (13). The level of membrane  $\text{PIP}_2$  modulates the activity of thermoTRPs, nevertheless the role of  $\text{PIP}_2$  in TRPA1 regulation is not fully understood (14, 15).

Transient receptor potential vanilloid 3 (TRPV3) is the most important vanilloid TRP channel related to the physiology and pathophysiology of skin (16). The application of a selective inhibitor of TRPV3 forsythoside B leads to a moderation of pruritus (17), and osthole diminishes the manifestation of atopic dermatitis (18). TRPV3 is activated by temperatures exceeding the nociceptive threshold ( $>50\text{ }^\circ\text{C}$ ) and by repeated stimulation shifts the activation threshold to physiological temperatures  $33\text{-}39\text{ }^\circ\text{C}$ . Manifestation of use-dependence of activation is the hysteresis of gating by thermal stimuli or agonists (19). TRPV3 has a unique intrinsic property of sensitization; it is strongly upregulated by its own activity. TRPV3 forms a complex with an epidermal growth factor (EGF) receptor whose activation sensitizes TRPV3's responses via signaling pathways (20).

## **2. Aims of the study**

1. To characterize the parameters of the thermal activation of a recombinant human TRPV3 receptor and to determine the conditions under which the activation process is use-dependent. Based on the comparison between TRPV1 and TRPV3, to identify the region of the channel that can be responsible for the use-dependent sensitization. Using electrophysiological techniques, to describe functional role of the identified region and to propose a possible molecular mechanism of sensitization.
2. To explore whether epidermal growth factor (EGF) sensitizes native TRPV3 in human keratinocytes and to characterize the extent to which the sensitization is mediated via MAPK (mitogen activated protein kinases) signaling pathway. To determine if TRPV3 can be a substrate protein for ERK1/2 protein kinase (kinases regulated by extracellular signal 1 and 2). To identify potential phosphorylation site of TRPV3, that can be the main target for ERK1/2.
3. To determine under what conditions the specific C-terminal part of human TRPA1 receptor (L992-P1034) can directly interact with phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ( $\text{PIP}_2$ ). Using various

biophysical, biochemical, structural and electrophysiological approaches, to attempt to propose a mechanism of how PIP<sub>2</sub> influences the activity of TRPA1 in nociceptive neurons.

### **3. Material and methods**

#### *3.1 Chemicals*

Deionized water from the station Purelab Flex (ELGA UK) with a final resistance of 18.2 MΩ.cm was used for solution preparations and experiments at the department of cellular neurophysiology CAS.

Peptone, agarose and yeast extract were purchased from SERVA (Germany), nutrient agar no#2 was from Biolige (Italy) and TBS 10x from Boston Bioproducts (USA). Oligonucleotides were synthesized by Merck (Germany), peptides by Biomatik (Canada). Lipids were purchased from Avanti Polar Lipids (USA). All other chemicals were purchased from Sigma (Czech republic).

#### *3.2 Mutagenesis, cell lines a transfection*

The mutants were generated by a QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies Santa Clara, California, USA). For each mutation, a pair of primers was designed and ordered (Merck, Germany). Verified PCR product was transformed into ultracompetent *E. coli* XL10-Gold. DNA plasmids were isolated using High-Speed Plasmid Mini (GeneAid, Taiwan) and verified by sequencing (Eurofins Genomics, Germany).

Three cell lines were used for the experiments in this thesis: Human embryonic kidney HEK293T (ATCC, USA), human keratinocytes HaCaT (CLS GmbH, Nemecko) a somatic hybrid of rat dorsal root ganglia with mouse neuroblastoma cells F11 (ECACC, United Kingdom). Cell lines were cultured in Opti-MEM I medium (Invitrogen) supplemented with fetal bovine serum (FBS) in a thermostat under atmosphere of 5 % CO<sub>2</sub> at 37 °C, the cells were pasaged every 2-3 days and the day before transfection, cells were plated in 24-well plates in 0.5 ml of medium and became confluent on the day of transfection. The cells were then transiently transfected using the magnet-assisted transfection technique (IBA GmbH, Goettingen, Germany) or Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA).

### 3.3 Patch-clamp electrophysiology

Electrophysiology technique patch-clamp was performed in a whole-cell arrangement under mode of a voltage clamp employing an inverted fluorescent microscope Axiovert 135 (Zeiss, Germany), antivibration table TMC (Technical Manufacturing), manipulator MP-255 (Sutter instrument, USA), application system for rapid superfusion, thermal stimulation and drug application developed in our laboratory (21, 22), Axopatch 1-D amplifier (Molecular Devices, USA), digitizer of analog data AD/DA Digidata 1440A (Molecular Devices, USA) and pCLAMP10 software (Molecular Devices).

Patch electrodes were pulled immediately before the experiment from borosilicate glass capillary with a 1.5-mm outer diameter (Science Products GmbH, Hofheim, Germany) on a horizontal puller P-1000 (Sutter Instrument, USA). The tip of the pipette was heat-polished to a final resistance between 3 and 5 M $\Omega$ . The experiments were performed at 25 °C. Glass pipettes were filled with the intracellular solution selected according to the cell line and type of the experiment. The currents were recorded from single vital cells expressing green fluorescent protein.

### 3.4 Determination of maximum apparent temperature coefficients $Q_{10}$

A system for rapid superfusion enabled us to heat up accurately and quickly the extracellular solutions from 25 to 60 °C to cells and apply at a maximum speed of about 35 °C/s at 3 s intervals. The temperature sensitivity of TRPV3 constructs was then evaluated. The heat-evoked whole cell currents sampled during the rising phase of temperature ramp were pooled at intervals of 0.25 °C. The maximum apparent temperature coefficients  $Q_{10}$  and the thermal thresholds were determined from the slope of Arrhenius plot (absolute values of inward currents plotted on a logarithmic scale, against the reciprocal of the absolute temperature). (58, 59).

$Q_{10}$ 's were determined by using the formula (1), where  $R$  is the gas constant,  $\Delta T = 10$  Kelvin,  $E_a$  is an apparent activation energy estimated from the slope of Arrhenius plot between absolute temperatures  $T_1$  and  $T_2$ . The lower and upper limits for  $Q_{10}$  estimation were defined as the temperatures at which the fit of the Arrhenius plot declined significantly from a straight line ( $r^2 < 0.98$ ).

$$Q_{10} = \exp(\Delta T E_a / (R T_1 T_2)) \quad (1)$$

### *3.5 Study of the interaction between lipids and peptides*

For the purpose of characterization of the interaction of lipids with peptides various techniques were used: plasmon waveguide resonance (PWR), microfluidic diffusional sizing (MDS), infrared spectrometry *p*ATR-FTIR, fluorescent analysis of liposomal leakage and circular dichroism (CD). The methods are described in details in the theses and in the publications.

### *3.6 Statistics and data pooling*

Statistical evaluation was performed with SigmaPlot 10.0 (Systat Software, USA). Each data group was statistically evaluated using the function of one-way analysis of variance (ANOVA) if there exists a variance in mean values. If the groups differed, Student's *t*-test or Mann-Whitney test were implemented for comparison.

The heat-evoked whole cell currents sampled during the rising phase of temperature ramp were pooled for every 0.25 °C. For synoptic comparisons between wild-type and mutant channels, initial heat-induced responses were subtracted by currents produced at 26 °C, normalized to their maximum value and pooled across *x*-axis (26–64 °C) and *y*-axis (0–1) for each experimental group into 35 intervals from at least three independent transfections. The categorized data were remerged and for each data point the error bars were determined across both the temperature as well as the normalized current.

## **4. Results and Discussion**

### *4.1 Cytoplasmic inter-subunit interface controls use-dependence of thermal activation of TRPV3 channel*

In the time of the study designing, only the cryo-EM structure of intracellular N-terminal part of mouse TRPV3 was known (23). When compared with TRPV1 cryo-EM structure, the conformation of the finger 3, the loop between ankyrin repeat 3 (AR3) and AR4 of the ankyrin repeat domain, differed. The thermal threshold of TRPV3 is higher than TRPV1's and TRPV3 is strongly use-dependent which means that the probability of opening is increasing with repetitive activation, while TRPV1 is desensitizing upon repetitive stimulation. When comparing the primary sequences of TRPV3 with other vanilloid receptors, TRPV3 differs in the highly conserved residues N251-E257 in the finger 3 region.

