

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta**

Doktorský studijní program: Fyziologie živočichů



Ing. Lucie Máčiková

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

Školitel: RNDr. Viktorie Vlachová, DrSc.

Typ závěrečné práce:
Disertační práce

Praha 2020

Prohlášení

Tato dizertační práce byla vypracována na oddělení buněčné neurofyziologie Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky v období říjen 2016 – březen 2020. Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Poděkování

Za poskytnuté rady, vstřícnost, trpělivost, veškeré připomínky, odbornou diskuzi a vedení bych chtěla poděkovat RNDr. Viktorii Vlachové, DrSc. a dále naší laborantce na oddělení buněčné neurofyziologie Magdaléně Kuntošové za zajištění chodu laboratoře, chovu buněčných linií a utvoření příjemného pracovního prostředí. Díky Stipendiu Francouzské vlády udělené Francouzskou ambasádou v České republice mi bylo umožněno absolvovat dvouměsíční stáž na oddělení chemie a biochemie membrán a nanostruktur na Univerzitě v Bordeaux, Francie. Mé díky patří také Grantové agentuře Univerzity Karlovy za finanční podporu projektů formou grantů (č.74417 a č.406119), které mi umožnily získat výsledky a následně je aktivně prezentovat na mezinárodních konferencích. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat Zuzaně Soukupové, pracovníci sekretariátu katedry Fyziologie živočichů Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy, za ochotu poradit se všemi studijními záležitostmi.

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 (PIP₂). Na základě našich výsledků byl navržen mechanismus, kterým PIP₂ 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 fenylalaninu 1020 v této oblasti významně snižuje aktivaci receptoru při negativním membránovém potenciálu. Prokázali jsme, že PIP₂ zvyšuje aktivitu TRPA1 receptoru v buněčném modelu senzorickeých 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 (PIP₂) and we have proposed the mechanism of TRPA1 regulation by PIP₂ 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, PIP₂ positively regulated the activity of TRPA1 receptor.

Obsah

1	Literární úvod.....	1
1.1	TRP iontové kanály	1
1.1.1	Struktura TRP iontových kanálů	1
1.1.2	Výskyt a fyziologický význam TRP iontových kanálů.....	3
1.1.3	Klasifikace sensorických neuronů pomocí <i>trp</i> genů	4
1.2	Teplotně citlivé TRP kanály	5
1.2.1	Molekulární podstata teplotní aktivace	6
1.3	TRPA1	7
1.3.1	Molekulární struktura TRPA1	7
1.3.2	Fyziologická úloha, mechanismy aktivace a farmakologické vlastnosti TRPA1	8
1.3.3	Genetické polymorfizmy <i>trpa1</i>	13
1.3.4	Regulace TRPA1 vápenatými ionty a membránovými fosfolipidy	14
1.4	TRPV3	16
1.4.1	Molekulární struktura TRPV3.....	16
1.4.2	Fyziologický výskyt a význam TRPV3	17
1.4.3	Chemická aktivace TRPV3, agonisté a antagonisté.....	18
1.4.4	Funkčně závislá aktivace a senzitivace TRPV3	22
1.4.5	Signální dráhy ovlivňující TRPV3.....	22
1.5	Možný evoluční význam mutací v termoTRP kanálech.....	24
2	Cíle práce	25
3	Materiály a metody	26
3.1	Chemikálie a roztoky.....	26
3.2	Cílená mutageneze.....	29
3.3	Buněčné linie a transfekce	33
3.4	Elektrofyzilogické měření metodou terčíkového zámku.....	35
3.5	Příprava malých jednolamelárních vezikul (SUV).....	37
3.6	Plazmonová vlnovodná rezonance (PWR)	37
3.7	Mikrofluidní difúzní dimenzování (MDS)	38
3.8	Infračervená spektrometrie typu <i>pATR-FTIR</i>	38
3.9	Fluorescenční analýza membránové integrity lipozomů	39
3.10	Církulární dichroizmus (CD).....	40

3.11	Vyhodnocení Q_{10} teplotní aktivace.....	40
3.12	Statistické zpracování a sdružování průměrů dat	40
3.13	Simulace molekulární dynamiky	41
3.14	Molekulární dokování.....	41
4	Výsledky	42
4.1	Cytoplazmatické rozhraní mezi podjednotkami určuje charakteristiku teplotní aktivace TRPV3.....	42
4.1.1	Teplotní aktivace TRPV3 je funkčně závislá.....	43
4.1.2	Třetí smyčka ankyrinové domény určuje funkční závislost teplotní senzitivace TRPV3	47
4.1.3	Cytoplazmatické rozhraní mezi podjednotkami řídí vrátkování TRPV3.....	53
4.1.4	Modelování molekulární dynamiky TRPV3	60
4.2	Funkční regulace TRPV3 kanálu fosforylací	61
4.2.1	Predikce a testování potenciálních fosforylačních míst	61
4.2.2	Regulace TRPV3 pomocí ERK fosforylace.....	63
4.2.3	Nadměrná exprese ERK1 podporuje specifickou fosforylací Thr264	64
4.2.4	Snížení míry potenciace indukované EGF u mutace T264A	65
4.3	Oblast TRPA1 receptoru interagující s membránovými fosfolipidy reguluje aktivaci TRPA1 na fyziologických membránových potenciálech.....	67
4.3.1	Povrchová vazba peptidů k membránovým fosfolipidům s PIP_2	68
4.3.2	Domněle interagující oblast TRPA1 s PIP_2 kompetuje o místo s komplexem Ca^{2+} /kaldmodulin	72
4.3.3	Změny ve struktuře receptoru vyvolané přítomností PIP_2	74
4.3.4	Konzervovaný F1020 přispívá ke stabilizaci vrátek TRPA1	76
5	Diskuze	79
5.1	Mechanismy teplotní aktivace TRPV3.....	79
5.2	Funkční regulace TRPV3 kanálu fosforylací	81
5.3	Úloha membránových fosfolipidů v regulaci TRPA1	82
6	Závěr	84
	Literatura	85
	Přílohy	94
	Souhrn publikací	96