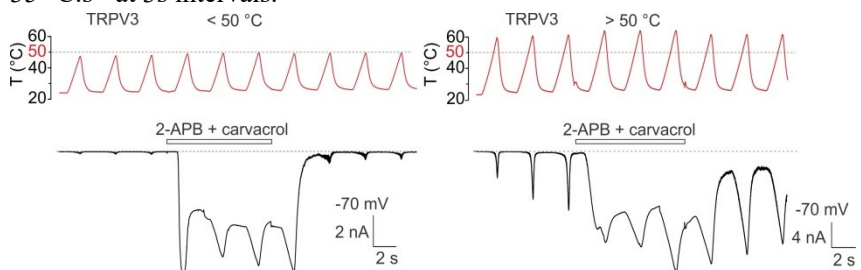


So we focused of this region with the aim to find its role in the thermal activation.

To verify the importance of the finger 3, the non-conserved residues from TRPV3 were chimerically exchanged by corresponding ones from rat TRPV1 in the region N251-E257. The whole-cell patch-clamp electrophysiology approach was used for testing the temperature sensitivity of the chimeric channels.

#### 4.1.1 Heat activation of wild-type human TRPV3 is strongly use-dependent

Previous studies have shown that the initial activation of mouse TRPV3, under certain experimental conditions, requires temperatures above 50 °C and the activation threshold and the slope sensitivity of the temperature dependence decrease upon repeated stimulation (6). To confirm this characteristic activation pattern for human TRPV3, HEK293T cells were transiently transfected with plasmid encoding the channel using the magnet-assisted transfection technic and then tested using patch-clamp. The control extracellular solution (150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES) was applied to cells using a system for rapid superfusion (22) serving for both the thermal stimulation and drug application. The intracellular solution consisted of 140 mM CsCl, 10 mM HEPES and 1 mM EGTA. We first measured heat responses in control bath solution using three repetitive temperature ramps from 25 °C to either below (Fig. 1 left) or above 50 °C (Fig. 1 right), applied at a maximum speed of about 35 °C.s<sup>-1</sup> at 3s intervals.



**Fig. 1: Initial activation of human TRPV3 requires temperatures above 50 °C.** Representative whole-cell currents evoked by heat stimuli below (left) or above (right) 50 °C, applied at -70 mV in wild-type TRPV3, in the absence or presence of mixed agonists (100 μM 2-APB + 100 μM carvacrol).

In extracellular control bath solution, repeated stimulation to  $\sim 48$  °C produced only very small currents ( $154 \pm 21$  pA;  $n = 9$ ) with weak temperature dependence over the range of 45–48 °C ( $Q_{10}$ , temperature coefficient of  $2.8 \pm 0.3$ ) (Fig. 1 left). In contrast, the agonists produced robust currents at 25 °C ( $5.3 \pm 0.3$  nA at 25 °C;  $n = 9$ ) that became saturated at  $\sim 40$  °C ( $9.8 \pm 1.7$  nA) and after washout and cessation of the heat stimulus decayed to the basal level. Subsequent reapplication of heat in control bath solution produced again only small responses. When the maximum value of the initial temperature stimulus was raised above  $\sim 50$  °C, the activation pattern was quite different (Fig. 1 right). The initial TRPV3-mediated heat responses reached peak amplitudes of  $1.7 \pm 0.6$  nA ( $n = 25$ ) and, upon repeated exposure to heat, the threshold for activation decreased while the maximum amplitude of currents increased, indicating that high temperatures above 50 °C activated the channels specifically and robustly. By fitting the Arrhenius plot of the current-temperature relationships, the initial heat-induced responses exhibited the median  $Q_{10}$  value of 22.2 (first and third quartile of 17.1 and 33.9) over the temperature range from  $51.7 \pm 1.2$  °C to  $53.9 \pm 1.1$  °C. The median  $Q_{10}$  value of the subsequent heat response was lowered significantly to 10.6 (first and third quartile of 7.2 and 12.6;  $n = 14$ ;  $p = 0.004$ , paired t-test) without changes in the temperature range for activation (from  $52.5 \pm 1.1$  to  $55.7 \pm 1.2$  °C). Over the low temperature range ( $25.9 \pm 0.4$  to  $34.4 \pm 1.2$  °C), the average  $Q_{10}$  of initial heat responses was  $1.8 \pm 0.1$  and this value was not different from  $Q_{10}$  of the second response ( $1.6 \pm 0.1$ ;  $p = 0.222$ ).

Together, these data corroborate previous findings (6) on mouse TRPV3. Human TRPV3 is activated at high noxious temperatures, its initial activation threshold exceeds 50 °C, and the channel is strongly use-dependent as well as its mouse ortholog.

#### *4.1.2 Finger 3 defines TRPV3 temperature dependence*

In the next step using a chimeric approach, we replaced the residues within the tip of the finger 3 of human TRPV3, either individually or in combinations, by cognate residues from rat TRPV1. We generated one septuplet mutant TRPV3/V1(251–257) in which the sequence NPKYQHE was replaced with KKTKGRP and we examined the temperature sensitivity of the construct by comparing its initial heat response. It was

initially sensitized and exhibited tonic activity at 25 °C. The plot of the normalized current–temperature relationship of the heat responses exhibited a steeper slope at temperatures around 40 °C and a shallower slope at higher temperatures.

To identify the residue responsible for this phenotype, two chimeric triplet mutants in which the residues over the regions 251–254 and 255–257 were replaced by those of TRPV1. The currents through the triple mutant TRPV3/V1(255–257) were not different from wild-type channels, while the TRPV3/V1(251–254) triple mutant exhibited a clearly sensitized phenotype so that the maximum amplitude of the initial heat responses measured in control extracellular solution ( $10.1 \pm 1.3$  nA) were not different from those recorded in the presence of the combination of agonists ( $11.2 \pm 1.1$  nA;  $p = 0.200$ , paired t-test;  $n = 13$ ). This was in apparent contrast with the maximum heat responses of wild-type channels that increased from  $1.9 \pm 0.5$  to  $10.3 \pm 0.9$  nA in the presence of agonists ( $p < 0.001$ , paired t-test;  $n = 19$ ). In contrast to wild-type channels, the  $Q_{10}$  values of the initial heat responses were not significantly different from  $Q_{10}$ s of the subsequent heat responses (median values of 14.5 and 15.5;  $p = 0.804$ , paired t-test;  $n = 11$ ).

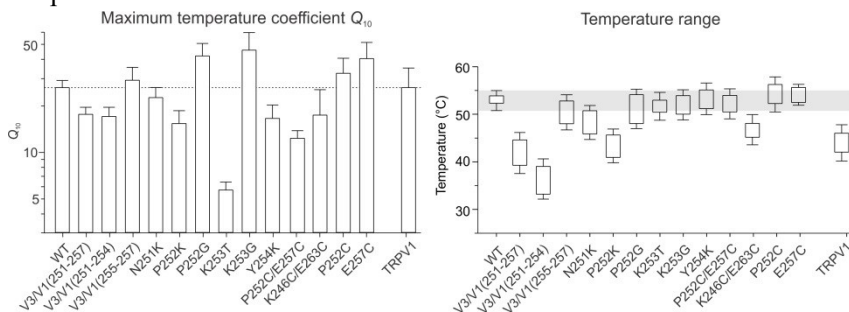
One-way ANOVA clearly confirmed a highly significant ( $p < 0.001$ ) decrease in maximum  $Q_{10}$  values and activation thresholds of currents through the septuplet mutant and the chimeric triple mutant over the positions 251–254, but not of the currents through the triple mutant over the positions 255–257. Therefore, we focused on the residues at positions 251–254.

The individual substitutions of residues N251, P252, K253, and Y254 further indicated that the strong impact of the septuplet mutation on the activation threshold was primarily due to changes in the size or flexibility of proline at position 252 and, to a lesser extent, lysine at position 253.

To further investigate the mechanism and the role of finger 3 in TRPV3 thermal activation, we introduced pairs of cysteine residues at positions that are structurally predicted to be in close proximity (24). The double mutation P252C/E257C significantly reduced the maximum steepness of the temperature dependence ( $Q_{10}$ ;  $p = 0.004$ ;  $n = 5$ ), whereas K246C/E263C lowered the temperature range of the steepest slope ( $p = 0.04$ ;  $n = 4$ ). Currents produced by single cysteine mutations P252C and

E257C were not statistically different from wild-type TRPV3, indicating that intra-subunit interactions within the finger 3 loop are only partly responsible for the sensitized phenotype of TRPV3.

To compare the sensitization propensity and the threshold for specific activation among all the mutants, we evaluated the maximum  $Q_{10}$  and the temperature range over which the Arrhenius plot was nearly perfectly linear (correlation coefficient  $r^2$  of 0.98–0.99). In figure 2, there is the statistical evaluation of maximum apparent  $Q_{10}$  and the estimated temperature thresholds for all tested constructs and rat TRPV1.