Seznam použitých zkratek

2-APB	2-aminoethyldifenylborát
A β	myelinizovaná nervová vlákna skupiny A vedoucí středně rychle (30-80 m/s)
A δ	slabě myelinizovaná nervová vlákna skupiny A vedoucí pomalu (3-30 m/s)
AITC	allyl isothiokyanát
ANOVA	analýza rozptylu (angl. analysis of variance)
ATP	adenosintrifosfát
ARD	ankyrinová repetitivní doména
β -ME	β -mercaptoetanol
bp	pár bází
C-C	angl. coiled-coil
CaM	kalmodulin (angl. calmodulin)
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
CD	spektroskopie typu cirkulární dichroismus
CGRP	calcitonin gene-related peptid
CLS	Cell Lines Service
COPD	chronická plicní obstruktivní choroba
COX	cyklooxygenáza
DNA	deoxyrinonukleová kyselina
dNTP	směs deoxynukleosid trifosfátů
DAG	diacylglycerol
DMEM	angl. Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DPTHF	difenyltetrahydrofuran
DRG	zadní kořeny míšni (angl. dorsal root ganglia)
DTT	dithiothreitol
ECACC	European Collection of Authenticated Cell Cultures
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (angl. ethylenediaminetetraacetic acid)
EGF	epidermální růstový faktor (angl. epidermal growth factor)
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor
EGTA	kyselina ethylenglykol-di-(2-aminoethylether)-tetraoctová
ELFO	elektroforéza
ER	endoplazmatické retikulum
FAAH	hydrolázy amidů mastných kyselin
FTS	fetální telecí sérum
GFP	zelený fluorescenční protein (angl. green fluorescent protein)
GMO	geneticky modifikovaný organizmus
GPCR	Receptor spřažený s G proteinem (angl. G protein-coupled receptor)
HaCaT	imortalizované lidské kožní keratinocyty (angl. human keratinocyte)
HEK	lidské embryonální ledvinové buňky (angl. human embryonic kidney)
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina

IAG	ibuprofen-acyl glukuronid
IgE	Imunoglobulin E
IP ₃	Inositol trifosfát
IP ₃ R	Receptor pro inositol trifosfát
IUPHAR	angl. International Union of Basic and Clinical Phyrmacology
LUV	velké jednodlamelární vezikuly (angl. large unilamellar vesicles)
MAPK	mitogenem aktivované protein kinasy
MATra	magnetem asistovaná transfekce
MD	molekulární dynamika
MDS	mikrofluidní difúzní dimenzování (angl. microfluidic diffusional sizing)
MEK	mitogenem aktivovaná protein kináza/ERK kináza
MLV	multilamelárních vezikul
MPD	membránový proximální doména
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina (angl. messenger ribonucleic acid)
NAPQI	<i>N</i> -acetyl- <i>p</i> -benzochinonimin
NCBI	angl. National Center for Biotechnology Information
Opti-MEM	Optimalizované minimální Eaglovo médium
<i>p</i> ATR-FTIR	polarizovaná infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (angl. polarized attenuated total reflection-Fourier transformation infrared)
PBS	fosfátový pufr (angl. phosphate-buffered saline)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (angl. polymerase chain reaction)
PDB	proteinová databanka
PKA	proteinkináza A
PKC	proteinkináza C
PLC	fosfolipáza C
POPC	palmitoyl-oleoyl-fosfatidylcholin
PIP ₂	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PWD	plazmonová vlnovodná resonance (angl. plasmon waveguide resonance)
Q_{10}	maximální teplotní koeficient
RMSD	střední kvadratická odchylka (angl. root mean square deviation)
RuR	rutheniová červeň (angl. ruthenium red)
SAR	studium vztahu mezi strukturou a funkcí (angl. structure activity relationship)
SD	standardní odchylka (angl. standard deviation)
SEM	standardní chyba průměru (angl. standard error of the mean)
SMALP	nanodisky na bázi polymeru styrenu s kyselinou maleinovou
SUV	malé jednodlamelární vezikuly (angl. small unilamellar vesicles)
TAE	tris-acetát-EDTA
TBS	tris pufr (angl. tris-buffer saline)
ThermoTRP	teplotně citlivé transientní receptorové potenciálové kanály
TIR	totální vnitřní odraz (angl. total internal reflection)
TMD	transmembránová doména
TRP	transientní receptorové potenciálové kanály (angl. transient receptor potential)
TRPA	ankyrinové transientní receptorové potenciálové kanály
TRPC	kanonické, klasické transientní receptorové potenciálové kanály

TRPM	melastatinové transientní receptorové potenciálové kanály
TRPML	mukolipinové transientní receptorové potenciálové kanály
TRPN	nemechanosenzitivní (angl. transient no mechanoreceptor potential C)
TRPP	polycystinové transientní receptorové potenciálové kanály
TRPV	vaniloidní transientní receptorové potenciálové kanály
UV	ultrafialové (angl. ultra violet)
WT	přirozený typ (angl. wild type)

Zkratky aminokyselin

A	Ala	alanin
C	Cys	cystein
D	Asp	kyselina asparagová
E	Glu	kyselina glutamová
F	Phe	fenylalanin
G	Gly	glycin
H	His	histidin
I	Ile	isoleucin
K	Lys	lysin
L	Leu	leucin
M	Met	methionin
N	Asn	asparagin
P	Pro	prolin
Q	Gln	glutamin
R	Arg	arginin
S	Ser	serin
T	Thr	threonin
V	Val	valin
W	Trp	tryptofan
Y	Tyr	tyrosin