**Fig. 2: Statistical evaluation of maximum apparent  $Q_{10}$  and the estimated temperature thresholds.** Left, Summary of the maximum temperature coefficient  $Q_{10}$  values for all the measured chimeras and mutants, compared with wild-type TRPV3 and rat TRPV1. The horizontal dotted line indicates average maximum  $Q_{10}$  of wild-type TRPV3. Right, Average temperature ranges over which Arrhenius plot of the heat-induced currents was linear and used for the estimation of the maximum  $Q_{10}$ . Horizontal grey area indicates the upper and lower limits of the temperature range for wild-type channels.

These data point to the tip of the finger 3 as a region with a great deal of influence over the TRPV3 temperature dependence characteristics, including the threshold for activation and the steepness of heat responses. Intra-subunit interactions within the finger 3 loop are only partly responsible for the sensitized phenotype of TRPV3. Because the P252G and P252C mutants exhibited the wild-type phenotype, the size and/or flexibility of the residue at this position seem to be crucial for maintaining normal functioning of the channel.

#### 4.1.3 Inter-subunit interface controls TRPV3 gating

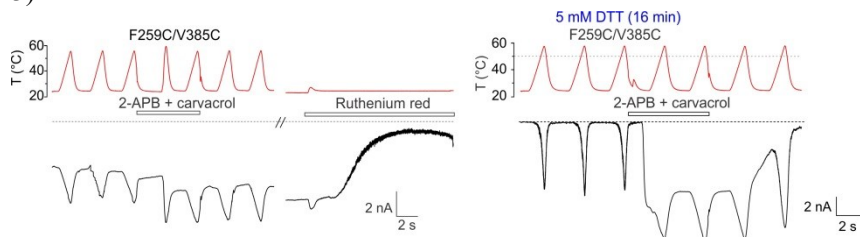
Several recent structures of full-length TRPV channels (24-30) reveal that finger 3 contributes to the inter-subunit interface between the ARD

and the three-stranded  $\beta$ -sheet composed of a  $\beta$ -hairpin from the N-terminal MPD linker and a C-terminal  $\beta$ -strand, both from the adjacent subunit (24, 25).

Structural comparisons of the recently published structures of mouse TRPV3 (24) in the closed and open states indicate that the  $\beta$  sheet-ARD finger 3 interface between neighboring subunits changes during gating - the contacting regions „slide“ relative to each other upon channel opening/closure. The selected residues pairs showed substantial differences in distances between their C-atoms in the closed and open state structures: F259/Y382 (8.3 Å in the closed state and 9.6 Å in the open state), F259/V385 (6.6 Å and 7.3 Å), and H256/E736 (7.3 Å and 8.1 Å). As the structure of the open channel (24) was obtained in the presence of TRPV3 agonist 2-APB, we asked whether the slide may occur while the channel is activated by heat.

To explore the role of the inter-subunit interface in temperature dependent activation, we exchanged the suspected pairs by cysteines and measured heat-induced responses from the double cysteine mutants. The cells expressing F259C/Y382C and F259C/V385C exhibited large leakage-like inward currents at 25 °C at membrane potential -70 mV that were fully blockable by ruthenium red (10  $\mu$ M). Their almost linear current-temperature relationships over the entire experimental temperature range supports our hypothesis that the channel can be stabilized in its open state by disulphide bond. In contrast, the double cysteine mutant H256C/E736C showed very small current responses to temperatures near ~60 °C. The observed effects of the double cysteine substitution H256C/E736C are most likely the result of the mutation of E736, therefore the disulphide bond is not responsible for the observed phenotype. In contrary, the individual cysteine substitutions F259C, Y382C and V385C only mildly influenced the temperature dependence properties of the channels and they did not exhibited leakage-like inward currents at 25 °C. This supports the disulphide bond formation between these residues. To further verify that the observed effects are indeed caused by disulfide bond formation, we pretreated cells expressing the F259C/V385C construct with the membrane permeable reducing agent dithiothreitol (DTT; 5 mM) for 16 min at 37 °C. The cells were then electrophysiologically tested. The currents through the F259C/V385C channels were not tonically activated

after whole-cell formation and exhibited specific sensitivity to heat (Fig. 3).



**Fig. 3: Representative whole-cell currents recorded from HEK293T at -70 mV, evoked by heat stimuli in F259C/V385C double cysteine mutant of TRPV3.** Left, The channels exhibited strongly sensitized phenotype and large basal currents that were fully blocked by ruthenium red (10  $\mu$ M). Right, HEK293T cell were pretreated with 5 mM dithiothreitol (DTT) for 16 min by which the basal currents were abolished.

#### 4.1.4 TRPV3 molecular dynamics simulations

To evaluate impact of heat on the intersubunit interface and to suggest a possible mechanism how the heat-induced changes are translated into the gate, we subjected the mouse TRPV3 apo (closed) state structure (PDB ID: 6DVW) to molecular dynamics (MD) simulations at three temperatures, 300, 330 and 400 K. The root mean square deviation (RMSD) along the 50-ns MD trajectory were shown as a ribbon diagram. The results of MD simulation experiments therefore strongly implicate the  $\beta$  sheet-finger 3 intersubunit interface into TRPV3 regulation by temperature and support our mutagenesis experiments. Interestingly, the  $\beta$ -sheet, MPD and TRP helix, which link the  $\beta$  sheet-finger 3 intersubunit interface to the channel gate at the S6 bundle crossing, appear to be least flexible in our MD simulations and more so at high temperatures. We therefore hypothesize that these three domains form a rigid gating transmission element that communicates changes at the intersubunit interface directly to the channel gate.

#### 4.1.5 Discussion

Our results indicate that the interaction of the ARD finger 3 tip (region around H256-F259) with the neighboring subunit  $\beta$ -sheet (residues Y382 and V385) is important for TRPV3 channel gating. Disulphide bonds in C259 and C385 or C382 can lock the channel in its open state and abolish

its steep temperature dependence. Structural comparisons of the published structures (24, 25) indicate that the key  $\beta$ -sheet-ARD finger 3 intersubunit interface undergoes significant changes between the closed and 2-APB agonist-activated open states (24) due to sliding of the contact regions relative to each other. Our data broaden this hypothesis to the heat induced sliding motion at this interface. On the other hand, mutation at the conserved E736 in the  $\beta$ -sheet shifts the threshold for heat activation to higher temperatures over 60 °C and decreases the affinity to the TRPV3 agonist 2-APB. Probably, this mutation stabilizes the channel in its closed state. Our results are supported by a recent study (31) where interactions at the interface were identified within residues Q313, W739, W742, K743, K169, E751, D752 in the channel open state after chemical (2-APB) activation.

How are the conformational changes within the tip of the finger 3 and in the key residues at the intersubunit interface transmitted to the gate and how the sensitized state is imposed on the channel? And how can the changes within the central part of the finger 3 affect the channel sensitized state? As it was previously shown, two to three consensus sequences are necessary for the correct packing of the ankyrin repeats. When the packing was disrupted, the signal can be transmitted by an altered path within the ankyrin domain (30, 32). As the finger 3 is a highly flexible part of the ankyrin repeats, the functional changes of our mutations are not probably caused by the ARD disruption. Recent extensive studies on the TRPV3-related TRPV1 channel revealed various key domains that undergo conformational changes in response to the increased temperature (33-37). These studies support several lines of experimental evidence that the channel can be opened by temperature after a series of conformational changes that propagate from the peripheral regions to the channel pore, the signal is predicted to be transmitted from the distal C-terminus, via the TRP helix, to the S5-S6 pore domain and could be universal for TRP family (35). Similar motions are visible from the recently published structures of TRPV channels in the closed apo and agonist-bound open states (24, 37-39). The responsible residues correspond to E334-R375, R363-L373 and E364-T378 in mouse and human TRPV3. The signal from finger 3 could be transmitted within a single subunit to the gate, similarly as in TRPV1, nevertheless non-conserved tip of the finger 3 is highly

flexible and is connected with MPD by flexible parts of AR4 and AR5. Our MD simulation results show the signal could be transmitted within the intersubunit interface from ARD finger 3 to the 3-stranded  $\beta$ -sheet of the adjacent subunit and we propose that this direct interaction is responsible for the TRPV3 sensitized phenotype. This contact could transmit the signal to MPD, domain responsible for temperature sensitivity, followed by S2-S3 domain, TRP-helix, and finally up to the gate. Our mutations (especially F259C/V385C) lead to disruption of the subunit's sliding ability at the interface and the transmission of the signal to the gate.

Moreover, stability of the conductive conformation may further depend on hydration of the channel pore (21, 35).

Apart from the cross-interface disulfide links, the strongest energetic effects on the basal closed-to-open equilibrium were observed for V3/V1(251-254), P252K, K253T and combinations of these mutations with D414A. The region of the MPD harboring D414 was previously implicated in use dependence of TRPV3 (6), nevertheless it seems there is no direct interaction between MPD and finger 3.

## **4.2 Functional regulation of TRPV3 via phosphorylation**

Whole-cell patch clamp was used for membrane current recordings from TRPV3 channels endogenously expressed in an immortalized human keratinocyte cell line (HaCaT) in the presence of epidermal growth factor (EGF) and selective inhibitors of ERK, mitogen activated protein kinase (MAPK). We proved human TRPV3 regulation by epidermal growth factor receptor (EGFR) via MAPK pathways and we indicated potential phosphorylation sites in N-terminal ankyrin repeat domain (ARD).

### *4.2.1 Prediction and testing of the potential phosphorylation sites*

Combination of several prediction servers was used to assess human TRPV3 potential phosphorylation sites for ERK (Predikin, KinasePhos2, ScanSite, PPSP, GPS 3.0, Musite, NetPhorest, Disphos, PKIS). In total we identified eight ERK1/2 consensus sites (PX(S/T)P) at the N terminus of human TRPV3, four of them containing a PXSP motif (Ser<sup>60</sup>, Ser<sup>85</sup>, Ser<sup>88</sup>, and Ser<sup>102</sup>) and the next four a PXTP motif (Thr<sup>35</sup>, Thr<sup>96</sup>, Thr<sup>264</sup>, and Thr<sup>343</sup>). We individually replaced all these serines and threonines with aspartic acid to mimic the negative charge of the phosphate group. The



mutants were transiently transfected to HaCaT cells and assayed electrophysiologically using repeated stimulations with a low concentration of 2-APB (50  $\mu$ M), applied four times for 30 s with 30-s intervals and followed by a 10-s application of a combination of 2-APB (200  $\mu$ M) with carvacrol (150  $\mu$ M) to obtain a reference saturating response. The T264D mutant produced significantly larger first responses than the wild-type channels. T264D and T343D did not exhibit any sensitization upon repeated stimulation with 2-APB. In T264D, the first response reached about 7% of the maximum response, which was not significantly different from the fourth response. In contrast to the currents through wild-type channels, the majority of T264D responses to 2-APB apparently reached a plateau during 30 s of application. The 2-APB currents through T343D were barely detectable, being significantly smaller than those of wildtype channels and the other mutants. The fourth response in T343D remained at the initial level of 0.3% of the maximum, indicating functional rather than phosphorylation-mimicking effects. The T35D construct yielded also a significantly smaller initial response to 2-APB but exhibited sensitization comparable with wild-type channels, therefore our focus was shifted towards other mutations. Apart from S85D, for all the mutants tested, maximal inward currents elicited by the combination of saturating agonists were not statistically different from wild-type channels. Phosphomimicking mutation T264D sensitized the channel without affecting its maximum responses, as would be expected for the potentiating effect of MEK kinases. These findings identify threonine 264 as the most likely candidate to be a phosphorylation site for ERK1/2 and as a key residue to assess its role in TRPV3 channel functionality.

#### *4.2.2 TRPV3 Regulation by ERK phosphorylation*

In further experiments, we used the HEK293T expression system to avoid a possible contribution of endogenous TRPV3 channels that are expressed in HaCaT cells, and to examine whether the effects of mutations at Thr264 are independent of the expression system used.

We measured currents from the T264D mutant channels using an analogous protocol to that described above. Moreover, we examined two additional constructs: the alternative phosphomimetic mutation T264E and the phosphonull mutation T264A. T264D and T264E exhibited an identical

phenotype to T264D in keratinocytes. In T264D, first 2-APB response was significantly larger compared with wild-type TRPV3. In T264D and T264E, the fourth response to 2-APB was not statistically different from the initial response, whereas that for wild-type channels increased 3-fold and T264A about 2-fold. There was no significant difference in the maximum currents induced by a combination of saturating agonists between the mutants and the wild-type channels. These results indicate that threonine 264 is a potential TRPV3 phosphorylation site.

#### *4.2.3 Overexpression of ERK1 supports the specific role of Thr264 in TRPV3 phosphorylation*

To further explore whether the ERK kinase may functionally affect TRPV3, ERK1 was transfected to HEK293T cells together with the wild-type TRPV3 channel. The presence of ERK1 in cells caused a strong increase in 2-APB responses in cells expressing wild-type TRPV3 that do not further sensitize, similar to those in the phosphomimetic mutants T264D and T264E. The 2-APB currents through T264A co-expressed with ERK1 exhibited amplitudes not significantly different from cells transfected with T264A alone. Likewise with wild-type channels, the maximum response induced by a saturating combination of agonists was slightly, but not significantly smaller ( $p = 0.230$ ). These results support a possible role of Thr264 in the ERK1-mediated phosphorylation of the human TRPV3 channel.

#### *4.2.4 T264A mutation results in a substantial decrease in EGF-mediated potentiation*

To further confirm the role of Thr264 in EGF-induced sensitization in the native conditions, wild-type or T264A were transiently transfected to HaCaT cells and assayed electrophysiologically using repeated stimulations with a low concentration of 2-APB, applied four times for 10 s with 30-s intervals, first in the absence and then in the continuous presence of EGF (20 ng.ml<sup>-1</sup>). EGF was pre-applied for 1 min before the fifth 2-APB application. At the end of the series, a combination of 2-APB (200  $\mu$ M) with carvacrol (150  $\mu$ M) was applied for 10 s to obtain a reference saturating response. Compared with the initial 2-APB response, the 8<sup>th</sup> response increased about 6-fold in WT and 4-fold in T264A.

Whereas the fourth response through TRPV3 measured in the presence of EGF reached 11% of the maximum response, the mutant channels exhibited only 2% increase, thus supporting a key role of Thr264 in EGF-induced potentiation.

#### *4.2.5 Discussion*

This study focused on determination of ERK1 phosphorylation sites in TRPV3 was based on observation by Cheng et al. (20), who explored the regulatory mechanisms of TRPV3 activity via the activation of the EGFR receptor in mouse primary keratinocytes. For TRPV3 expressed in immortalized human keratinocyte cell line (HaCaT), we obtained similar observations and confirmed the validity of the proposed regulatory mechanisms of TRPV3. Authors of the original study proposed the increased activity of TRPV3 by EGFR activation via PLC signaling pathways and partly via MAPK. In our experiments, we proved the contribution of the pathways in potentiation of TRPV3 by incubation cells in EGF and by application of two different selective MEK, a part of MAPK cascade, inhibitors (U0126 or PD98059). We demonstrate that in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$ , the inhibitors of MEK completely prevent the EGF-induced potentiation of TRPV3 responses, suggesting that the MAPK signaling pathway may contribute to TRPV3 sensitization independently of the PLC signaling pathway.

In this study, we identify threonine 264 in the N-terminal ARD as the main site for the ERK1-dependent modulation of TRPV3. This conserved residue is located at the beginning of the inner helix of repeat 4, forming part of the general conserved TPLA consensus sequence of the repeat. Although the overall fold of TRPV3-ARD is shared with other TRPV channels, the domain containing T264 is conserved only within TRPV3, thus implying threonine 264 as a regulation site specific for TRPV3.

The authors of the ARD TRPV3 crystal structure (23) published an atypical conformation of finger 3, the domain containing T264, that folds over the finger 2 and that is stabilized by AR3 in this position. However, recent structures of the complete receptor (24, 25) do not register this conformation. It seems the original atypical conformation of finger 3 is a crystallization artefact or alters due to the presence of an adjacent subunit. Nevertheless, the authors of the atypical organization (23) functionally

demonstrated that disruption of hydrophobic bonds within finger 3 leads to a serious damage of TRPV3 sensitivity to 2-APB. The close vicinity of T264 residue from the structurally and functionally important region of finger 3 enhances the possibility that phosphorylation of T264 by ERK1 alters the loop structure and functionality of the channel. Close proximity of the threonine 264 to asparagine 242, through which the TRPV3 channel can be effectively regulated by oxygen-dependent hydroxylation (40), adds further complexity to the cellular signaling pathways involved in the regulation of skin homeostasis via growth factor downstream signaling.