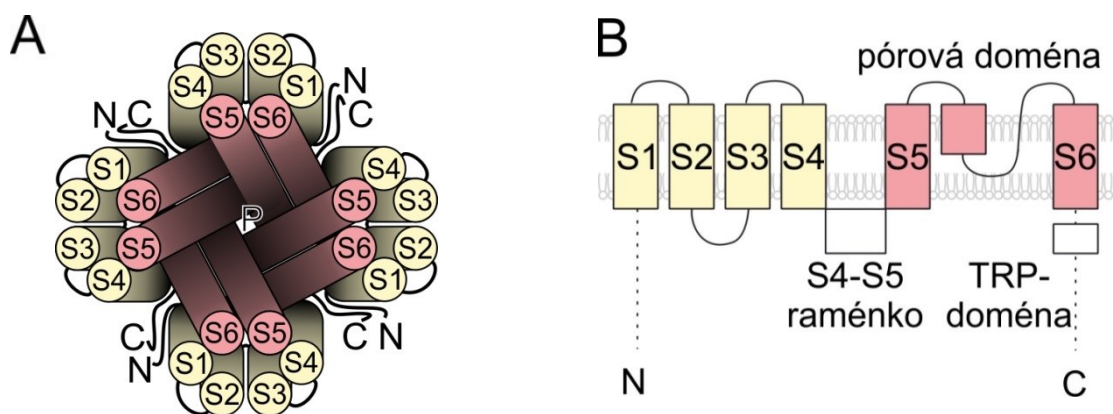
1 Literární úvod

1.1 TRP iontové kanály

K objevu tranzientních receptorových potenciálových (TRP) kanálů v roce 1969 vedlo odhalení *trp* genu kódujícího iontový kanál zapojený do procesu fototransdukce (1). Spontánní mutace tohoto genu způsobila u octomilky (*Drosophila melanogaster*) poruchu v reakci na světlo. Měřením receptorového potenciálu oční sítnice autoři zjistili, že na rozdíl od přetrvávající odpovědi u přirozeného typu kanálu, intenzivní osvětlení u mutantních forem vyvolává jen přechodnou (tranzientní; 10-15 s) změnu. O dvacet let později byl *trp* gen izolován, určena jeho sekvence a navržena membránová topologie (2). Na základě sekvenční homologie byla postupně ustanovena jednotná nomenklatura označující rozsáhlou rodinu dalších později objevených proteinů, nazvaná Transient Receptor Potential, zkráceně TRP (3). Mnoho z těchto iontových kanálů se uplatňuje v převodu různých chemických, teplotních, světelných a mechanických podnětů, a plní tak klíčovou úlohu molekulárních detektorů.

1.1.1 Struktura TRP iontových kanálů

Molekulární struktura TRP iontových kanálů je tvořena čtyřmi symetricky uspořádanými podjednotkami vytvářejícími centrální pór, jehož konzervované vlastnosti určují selektivitu kanálu pro kationty (Obr. 1A). Podjednotky tetrameru mohou být shodné (homotetramer), nebo odlišné (heterotetramer). Heterotetramerizace podjednotek může zapříčinit dramatické změny v biofyzikálních vlastnostech, farmakologii, signalizaci, regulaci i samotné funkci výsledného kanálového komplexu. Může také ovlivnit jeho dopravu do plazmatické membrány (trafficking) a pozměnit jeho celkovou distribuci v rámci buňky (4). Každá podjednotka je tvořena šesti transmembránovými segmenty (S1-S6), pórtvornou klíčkou mezi segmenty S5 a S6 a intracelulárními N- a C-konci (Obr. 1B).



Obr.1: Obecná struktura TRP kanálu. A) Schématické uspořádání podjednotek v tetrameru. Upraveno podle (5). B) Obecná struktura monomeru. P, pór; C, karboxylový-konec; N, aminový-konec; S, transmembránový segment.

Na C-konci TRP proteinů byla na základě sekvenční podobnosti identifikována oblast 25 aminokyselinových zbytků bezprostředně navazující na S6 segment. Tato α -helikální struktura se označuje jako TRP doména a byla nalezena ve všech savčích TRP receptorech s výjimkou TRPP a TRPML receptorů (6, 7). TRP doména obsahuje konzervovanou oblast obsahující sekvenci EWKFAR o pěti až šesti aminokyselinových zbytcích s nejvíce konzervovaným tryptofanem (8). TRP doména je klíčovým strukturálním prvkem zajišťujícím integraci a alosterický převod podnětů z různých částí kanálu na jeho vrátkování (gating) (9).

Na N-koncové oblasti se u TRPV, TRPC a TRPA kanálů nacházejí ankyrinové repetice (AR). Jedná se o strukturální motiv, který se skládá typicky z 33 aminokyselinových zbytků tvořících strukturu typu antiparalelní helix-otočka-helix následovanou smyčkou β -vlásky (finger). Ankyrinové repetice mohou plnit úlohu vazebných míst pro různé ligandy, nebo zajišťovat kontakt proteinů s cytoskeletem (10). Předpokládá se, že vysoký počet ankyrinových repetic (16-29), kterým se vyznačují TRPA1 a TRPN (jen u hmyzu), zodpovídá za mechanosenzitivní vlastnosti těchto iontových kanálů (11).

1.1.2 Výskyt a fyziologický význam TRP iontových kanálů

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 (12, 13). 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). Jejich exprese a funkce byla dobře popsána v primárních aferentních sensorických neuronech ganglií zadních kořenů míšních, uplatňují se však také významně v regulaci mnoha klíčových buněčných funkcí mimo sensorický systém (13-15). Při aktivaci a otevření TRP kanálů dochází ke vtoku monovalentních a divalentních kationtů do buňky a k buněčné depolarizaci. To má za následek aktivaci či inaktivaci napěťově závislých iontových kanálů a následně modulaci hnací síly pro tok dalších iontů jinými kanály a transportéry (16). V některých organelách, jako jsou lysozomy, endozomy, Golgiho aparát, endoplazmatické retikulum a synaptické váčky, slouží některé TRP receptory jako intracelulární iontové kanály propustné pro vápenaté ionty (Ca^{2+}). V sensorických neuronech a kožních buňkách umožňují TRP kanály reagovat na extrémní změny prostředí, mohou být aktivovány řadou endogenních i exogenních chemických a fyzikálních podnětů (např. reaktivní formy kyslíku, zánětlivé mediátory, pálivé a dráždivé substance z rostlin, světlo, teplo, UV záření, chlad, mechanické a osmotické podněty). Na volných nervových zakončeních primárních aferentních sensorických neuronů mají TRP kanály klíčovou úlohu molekulárních detektorů bolestivých a potenciálně škodlivých podnětů. Působením nocicepčního horka či chladu, kyselého prostředí, mechanických podnětů nebo změn osmotického tlaku jsou TRP kanály otevírány, což umožňuje průnik kationtů do nitrobuněčného prostředí, depolarizaci buněčné membrány a následné vyvolání akčního potenciálu, který je nezbytný pro převod bolestivé signalizace do vyšších nervových struktur a odpovídající reakci organismu (17). Informace o nociceptivním podnětu je vedena nemyelinizovanými C vlákny ($0.5\text{-}3.5 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$) a slabě myelinizovanými vlákny A δ ($3\text{-}30 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$) do superficiální oblasti zadních míšních rohů (lamina I, II) (18). Kromě základní fyziologické úlohy mohou změny exprese, funkce, či poruchy regulace TRP kanálů vést k řadě patologických stavů. Mutace v genech kódujících TRP receptory mohou být příčinou řady závažných chronických bolestivých a zánětlivých stavů, kožních onemocnění nebo rakoviny (pro přehledné články viz (14, 19-21)).

1.1.3 Klasifikace senzoričkých neuronů pomocí *trp* genů

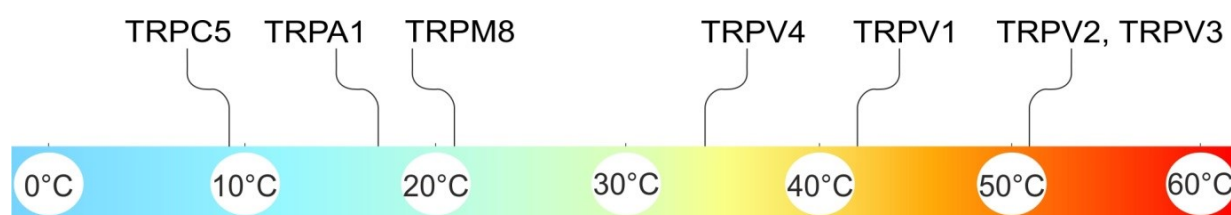
Podtypy senzoričkých neuronů byly po dlouhou dobu tradičně klasifikovány podle morfologického uspořádaní, imunohistochemických vlastností (22-25) a citlivosti k různým modalitám a intenzitám podnětů (26). Jedním z klíčových kritérií pro určení podtypu senzoričkých neuronů a rozlišení nociceptorů se později stalo stanovení citlivosti ke specifickým agonistům teplotně aktivovaných TRP kanálů (27). Současný rozvoj genomických a proteomických metod umožnil rozsáhlé mapování mRNA transkriptů ve funkčně definovaných skupinách neuronů zadních kořenů míšních (28-31). Analýza transkriptomu funkčně charakterizovaných myších neuronů zadních kořenů míšních umožňuje rozlišit 11 základních podtypů senzoričkých neuronů: tři různé skupiny neuronů odpovídajících na slabé mechanické podněty, dva typy proprioceptivních neuronů a šest různých teplotně citlivých skupin senzoričkých neuronů (28). Studie potvrzují specifickou expresi jednotlivých teplotně citlivých TRP kanálů v přesně definovaných podskupinách nociceptorů a upřesňují jejich funkční rozlišení.

1.2 Teplotně citlivé TRP kanály

TRP kanály, které lze přímo aktivovat změnami teploty, se označují termoTRP. Za fyziologické teplotní senzory jsou považovány iontové kanály, které splňují následující podmínky (32, 33):

1. Strmá teplotní závislost, obvykle vyjádřená jako teplotní koeficient Q_{10} vyšší než 5 (případně nižší než 0.2 pro kanály aktivované chladem) v odpovídajícím teplotním intervalu. Q_{10} vyjadřuje faktor, kterým se mění citlivost při nárůstu teploty o 10 °C.
2. Funkční exprese v relevantních buněčných typech, které jsou běžně vystaveny významným teplotním změnám (typicky volná nervová zakončení nebo keratinocyty).
3. Prokázaná *in vivo* účast v teplotní závislosti fyziologických nebo patofyziologických procesů.

Dosud je mezi termoTRP zařazeno nejméně 10 kanálů z celkového počtu 27 TRP proteinů vyskytujících se u člověka (12, 34-36). Teplotní prahy pro aktivaci termoTRP kanálů zahrnují celý rozsah fyziologických a patofyziologických teplot od škodlivého chladu až po škodlivé horko (Obr. 2). Mezi kanály aktivované teplem patří TRPV1-4 (37-42) a TRPM3 (43), chladem aktivované jsou TRPM8 (44) a TRPA1 (45). Mezi termoTRP receptory jsou v literatuře také uváděny TRPM2 (35), TRPM4 a TRPM5 (46) a TRPC5 (47). Přestože tyto kanály splňují výše uvedená kritéria, mechanismus teplotní aktivace není zatím dostatečně prostudován a je pravděpodobné, že výjimečná citlivost k mírnému teplu u TRPM2, 4 a 5, či chladu u TRPC5 je dána nepřímou aktivací dosud neurčenými chemickými produkty intracelulárních signálních drah.



Obr.2: Teplotní prahy aktivace vybraných termoTRP receptorů. Za detekci škodlivého horka jsou zodpovědné kanály TRPV1 při teplotách nad 42 ° C, při teplotách nad 51 ° C pak TRPV2 a TRPV3. TRPV4 je zapojen do detekce tepla. Naproti tomu TRPM8 je aktivován chladem pod 21 °C, TRPA1 je zodpovědný za citlivost na škodlivý chlad (obrázek upraven podle (34, 48)).

Charakteristickou vlastností teplotně aktivovaných TRP kanálů je polymodalita, tj. možnost aktivace různými podněty. Kromě teplotní aktivace lze tak všechny teplotně citlivé TRP kanály aktivovat řadou chemických látek exogenního i endogenního původu, jejichž

společný účinek je typicky více než aditivní (synergický). Tato schopnost umožňuje rychlou odpověď organismu na potenciálně ohrožující podněty a může být také podkladem několikanásobného zvýšení aktivity nociceptorů za patofyziologických podmínek (například teplotní hyperalgie či alodynie). Polymodální vlastnosti značně komplikují nejen výzkum mechanismů aktivace TRP kanálů na molekulární úrovni, ale také snahu nalézt přístupy, které by mohly vést k návrhu účinných látek s analgetickým působením (17, 49).

1.2.1 Molekulární podstata teplotní aktivace

Molekulární mechanismus teplotní aktivace termoTRP kanálů zatím není jednoznačně objasněn a je předmětem intenzivního výzkumu. Jednou z možných hypotéz je aktivace kanálu v důsledku disociace membránových lipidů z vazebného místa na receptoru (50-52). Více autorů se však přiklání k vysvětlení, že mechanismus teplotní aktivace je určen specifickými vlastnostmi proteinové struktury kanálů. Tento mechanismus charakterizují termodynamické parametry teplotní aktivace, jako jsou teplotní práh, citlivost (hodnota Q_{10}) a směr teplotní aktivace, tj. zda je kanál aktivovaný teplem nebo chladem (53-56).