### **4.3 Putative interaction site for membrane phospholipids controls**

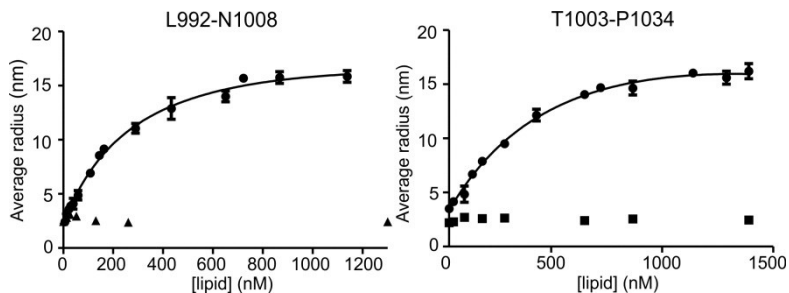
activation of TRPA1 channel at physiological membrane potentials

This part of the thesis is based on the previous work of the laboratory proving the functional role of interaction of C-terminal TRPA1 with membrane phospholipids. Plenty of positively charged residues were identified that are capable of interaction with membrane phospholipids (41) and established high affinity to membrane  $\text{PIP}_2$  of peptide with sequence corresponding to I964-L992 from TRPA1 TRP-like box (42). This finding was supported by recent single-particle cryo-EM structure of TRPA1 (43) in which the identified sequence corresponds to the  $\alpha$ -helix that runs parallel to the inner leaflet of the membrane. Here it could indeed interact with  $\text{PIP}_2$  and that further reveals possible interaction site at the intersubunit side fenestration. Using the prediction server AntiBP Server, we identify a proximal part of the C-terminus containing a sequence that fulfills the criteria to be an interacting site for negatively charged phosphoinositides. In the available cryo-EM model at 4.24 Å resolution (PDB 3J9P), there is a poorly resolved part Y1006-Q1036 that corresponds to the high scored predictions, therefore, two specific peptides were selected for the study. First, peptide corresponding to the sequence T1003-P1034 of the poorly resolved structure, second, L992-N1008, previously identified as the calmodulin binding site (13), partly overlapping with the first one. For the purpose of biophysical experiments, the peptides of the corresponding amino acid sequences were synthesized. The aim of the study was to explore whether the peptides are capable of interacting with  $\text{PIP}_2$  and whether calmodulin may compete with  $\text{PIP}_2$  for the latter site.

#### 4.3.1 In the presence of PIP<sub>2</sub>, there are superficial contacts of the specific peptides with membrane phospholipids

To explore the interaction of the designed peptides with membrane phospholipids, combination of various biophysical approaches was used in the laboratory of Dr. Isabel Alves in Bordeaux. No resonance shift was recorded in case of a model membrane of pure POPC when incrementally increasing the peptide concentration up to 10 mM. In a model membrane containing 5% PIP<sub>2</sub>, there were shifts in s- and p- resonances when increasing peptide concentrations. Nevertheless, PWR failed to provide accurate affinities via dissociation constant  $K_D$ , although a hyperbolic saturating curve was obtained for POPC/PIP<sub>2</sub> membranes, as the spectral changes induced by peptide addition are quite small ( $\leq 5$  mdeg, at saturating peptide concentrations whereas the instrument angular resolution  $\geq 0.5$  mdeg). Increasing the PIP<sub>2</sub> content to 20% relative to POPC did not increase the PWR signal amplitude.

MSD following the peptide binding to SMALPs was used to determine the dissociation constant  $K_D$ . From MDS data it is evident that PIP<sub>2</sub> is essential for lipid interaction as no binding was observed in the case of pure POPC membranes. For POPC/PIP<sub>2</sub> membranes, observed for both peptides with affinities ranging from about 300 to 700 nM for L992-N1008 and T1003-P1034 peptides, respectively (Fig. 4, Table 1).



**Fig. 4: Interaction of the T1003-P1034 and L992-N1008 peptides with model membranes followed by MDS.** Average radius of the indicated peptides upon titration with increasing concentrations of SMALPs composed of POPC (triangles and squares) and POPC/PIP<sub>2</sub> (9/1 mol/mol) (circles).

The presence of Ca<sup>2+</sup> in the buffer decreased the affinity of both peptides to POPC/PIP<sub>2</sub> lipid membranes as shown by MDS (Table 1).

**Tab.1: Binding affinity (in nM) for the peptides L992-N1008 and T1003-P1034 for SMALPs composed of POPC and POPC/PIP<sub>2</sub> (9/1 mol.mol<sup>-1</sup>) in the absence and presence of 2 mM Ca<sup>2+</sup> obtained by MDS. Data are presented as  $\pm$  SD (n=3).**

LIPID/PEPTIDE	L992-N1008	T1003-P1034
POPC	No binding	No binding
POPC/PIP <sub>2</sub> (9/1 mol.mol <sup>-1</sup> ) no Ca <sup>2+</sup>	330 $\pm$ 68	685 $\pm$ 114
POPC/PIP <sub>2</sub> (9/1 mol.mol <sup>-1</sup> ) in 2 mM Ca <sup>2+</sup>	425 $\pm$ 95	720 $\pm$ 123

The peptide L992-N1008 showed stronger affinity than T1003-P1034. This could be related to the difference in the net charge (2 for L992-N1008 and 1 for T1003-P1034) as the peptide L992-N1008 could establish stronger electrostatic interactions with the negatively charged lipid.

pATR-FTIR was used to further support the binding of peptides to lipids and for determine the secondary structure of the peptide with higher affinity L992-N1008. The data showed no significant changes in the lipid fatty acid as the peptide showed similar position and dichroic ratio for CH<sub>2</sub> symmetric (at 2852 cm<sup>-1</sup>) and antisymmetric (at 2923 cm<sup>-1</sup>) stretching bonds in both polarities. The amide I (1640 cm<sup>-1</sup>) and the amide II (1535 cm<sup>-1</sup>) were observed before peptide rinsing but became extremely small (detection limit) after rinsing the peptide. Therefore, ATR-FTIR data deconvolution of the amide I and amide II region with the intention of obtaining the peptide L992-N1008 secondary structure and orientation was not performed here.

Peptide effect in sulphorhodamine B leakage from LUVs was tested to determine if peptide interaction affects membrane integrity (e.g., pore formation). No membrane leakage was observed even at peptide/lipid ratios of 1/10.

Those findings suggest that peptide binding to lipid occurs if PIP<sub>2</sub> is present and that the binding is superficial, most probably involving electrostatic interactions between the anionic lipid and positive charges in the peptide.

#### *4.3.2 Specific peptides interfere with TRPA1 calcium dependent potentiation*

It has been previously shown that Ca<sup>2+</sup>/calmodulin complex binds to TRPA1 within the region L992-N1008 and potentiates the channel under

resting conditions (13). In nociceptive neurons, the role of PIP<sub>2</sub> is intensively studied under physiological conditions. In peptidergic nociceptors, TRPA1 is extensively co-expressed with the structurally related vanilloid receptor subtype 1 channel TRPV1 in which the regulation by PIP<sub>2</sub> is known (14). Under native conditions, we tested if PIP<sub>2</sub> binds at the same channel site where from the prebound Ca<sup>2+</sup>/calmodulin complex is released as a result of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration.

In order to explore the possible contribution of the putative PIP<sub>2</sub>-interaction site (Y1006-Q1031) in TRPA1 regulation under close-to-native conditions, we used neuronal F11 cells transfected with human TRPA1. We supposed if Ca<sup>2+</sup>/calmodulin and PIP<sub>2</sub> compete for the same binding site, then intracellular perfusion of specific peptides (L992-N1008 and T1003-P1034) should have a dominant negative effect on TRPA1 activity and be dependent on intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration.

Initial TRPA1-mediated carvacrol responses recorded in nominal 0 Ca<sup>2+</sup> 30–50 s after whole-cell formation had a much slower onset than responses measured from cells perfused for 5–6 min with internal solution with or without the peptide. As an apparent consequence, the carvacrol-induced current densities measured at the end of 10s application were significantly smaller in nonperfused cells (median 18.7 pA/pF vs. 8.5 pA/pF for the T1003-P1034 peptide; n = 12 and 6; P = 0.044). Intriguingly, Ca<sup>2+</sup> potentiation was strongly (8.3 ± 1.6 fold) enhanced in the cells recorded within 30–50 s after whole-cell formation and there were no correlation between the peak current amplitudes and the extent of Ca<sup>2+</sup>-induced potentiation (correlation coefficient -0.0979, P = 0.749; n = 12). Inclusion of the T1003-P1034 peptide in the pipette solution significantly (P = 0.028; n = 6) prevented Ca<sup>2+</sup>-dependent potentiation similarly as previously seen with L992-N1008 peptide.

Our results indicate that the important sequences of TRPA1 receptor L992-N1008 and T1003-P1034 are employed in potentiation by calcium ions. These results support hypotheses Ca<sup>2+</sup>/calmodulin complex may compete for the same or overlapping binding site with PIP<sub>2</sub>.

#### *4.3.3 Structural differences in the presence of PIP<sub>2</sub>*

The available TRPA1 cryo-EM structure is poorly resolved at the region Y1006-Q1031. Using PSIPRED server (44), we predicted the

secondary structure of this region with high confidence. The prediction determined helical character of the subregion F1017-P1023. From the available density map, it seems that this part forms a flexible loop, possibly with an  $\alpha$ -helical secondary structure, and PIP<sub>2</sub> may contact the loop. To reveal their mutual structural interference, conformational changes under different lipidic environment were studied by the circular dichroism experiments.