Jedna z obecných hypotéz teplotní aktivace předpokládá existenci teplotně citlivé domény. Tato představa je založená na analogii s výskytem domén se specifickou funkcí prokázanou u jiných iontových kanálů, jako je napěťový senzor, pórová doména nebo místo pro vazbu ligandu. Teplotní senzor doposud nebyl lokalizován pro žádný z teplotně citlivých kanálů. Některé mutace v pórových oblastech, doménách ankyrinových repetitivních a karboxylových koncích termoTRP kanálů snížily teplotní práh, nebo citlivost jejich teplotní aktivace (53, 55, 57, 58). Mutace v oblasti vnější pórové klíčky zrušily teplotní aktivaci TRPV3 kanálu (55). Oblast membránové proximální domény (MPD) na aminovém konci se pak prokazatelně podílí na teplotní aktivaci TRPV kanálů (54). Karboxylový konec je další oblastí, pro kterou byla u TRPV1 a TRPM8 prokázána schopnost určovat charakter teplotní citlivosti: chimérická záměna karboxylových konců zaměnila citlivost těchto receptorů k teplu a chladu (59). Když byla pórová doména draslíkového Shaker Kv kanálu zaměněna za homologní sekvenci TRPV1 (S5-S6 oblast transmembránové domény), ukázalo se, že pórová oblast je postačující pro zvýšení strmosti teplotní aktivace tohoto kanálu (60).

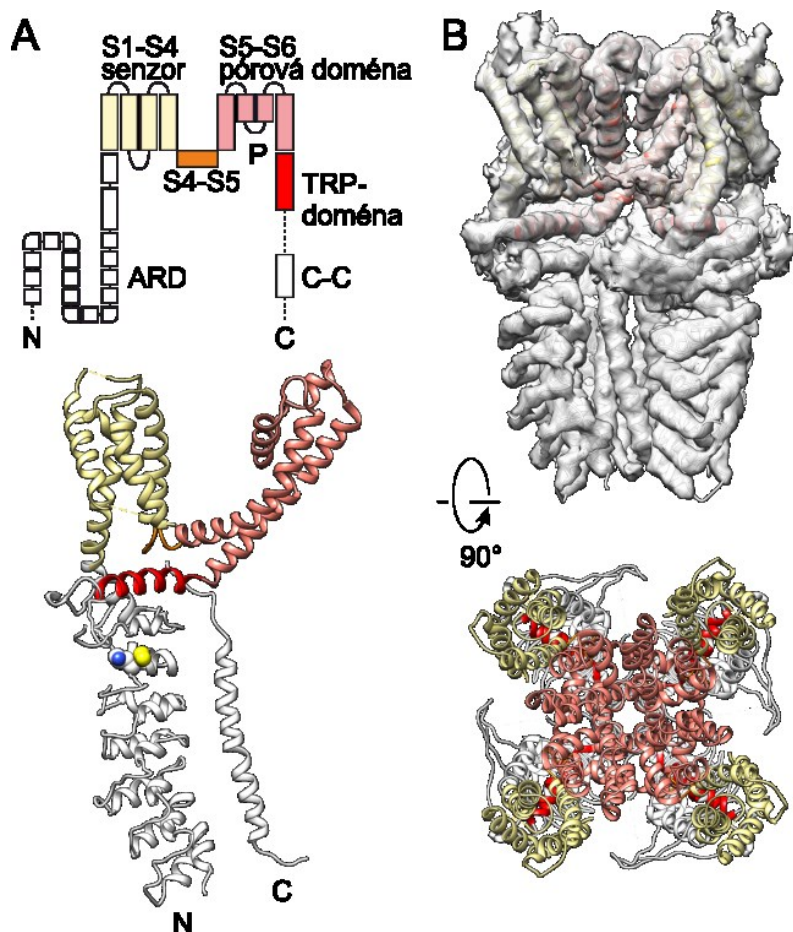
Alternativním navrhovaným mechanismem specifické teplotní aktivace je integrace okolních teplotních vlivů rozpoznávaných hydrofobními aminokyselinovými zbytky rozmístěnými v rámci celého kanálového komplexu. Koordinovaná expozice hydrofobních aminokyselinových zbytků do vodného prostředí teoreticky vysvětluje typické termodynamické charakteristiky teplotně citlivých iontových kanálů (61).

1.3 TRPA1

TRPA1 je polymodální termoTRP kanál zapojený v procesech nocicepce, zánětlivé a neuropatické bolesti, zejména zánětlivé chladové a mechanické hyperalgezie (45, 62-64). Savčí TRPA1 je aktivovaný zchlazením (<12 °C; myši ortolog), depolarizujícím napětím a širokou škálou chemických podnětů, jako jsou dráždivé látky rostlinného původu (např. hořčičný olej), endogenní mediátory zánětu (bradykinin), reaktivní formy kyslíku a dusíku, nebo metabolity lipidů (např. kyselina arachidonová) (63, 65).

1.3.1 Molekulární struktura TRPA1

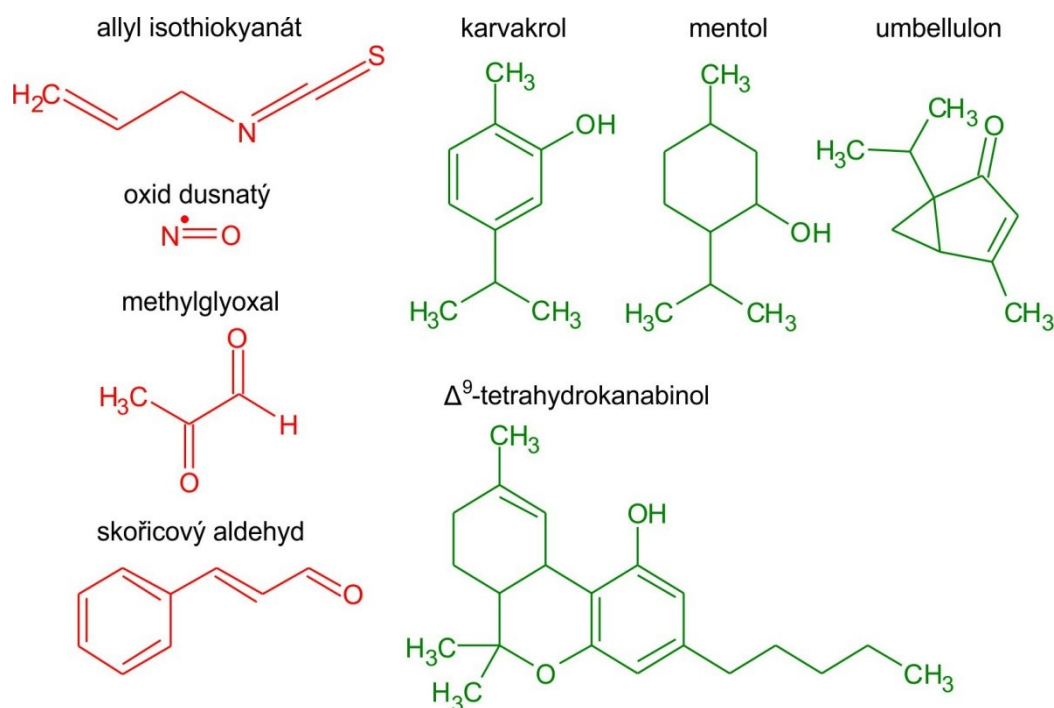
Současný rychlý rozvoj kryoelektronové mikroskopie umožňuje studovat složité proteinové komplexy TRP receptorů v různých funkčních stavech v rozlišení blízkém atomovému (66). V roce 2015 byla publikována struktura TRPA1 kanálu (PDB 3J9P) v rozlišení až 3,92 Å pro konformaci zavřeného stavu kanálu a struktura, ve které je přesně určeno místo vazby specifických antagonistů A-967079 a HC-030031 (5). Podobně jako ostatní TRP kanály je TRPA1 komplexem čtyř stejných symetricky uspořádaných podjednotek. Každá podjednotka obsahuje transmembránovou část a cytoplazmatické N- a C- konce, které tvoří 80% receptoru (Obr. 3). Transmembránová oblast TRPA1 receptoru je tvořena šesti α -helixy (S1 – S6) spojenými extracelulárními a intracelulárními kličkami. Transmembránové segmenty S5 a S6 spolu s raménkem obsahujícím dva krátké helixy tvoří pór iontového kanálu, který umožňuje tok mono- a bivalentních kationtů v závislosti na daném elektrochemickém gradientu. Cytoplasmatický aminový konec je dominantní částí receptoru obsahující rozsáhlou ankyrinovou doménu tvořenou 16 ankyrinovými repeticemi (ARD), spojenou s prvním transmembránovým segmentem S1. N-konec obsahuje řadu funkčně důležitých interakčních míst pro elektrofilní agonisty a prostřednictvím hydrofobních kontaktů s transmembránovou doménou se podílí na integraci a převodu signálu i ze vzdálenějších cytoplazmatických částí kanálového komplexu. Pro aktivaci TRPA1 receptoru elektrofilními agonisty je nutná vysoká reaktivita cysteinu 621 na N-konci (Obr. 3, žlutě vyznačený postranní řetězec), ta je ovlivněna sousedním lysinem 620 (Obr. 3, modře vyznačený postranní řetězec). Proximální část karboxylového konce tvoří helix konzervovaný u všech TRP kanálů (TRP-doména), zajišťující převod signálu do vrátek kanálu. Prodloužená intracelulární část TRPA1 kanálu tvoří strukturu tzv. zavínuté cívky (C-C, angl. coiled-coil), distální část nesoucí záporný náboj reguluje aktivitu kanálu, interaguje s ARD a váže vápenaté ionty.



Obr.3: Struktura TRPA1 kanálu. A) Nahoře, schematické znázornění podjednotky TRPA1 s vyznačením strukturálních domén. N-konec, ankyrinová doména (ARD); světle žlutá, senzor; oranžová, raménko mezi transmembránovými segmenty S4 a S5; lososová, pórová doména S5-S6 se dvěma krátkými pórtočnými helixy (P); červená, TRP-doména; bílá, C-koncová „coiled-coil“ (C-C) doména. Části nedostatečně rozlišené v 3D hustotních mapách jsou vyznačeny čárkovaně. Dole, 3D reprezentace struktury TRPA1 podjednotky, žlutě je vyznačen cystein 621 významný pro svůj klíčový podíl na aktivaci TRPA1 elektrofilními činidly, modře je vyobrazen lysin 620 zvyšující reaktivitu cysteinu 621. B) Tetramer tvořící funkční TRPA1 (PDB 3J9P). Nahoře, hustotní mapa tetrameru. Dole, uspořádání podjednotek v tetrameru tvořící centrální pór kanálu (pohled shora). Upraveno podle (Paulsen et al., 2015).

1.3.2 Fyziologická úloha, mechanismy aktivace a farmakologické vlastnosti TRPA1

TRPA1 je exprimován na tělech peptidergických i nepeptidergických neuronů myelinizovaných A β , A δ i nemyelinizovaných C-vlákén, v melanocytech, žírných buňkách, fibroblastech, odontoblastech, enterochromafinních buňkách, v β -buňkách Langerhansových ostrůvků slinivky břišní, v epitelu dýchacích cest a trávicího traktu, močovém měchýři a v kůži, kde může být aktivován elektrofilními látkami, oxidanty, reaktivními formami kyslíku a dusíku a metabolity lipidů (Obr. 4) (67).



Obr.4: Chemické sktruktury vybraných, fyziologicky významných agonistů TRPA1. Elektrofilní agonisté TRPA1 (červeně) a neelektrofilní (zeleně).

Elektrofilní látky reagují přímo s thiolovými skupinami specifických cysteinových zbytků TRPA1 proteinu a kovalentně jej modifikují (68). Nejedná se tak o klasický mechanismus aktivace vazby ligandu na receptor, který je obvyklý u ostatních iontových kanálů či metabotropních receptorů. Působení mnoha elektrofilních látek na organismus je významně zprostředkováno TRPA1 receptory (67). Z odborné literatury je známo velké množství endogenních i exogenních elektrofilních látek, pro které bylo prokázáno, že přímo aktivují TRPA1 (viz přehledné články (67, 69)). Mezi účinné elektrofilní látky exogenního původu patří pálivý allylisothiokyanát obsažený ve wasabi či hořčičném oleji, skořicový aldehyd, alicin z česneku, nebo akrolein (akrylaldehyd), dráždivá substance obsažená v cigaretovém kouři a průmyslovém a komunálním odpadu (70, 71). Endogenní aktivátory TRPA1 mají důležitou fyziologickou i patofyziologickou úlohu. Jako příklad významných agonistů TRPA1 souvisejících se závažnými patofyziologickými stavy lze uvést acetaldehyd, metabolit etanolu, významný spouštěč migrény a záchvatů při Hortonově syndromu (tzv. “cluster headache”), nebo methylglyoxal působící na nervových zakončeních, zhoršující chronické bolesti končetin u diabetické neuropatie. V posledních letech byl odhalen molekulární mechanismus účinné kompetice elektrofilních látek o interakční místa TRPA1 s buněčnými antioxidanty chránícími cytosolické proteiny před jejich toxickým působením,