In terms of the peptide secondary structure, CD data indicate that both peptides are highly nonstructured (random coil), with a certain degree of antiparallel  $\beta$ -sheet. The peptide L992-N1008 also presents a certain degree of helical content. The data suggest no significant peptide conformational changes from a buffer system and upon interaction with POPC or POPC/PIP<sub>2</sub> (9.5/0.5 and 8/2 mol.mol<sup>-1</sup>) at 1/50 to 1/10 P/L ratios. Secondary structure content has been calculated using BeStSel software (45) reaching 0.8 - 6.9 % of the  $\alpha$ -helix, 26.2-34.2 % of the antiparallel  $\beta$ -sheet, 15.3-17 % of the turn and 47.7-54.1 % of the random coil for both the peptides.

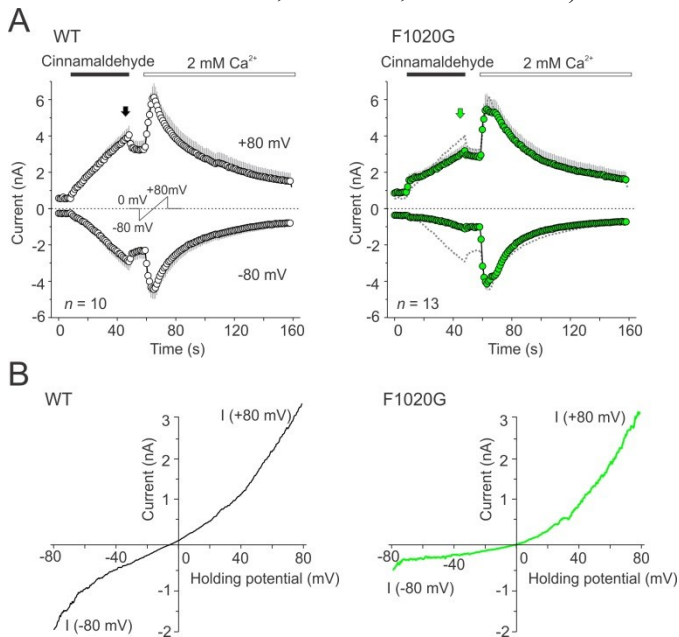
#### *4.3.4 Conserved F1020 contributes to stabilization of TRPA1 channel gate*

Based on the multiple sequence alignment from 65 sequences of vertebrate TRPA1 proteins over the flexible linker region, the most conserved residue within the putative short  $\alpha$ -helix is the central phenylalanine 1020. The residue is situated in the middle of the predicted short helix adjacent (5 Å) to functionally important receptor regions: fifth transmembrane domain (R875) and intracellular S2–S3 linker (F800 and M801). We substituted this residue with glycine to disrupt the predicted helical structure and measured agonist-induced responses from transfected HEK293T cells using whole-cell patch-clamp electrophysiology. Cinnamaldehyde, a partial electrophilic agonist of TRPA1, was sufficient to activate the mutant channels at a concentration of 100  $\mu$ M. We used a previously established protocol in which currents were first induced by the electrophilic agonist in the absence of external Ca<sup>2+</sup>. The agonist was then washed out for 10 s, and 2 mM Ca<sup>2+</sup> was added to the extracellular solution to assess the allosteric effects of permeating calcium ions (Fig. 5).

The membrane potential was linearly ramped up each second from -80 to +80 mV (1 V.s<sup>-1</sup>). Compared to wild-type channels, mutation F1020G



produced a strong outward rectification of currents measured in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$  as was visible from the current–voltage relationships obtained after 30 s application of agonist and from the time course of rectification ratio measured at -80 mV and at +80 mV. At negative membrane potentials, the average peak inward currents through F1020G channels were almost three times smaller ( $-1.0 \pm 0.1$  nA vs.  $-2.9 \pm 0.5$  nA for wild-type;  $P \leq 0.001$ ;  $n = 13$  and 10). The F1020G mediated currents were not significantly different when external calcium was added ( $-4.0 \pm 0.5$  nA vs.  $-4.4 \pm 0.5$  nA at -80 mV;  $P = 0.554$ ; and  $5.6 \pm 0.7$  nA vs.  $6.1 \pm 0.8$  nA at +80 mV;  $P = 0.637$ ;  $n = 13$  and 10).



**Fig. 5: F1020G mutation affects both chemical and voltage activation of TRPA1.** A, Average whole-cell currents induced by 100  $\mu\text{M}$  cinnamaldehyde in  $\text{Ca}^{2+}$ -free solution and then exposed to 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , measured at +80 and -80 mV in wild-type TRPA1 (WT) (left) and F1020G mutant channels (right), where the average current for the WT is overlaid as a gray dashed line for comparison. The membrane potential was linearly ramped up each second from -80 to +80 mV ( $1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ ) (inset). Gray bars indicate SEM (number of cells;  $n = 10$ ). In some cases, the error bars are smaller than the symbol. B, Current–voltage relationships of traces measured at times indicated by arrows in panels A for wildtype (black arrow) and indicated mutant (green arrow).

The mutation of conserved F1020G thus produced strongly rectified currents at negative (physiological) membrane potentials and affected primarily the voltage dependence of the channel under weakly activated conditions (e. g. under subsaturating concentration of agonist or disruption of redox equilibrium).

#### *4.3.5 Discussion*

Although TRPA1 does not necessarily require PIP<sub>2</sub> for function (46), a number of studies have shown that phosphoinositides are involved in TRPA1 regulation under different conditions (14, 48, 49) or not at all (50).

Generally, proteins bind phosphoinositides mainly through electrostatic interactions of their positively charged residues and contributing nearby hydrophobic residues. In TRPA1, a number putative sites of interaction have been proposed (41, 42, 49, 51). Previous predictions for mouse TRPA1 protein sequence pointed to several prototypical PIP<sub>2</sub>-interacting (pleckstrin homology) domains located in the N-terminus (R46-K56, K443-K448, K592-R605) and the distal C-terminus (K1092-R1097)(49); based on later structural (43) and mutagenesis (41, 52) studies, the latter region cannot be excluded. Structural studies (43), together with our results, support the possibility that PIP<sub>2</sub> can regulate TRPA1 either from the inner vestibule of the S1-S4 sensor domain or through a lateral fenestration between two adjacent subunits. Another bioinformatics approach was used by Witschas et al. (42) who mapped the C-terminus of human TRPA1 for prediction of antibacterial activity with AntiBP Server (<http://crdd.osdd.net/raghava/antibp/index.html>). Antibacterial peptides are capable of distinguishing bacterial from mammalian cells based on the differences in plasma membrane composition due to their significant affinity for negatively charged phospholipids (60, 61). Prediction results identified a high propensity for membrane-active region within the most proximal C-terminal region (later recognized as TRP-like domain) and subsequent biophysical studies indeed confirmed a strong interaction of the corresponding peptide I964-L992 with membranes containing anionic lipids (42).

The mapping of antibacterial peptides within the C-terminus predicted also another sequence, with even the highest score: F1017-Q1031. This region has a net charge of zero and contains only one basic residue. Thus,

the predicted interaction with phosphoinositides should be predominantly facilitated by hydrophobic/aromatic residues. In this context, it is noteworthy that a missense mutation of a histidine residue two amino acids upstream of F1020 that is highly conserved among 65 vertebrate TRPA1.

We demonstrate that PIP<sub>2</sub> is essential for the interaction of the peptide comprising the above region (L992-N1008 and T1003-P1034) with membrane lipids. The binding is strong and superficial, inducing only small perturbation in the lipid ordering.

Recently, the critical and dual role of Ca<sup>2+</sup>-calmodulin was revealed in the regulation of TRPA1 (13). Moreover, competition of PIP<sub>2</sub> and calmodulin is a known mechanism of regulation of TRPV1 (53) or the voltage-gated potassium channel Kv7 (54). Our data demonstrate that the peptides corresponding to the calmodulin binding site (L992-N1008) and a partly overlapping region (T1003-P1034) are capable of binding PIP<sub>2</sub> and their affinity is decreased in the presence of Ca<sup>2+</sup>. It can thus be imagined that PIP<sub>2</sub> competes with calmodulin for binding at TRPA1. The Ca<sup>2+</sup>-calmodulin complex primes the channel for activation under weakly activating conditions and inactivates it at higher Ca<sup>2+</sup> concentrations (13, 50) and the process is dependent on Ca<sup>2+</sup>-calmodulin binding. Our results show that the apparent affinity of the non-electrophilic agonist carvacrol to TRPA1 increases with decreasing Ca<sup>2+</sup> concentration. It seems that under basal concentration of Ca<sup>2+</sup>, PIP<sub>2</sub> competes with Ca<sup>2+</sup>-calmodulin for their binding sites. It is noteworthy that a missense mutation of a histidine residue H1018 two amino acids upstream of F1020 was recently found to be associated with childhood asthma. Under which physiological conditions is the regulation of TRPA1 by PIP<sub>2</sub> relevant? In our experiments, the exchange of histidine 1018 to arginine altered the channel gating at physiological membrane potentials (55).

In latest publications, the analgetic and antiflogistic effect of ibuprofen was linked to a metabolite ibuprofen-acyl glucuronide that antagonises TRPA1 receptor (56). Recently, it was shown that an active metabolite of paracetamol N-acetyl-p-benzochinone (NAPQI) activates TRPA1 (57). It seems that in after 100 years from the discovery of paracetamol, we are even closer to the elucidation of the mechanisms of action of this frequently used analgesics.

Better knowledge of molecular regulatory mechanisms of TRPA1 may help to develop new therapeutic strategies.

## 5. Conclusion

Results of the thesis reveal important role of cytoplasmic intersubunit interface in thermal activation of human TRPV3. As there is a high resemblance among the structures of vanilloid TRP channels, our hypothesis is that the identified region is important for heat sensitivity also in other TRPV receptors (TRPV1, TRPV2, TRPV4). Cytoplasmic intersubunit interface in TRPV3 receptor in the region of membrane proximal domain and finger 3 from the adjacent subunit controls gating equilibrium between the open and closed state in thermal activation. Mutations within the finger 3 shift the thermal threshold to lower temperatures and decrease the thermal dependence of TRPV3. From the intersubunit interface, the heat-induced changes may be translated via  $\beta$  sheet, MPD and TRP helix, that are forming a rigid structure with increasing temperature, to the gate.

We succeeded to prove that TRPV3 can be a protein substrate for ERK1/2 protein kinase (kinase regulated by the extracellular signal 1 and 2). Moreover, we identified a potential TRPV3 phosphorylation site that is the main target for ERK1/2. This site may have a physiological and/or pathophysiological role in sensitization of TRPV3 expressed in human keratinocytes via MAPK signalling cascade. In keratinocytes, TRPV3 currents are potentiated by EGF, this potentiation can be abolished by MAP kinase inhibitors. MAPK pathway may contribute to TRPV3 sensitization independently of the PLC signaling pathway. Phosphomimetic mutations at T264 (T264D and T264E) promote the activity of TRPV3 both in keratinocytes and in HEK293T cells. On the contrary, the unphosphorylatable T264A mutant exhibits lower responses to the subsaturating agonist. The overexpression of ERK1 with TRPV3 increases 2-APB responses, prevents TRPV3 sensitization upon repeated stimulation; ERK1 does not affect the nonphosphorylatable T264A mutant. Therefore, T264 is a prime target for ERK-mediated phosphorylation of TRPV3.

We established the conditions under which the specific region L992-P1034 from C-terminal human TRPA1 directly interacts with

phosphatidylinositol-4,5,-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>). Based on our results, the mechanism of regulation by PIP<sub>2</sub> of TRPA1 in nociceptive neurons was suggested. The specific peptides corresponding to calmodulin-binding site have a dominant negative effect on TRPA1 activity. The peptides corresponding the proximal C-terminus binding Ca<sup>2+</sup>- calmodulin form superficial contacts with model membrane only in presence of PIP<sub>2</sub>; the secondary structure of the peptide is not affected by the presence of PIP<sub>2</sub>. Both our peptides interfere with TRPA1 calcium-dependent potentiation. The mutation of the conserved F1020G in the region of a potential TRPA1-PIP<sub>2</sub> interaction statistically decrease the receptor activation at negative membrane potentials. In the model of sensoric neurons, PIP<sub>2</sub> regulates TRPA1 receptor activity in a positive way.

## 6. References

1. Minke B. 2010. *Journal of neurogenetics* 24: 216-33
2. Laing RJ, Dhaka A. 2016. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 22: 171-87
3. Blair NT, Carvacho I, Chaudhuri D, Clapham DE, DeCaen P, et al. Transient Receptor Potential channels. IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY
4. Phelps CB, Wang RR, Choo SS, Gaudet R. 2010. *Journal of Biological Chemistry* 285: 731-40
5. Zhang F, Hanson SM, Jara-Oseguera A, Krepiy D, Bae C, et al. 2016. *eLife* 5
6. Liu B, Qin F. 2017. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114: 1589-94
7. Tan C-H, McNaughton PA. 2016. *Nature* 536: 460-3
8. Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, et al. 2003. *Cell* 112: 819-29
9. Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, et al. 2004. *Nature* 427: 260-5
10. Nilius B, Appendino G, Owsianik G. 2012. *Pflugers Archiv (European Journal of Physiology)* 464: 425-58
11. Laursen WJ, Bagriantsev SN, Gracheva EO. 2014. *Curr Top Membr* 74: 89-112
12. Wang YY, Chang RB, Allgood SD, Silver WL, Liman ER. 2011. *Journal of General Physiology* 137: 493-505
13. Hasan R, Leeson-Payne AT, Jaggar JH, Zhang X. 2017. *Scientific Reports* 7: 45098

14. Akopian AN, Ruparel NB, Jeske NA, Hargreaves KM. 2007. *J Physiol* 583: 175-93
15. Rohacs T. 2015. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 467: 1851-69
16. Nilius B, Biro T. 2013. *Exp Dermatol* 22: 447-52
17. Zhang H, Sun X, Qi H, Ma Q, Zhou Q, et al. 2019. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 368: 21-31
18. Qu Y, Wang G, Sun X, Wang K. 2019. *Molecular pharmacology*
19. Liu B, Yao J, Zhu MX, Qin F. 2011. *Journal of General Physiology* 138: 509-20
20. Cheng X, Jin J, Hu L, Shen D, Dong XP, et al. 2010. *Cell* 141: 331-43
21. Dittert I, Benedikt J, Vyklicky L, Zimmermann K, Reeh PW, Vlachova V. 2006. *J Neurosci Methods* 151: 178-85
22. Dittert I, Vlachová V, Knotková H, Vitásková Z, Vyklický L, et al. 1998. *J Neurosci Methods* 82: 195-201
23. Shi DJ, Ye S, Cao X, Zhang R, Wang K. 2013. *Protein & cell* 4: 942-50
24. Singh AK, McGoldrick LL, Sobolevsky AI. 2018. *Nature Structural & Molecular Biology* 25: 805-13
25. Zubcevic L, Herzik MA, Jr., Wu M, Borschel WF, Hirschi M, et al. 2018. *Nature communications* 9: 4773
26. Liao M, Cao E, Julius D, Cheng Y. 2013. *Nature* 504: 107-12
27. Cao E, Liao M, Cheng Y, Julius D. 2013. *Nature* 504: 113-8
28. Huynh KW, Cohen MR, Jiang J, Samanta A, Lodowski DT, et al. 2016. *Nature communications* 7: 11130
29. Deng ZQ, Paknejad N, Makshev G, Sala-Rabanal M, Nichols CG, et al. 2018. *Nature Structural & Molecular Biology* 25: 252-60
30. Zubcevic L, Herzik MA, Jr., Chung BC, Liu Z, Lander GC, Lee SY. 2016. *Nature Structural & Molecular Biology* 23: 180-6
31. Zubcevic L, Borschel WF, Hsu AL, Borgnia MJ, Lee SY. 2019. *eLife* 8
32. Zheng W, Qin F. 2015. *The Journal of General Physiology* 145: 443-56
33. Wen H, Qin F, Zheng W. 2016. *Proteins* 84: 1938-49
34. Chugunov AO, Volynsky PE, Krylov NA, Nolde DE, Efremov RG. 2016. *Scientific Reports* 6: 33112
35. Raymond KA, Twomey EC, Wei Y. 2014. *Journal of Integrated OMICS* 4: 79-86
36. Melnick C, Kaviani M. 2018. *Journal of Theoretical Biology* 444: 38-49
37. Gao Y, Cao E, Julius D, Cheng Y. 2016. *Nature* 534: 347-51
38. Kasimova MA, Yazici A, Yudin Y, Granata D, Klein ML, et al. 2018. *The Journal of Physical Chemistry Letters* 9: 1260-4
39. Singh AK, Saotome K, McGoldrick LL, Sobolevsky AI. 2018. *Nature Communications* 9: 2465
40. Karttunen S, Duffield M, Scrimgeour NR, Squires L, Lim WL, et al. 2015. *Journal of Cell Science* 128: 225-31