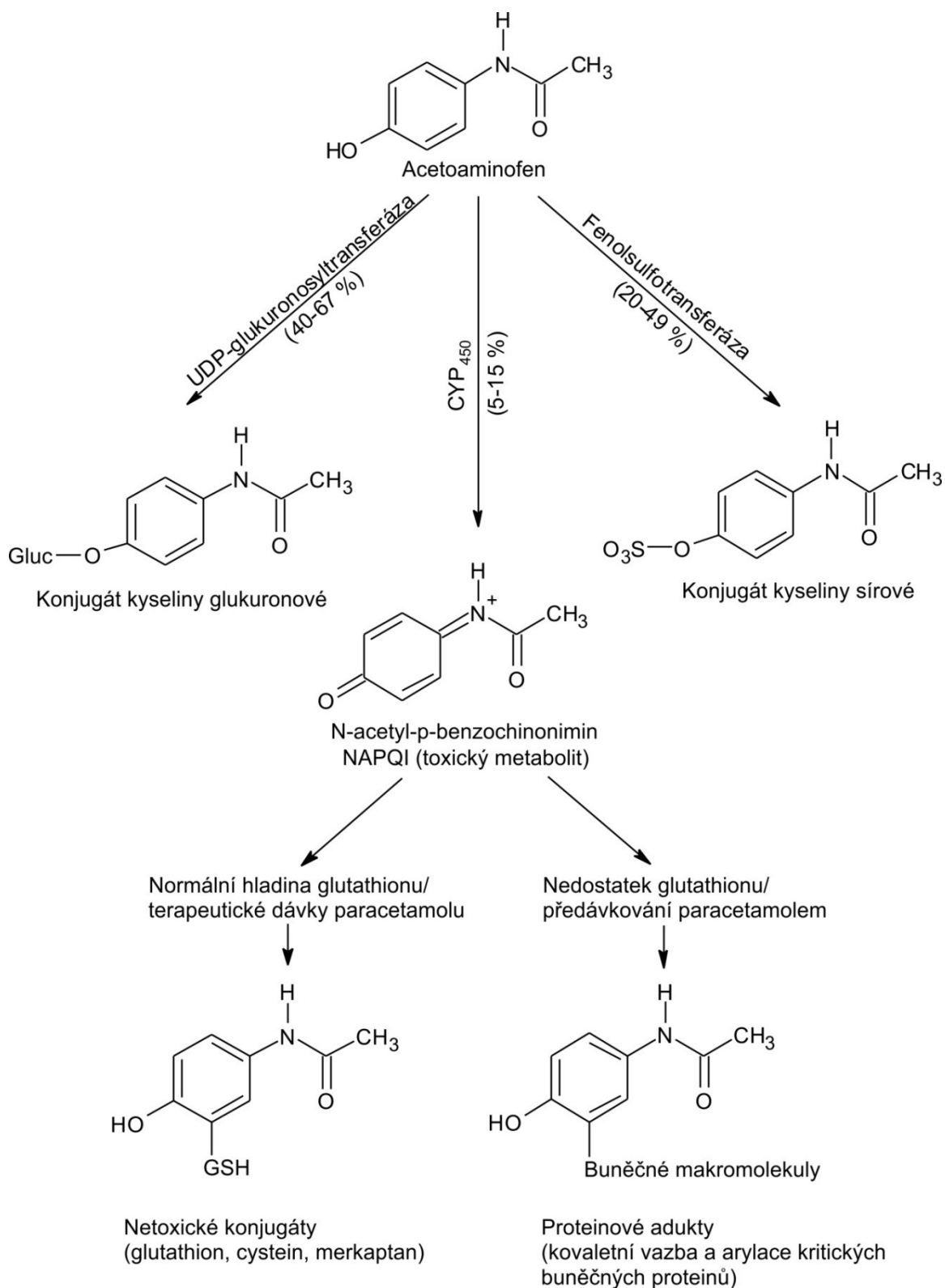
kdy elektrofilní agonisté interagují s cysteiny TRPA1 mnohem (6000×) rychleji než je obvyklá rychlost reaktivity cysteinů a antioxidačních enzymů. Pro aktivaci TRPA1 elektrofilními látkami jsou významné dvě aminokyseliny, cystein 621 a lysin 620 (Obr. 3A) (68). Pravděpodobně i další cysteinové zbytky situované mimo N-konec, přispívají k aktivaci kanálu, jelikož po delecí celé N-koncové domény je citlivost TRPA1 vůči elektrofilům zachována (51).

TRPA1 může být aktivován i nekovalentně, neelektrofilními ligandy, jako jsou kanabinoid Δ^9 -tetrahydrokanabinol, monoterpen karvakrol z dobromysli a tymiánu, či mentol obsažený v mátě peprné. Neelektrofilní agonisté TRPA1 často vykazují dvojí účinek v závislosti na koncentraci: při nízkých koncentracích receptor aktivují a naopak při vyšších koncentracích jej blokují. Příkladem klinicky závažných stavů přisuzovaných zvýšené míře aktivace TRPA1 jsou závažné bolesti hlavy a migrenózní záchvaty způsobené inhalací ketonu monoterpenu nacházejícího se v okoličnatce kalifornské (*Umbellularia californica*). Po aktivaci TRPA1 následované vtokem sodných (Na^+) a vápenatých (Ca^{2+}) iontů kanálem a vznikem akčního potenciálu dochází k uvolnění vazokonstrikčních neuropeptidů z cévních stěn, CGRP (angl. calcitonin gene-related peptid), substance P a neurokininu A (72), které mohou vyvolat aktivaci trigeminálního vaskulárního systému (vlákna 1. větve trojklanného nervu a jím inervované durální tepny) a vznik migrén či vracejících se bolestí hlavy (67). Hypotézu rozhodující účasti TRPA1 v mechanismech vzniku úporných bolestí hlavy podporuje také vysoká léčebná účinnost paracetamolu (viz níže), který je desenzitizujícím agonistou TRPA1, ale také látek rostlinného původu, jako jsou parthenolid přirozeně se vyskytující v kopretině řimbabě (*Tanacetum parthenium*) a tygří mast známá svým benefičním účinkem obsaženého kafru (73, 74). K vysoce účinným agonistům TRPA1 se řadí celková anestetika isofluran a propofol (75).