41. Samad A, Sura L, Benedikt J, Ettrich R, Minofar B, et al. 2011. *Biochemical Journal* 433: 197-204
42. Witschas K, Jobin ML, Korkut DN, Vladan MM, Salgado G, et al. 2015. *Biochimica et Biophysica Acta* 1848: 1147-56
43. Paulsen CE, Armache JP, Gao Y, Cheng Y, Julius D. 2015. *Nature* 520: 511-7
44. Buchan DWA, Jones DT. 2019. *Nucleic acids research* 47: W402-W7
45. Micsonai A, Wien F, Kernya L, Lee YH, Goto Y, et al. 2015. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112: E3095-103
46. Moparthy L, Survery S, Kreir M, Simonsen C, Kjellbom P, et al. 2014. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 16901-6
47. Kim D, Cavanaugh EJ. 2007. *J Neurosci* 27: 6500-9
48. Dai Y, Wang S, Tominaga M, Yamamoto S, Fukuoka T, et al. 2007. *J Clin Invest* 117: 1979-87
49. Karashima Y, Prenen J, Meseguer V, Owsianik G, Voets T, Nilius B. 2008. *Pflugers Arch* 457: 77-89
50. Wang YY, Chang RB, Waters HN, McKemy DD, Liman ER. 2008. *J Biol Chem* 283: 32691-703
51. Zimova L, Sinica V, Kadkova A, Vyklicka L, Zima V, et al. 2018. *Science signaling* 11
52. Sura L, Zima V, Marsakova L, Hynkova A, Barvik I, Vlachova V. 2012. *Journal of Biological Chemistry* 287: 18067-77
53. Grycova L, Lansky Z, Friedlova E, Obsilova V, Janouskova H, et al. 2008. *Biochem Biophys Res Commun* 375: 680-3
54. Alberdi A, Gomis-Perez C, Bernardo-Seisdedos G, Alaimo A, Malo C, et al. 2015. *Journal of cell science* 128: 4014-23
55. Zimova L, Sinica V, Barvikova K, Vlachova V. 2019. *Identification of a putative region critical for cold sensitivity of TRPA1*. Presented at EUROPEAN BIOPHYSICS JOURNAL WITH BIOPHYSICS LETTERS
56. De Logu F, Li Puma S, Landini L, Tuccinardi T, Poli G, et al. 2019. *Pharmacological research* 142: 127-39
57. Andersson DA, Gentry C, Alenmyr L, Killander D, Lewis SE, et al. 2011. *Nat Commun* 2: 551
58. Susankova K, Ettrich R, Vyklicky L, Teisinger J, Vlachova V. 2007. *J Neurosci* 27: 7578-85
59. Vlachova V, Teisinger J, Sušánková K, Lyfenko A, Ettrich R, Vyklicky L. 2003. *J Neurosci* 23: 1340-50
60. Lata S, Sharma BK, Raghava GP. 2007. *BMC bioinformatics* 8: 263
61. Matsuzaki K. 2009. *Biochimica et Biophysica Acta* 1788: 1687-92

## **Curriculum vitae**

**Ing. Lucie Máčiková**

**Oddělení buněčné neurofyzologie, Fyziologický ústav AVČR**

Videňská 1083, 142 20 Praha 4

email: Lucie.Macikova@fgu.cas.cz

## **Vzdělání**

**2016–současnost PhD program Fyziologie živočichů**, Univerzita Karlova, Česká republika; Téma: Buněčné a molekulární mechanismy aktivace teplotně citlivých TRP iontových kanálů (RNDr. Viktorie Vlachové, DrSc.)

**2014–2016 Magisterský navazující studijní program Biotechnologie léčiv**, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, Česká republika; Téma: Sledování vybraných skupin alkaloidů v rostlinných matricích a produktech (Doc. Dr. Ing. Věra Schulzová)

**2011–2014 Bakalářský studijní program Biotechnologie léčiv**, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, Česká republika; Téma: Fytoestrogeny v doplňcích stravy (Doc. Dr. Ing. Věra Schulzová)

## **Zkušenosti**

**2016–současnost Laboratoř TRP iontových kanálů**  
Oddělení buněčné neurofyzologie, Fyziologický ústav AVČR, Praha, Česká republika

**2017 Laboratoř spektroskopie a zobrazování membrán aktivních peptidů**, Ústav chemie a biologie membrán a nanoobjektů, Univerzita v Bordeaux, Pessac, Francie

**2013–2016 Analytická laboratoř sekundárních metabolitů**  
Ústav analýzy potravin a výživy, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Česká republika

## **Laboratorní dovednosti**

- Elektrofyzilogická technika patch clamp, měření z celé buňky
- Biofyzikální techniky – Cirkulární dichroismus, Plazmonová vlnodná rezonance, Mikrofluidní difúzní dimenzování
- Analytické techniky – izolace sekundárních metabolitů, gelová permeační chromatografie, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, infračervená spektrometrie, fluorescenční spektrometrie
- Chov a transfekce buněčných linií HEK293, HaCaT, F11
- Molekulárně genetické metody – DNA izolace and charakterizace, PCR, klonování, mutagenese



## Curriculum vitae

### MSc. Lucie Macikova

Department of Cellular Neurophysiology, Institute of Physiology CAS  
Videnska 1083, 142 20 Prague 4  
email: Lucie.Macikova@fgu.cas.cz

### Education

**2016–Present PhD program in Animal Physiology**, Charles University in Prague, Czech Republic; Topic: Cellular and Molecular Mechanisms of Activation of Thermally Sensitive TRP Ion Channels  
(Dr. Viktorie Vlachova, DSc.)

**2014–2016 Master degree in Biotechnology of Drugs and Medicines**, University of Chemistry and Technology, Prague, Czech Republic; Topic: Monitoring of selected groups of alkaloids in plant materials and products (Dr. Vera Schulzova)

**2011–2014 Bachelor degree in Biotechnology of Drugs and Medicines**, University of Chemistry and Technology, Prague, Czech Republic; Topic: Phytoestrogens in food supplements (Dr. Vera Schulzova)

### Research training

**2016–Present Laboratory of TRP ion channels**  
Department of Cellular Neurophysiology, Institute of Physiology CAS, Prague, Czech Republic

**2017 Laboratory of Spectroscopy and imaging of membrane active peptides**, Institute of Chemie and Biologie of Membranes and nano-objects, University of Bordeaux, Pessac, France

**2013–2016 Analytical laboratory of secondary metabolites**  
Department of Food Analysis and Nutrition, University of Chemistry and Technology, Prague, Czech Republic

### Laboratory skills – a hands-on technique

- Electrophysiology techniques – patch clamp in whole-cell configuration
- Biophysical techniques – Circular dichroism, Plasmon waveguide resonance, Microfluidic diffusional sizing
- Analytical techniques – isolation of secondary metabolites, gel permeation chromatography, liquid chromatography, mass spectrometry, IR spectrometry, fluorescent spectrometry
- HEK293, HaCaT, F11 cell cultures maintenance and transfection
- Molecular genetics methods – DNA and RNA isolation and characterization, PCR, cloning, and mutagenesis

## Seznam publikací /List of publications

**Macikova, L.**; Vyklicka, L.; Barvik, I.; Sobolevsky, A. I.; Vlachova, V. (2019) Cytoplasmic Inter-Subunit Interface Controls Use-Dependence of Thermal Activation of TRPV3 Channel. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (16), 3990-4007. (IF = 4.183)

**Macikova, L.**; Sinica, V.; Kadkova, A.; Villette, S.; Ciaccafava, A.; Faherty, J.; Lecomte, S.; Alves, I. D.; Vlachova, V. (2019) Putative interaction site for membrane phospholipids controls activation of TRPA1 channel at physiological membrane potentials. *The FEBS journal*. 286 (18), 3664-3683. (IF = 4.739)

Vyklicka, L.; Boukalova, S.; **Macikova, L.**; Chvojka, S.; Vlachova, V. (2017) The human transient receptor potential vanilloid 3 channel is sensitized via the ERK pathway, *The Journal of biological chemistry*, 292 (51), 21083-21091. (IF = 4.106)

Sinica, V.; Zimova, L.; Barvikova, K.; **Macikova, L.**; Barvik, I.; Vlachova V. (2020) Human and Mouse TRPA1 Are Heat and Cold Sensors Differentially Tuned by Voltage. *Cells*, 9 (1), 57-80. (IF = 5.656)

Zimova, L.; Barvikova, K.; **Macikova, L.**; Vyklicka, L.; Sinica, V.; Barvik, I.; Vlachova, V. (2020) Proximal C-terminus Serves as a Signaling Hub for TRPA1 Channel Regulation via Its Interacting Molecules and Supramolecular Complexes. *Frontiers in Physiology*, doi: 10.3389/fphys.2020.00189. (IF = 3.201)

Vlachova, V.; **Macikova, L.**; Barvikova, K. (2018) Receptor pro hořčici místem účinku paracetamolu. (česky) *Bolest*, 21(8), 131-138.