Cílená modulace TRPA1 receptoru se zdá být slibným směrem při vyhledávání nových léčiv pro terapii bolesti, svědění a sensorické hyperreakivity v útrobních orgánech, jako jsou dýchací cesty, močový měchýř nebo trávicí trakt (67). Z farmakologického hlediska je významným aktivátorem TRPA1 toxický metabolit paracetamolu. Paracetamol je deacetylován na *p*-aminofenol a prostřednictvím hydrolázy amidů mastných kyselin (FAAH) konjugován s kyselinou arachidonovou na bioaktivní *N*-arachidonoyl-fenolamin (AM404). Metabolizmem prvního průchodu játry je transformováno asi 25% přijatého léčiva, většina metabolitů tvoří konjugáty s kyselinami glukuronovou (40 - 67%) a sírovou (20 - 49%), zbytek (5 - 15%) je metabolizován cytochromem P450 na *N*-acetyl-*p*-benzochinonimin (NAPQI) (Obr. 5).

Elektrofilní NAPQI je pak přímým aktivátorem TRPA1 kanálu a podobně jako další elektrofilní metabolit paracetamolu, *p*-benzochinon, se váže kovalentní vazbou k cysteinovým zbytkům TRPA1 proteinu. Z farmakologického hlediska je důležité zjištění, že TRPA1 kanál je desenzitizován vyššími koncentracemi NAPQI a při vyšších koncentracích NAPQI desenzitizuje, což může být jeden z mechanismů analgetického účinku paracetamolu (76).

Stále více experimentálních výsledků svědčí o účasti TRPA1 v mechanismech vzniku zánětlivých onemocnění dýchacích cest navozených paracetamolem. Existuje experimentální evidence, že účinek NAPQI je v běžných terapeutických dávkách paracetamolu spojen s rizikem vzniku chronického obstruktivního plicního onemocnění (COPD) a astmatu (77-79). Je známo, že časté užívání paracetamolu je příčinou zvýšeného výskytu astmatu u dospělých, což je přičítáno snížení hladiny glutathionu v plicích (80). Díky novým poznatkům a současnému rozvoji prediktivní genomiky jsou zkoumány důležité souvislosti, které by mohly přispět k vysvětlení nejen podstaty nežádoucích účinků paracetamolu, ale také objasnit některé příčiny vrozených neurogenních zánětlivých onemocnění.



Obr.5: Jaterní metabolismus paracetamolu ovlivňující aktivitu TRPA1. Hlavní metabolické jaterní dráhy aktivované po podání terapeutických a toxických dávek paracetamolu (upraveno podle (81)).

Důležitá účast TRPA1 receptoru v nociceptivních drahách je podpořena také nedávnou studií, která prokázala, že aktivní metabolit ibuprofenu ibuprofen-acyl glukuronid (IAG) působí jako selektivní inhibitor TRPA1 kanálu. Asi 10-15% přijatého ibuprofenu je při průchodu játry konjugováno s glukuronidem na IAG. Obvykle bývají metabolity glukuronidu neaktivní, avšak IAG by mohl inhibicí TRPA1, který je při zánětu upregulován, přispívat k analgetickému a protizánětlivému účinku ibuprofenu, derivátu kyseliny propionové, jehož hlavním mechanismem účinku je inhibice cyklooxygenázy (COX) a používá se jako léčivo první volby při bolestech a zánětech (82).

1.3.3 Genetické polymorfizmy *trpa1*

Studium vztahu mezi strukturou a funkcí (SAR) je neodmyslitelným předpokladem pro přesné určení vazebného místa pro agonisty a pro úspěšné navržení vhodné chemické struktury potenciálních léčiv. Napomáhají také k pochopení možných příčin vrozených onemocnění, jež jsou důsledkem výskytu variant v genech kódujících klíčové receptory. Studium polymorfizmů a určení důsledků na molekulární úrovni je jedna z nejdůležitějších informací, avšak funkční význam genetických polymorfizmů je v současné době jen velmi málo prozkoumán, zatím jedním z mála dostatečně funkčně charakterizovaných polymorfizmů *trpa1* je jednonukleotidová záměna (identifikační číslo v databázi NCBI SciVar RCV000032802.7) způsobující u člověka autozomálně dominantní neurologické onemocnění charakterizované vyčerpávající epizodickou bolestí v horní části těla, vyvolanou chladem, hladověním nebo fyzickým stresem (83). Identifikované polymorfizmy mohou ovlivňovat nejen celkovou expresi funkčních TRPA1 kanálů, ale také například pravděpodobnost otevření, nebo míru modulace vápenatými ionty (84). Příkladem je výše uvedený polymorfizmus, jenž vede k záměně asparaginu 855 za serin ve funkčně velmi významné oblasti S4-S5 raménka receptoru (oranžová oblast na obrázku 3), která má za následek změnu rovnováhy mezi otevřeným a zavřeným stavem iontového kanálu. Nedávno publikovaná dlouhodobá klinická studie, ve které byla sledována koncentrace imunoglobulinu E (IgE) v séru, identifikovala u dětí monitorovaných do věku 7-8 let tři varianty genu *trpa1* (8q13), které prokazovaly signifikantní asociaci zvýšené hladiny IgE s užíváním paracetamolu v pozdní fázi těhotenství matky. Studie současně prokázala souvislost specifických variant zejména v intronové oblasti *trpa1* s výskytem astmatu u dětí (identifikační čísla v databázi NCBI dbSNP rs959974, rs1384001 a rs7010969) (79). Souvislost výskytu genetických variant *trpa1* se vznikem dětského astmatu vlivem znečištění ovzduší rozptýlenými částicemi byla prokázána také v jiné studii, ve které bylo identifikováno několik mutací v kódující oblasti proteinu s funkční

změnou při aktivaci nerozpustnými částicemi popílku (E179K, K186N, N747A, N753A, N954T a H1018R) (85).

1.3.4 Regulace TRPA1 vápenatými ionty a membránovými fosfolipidy

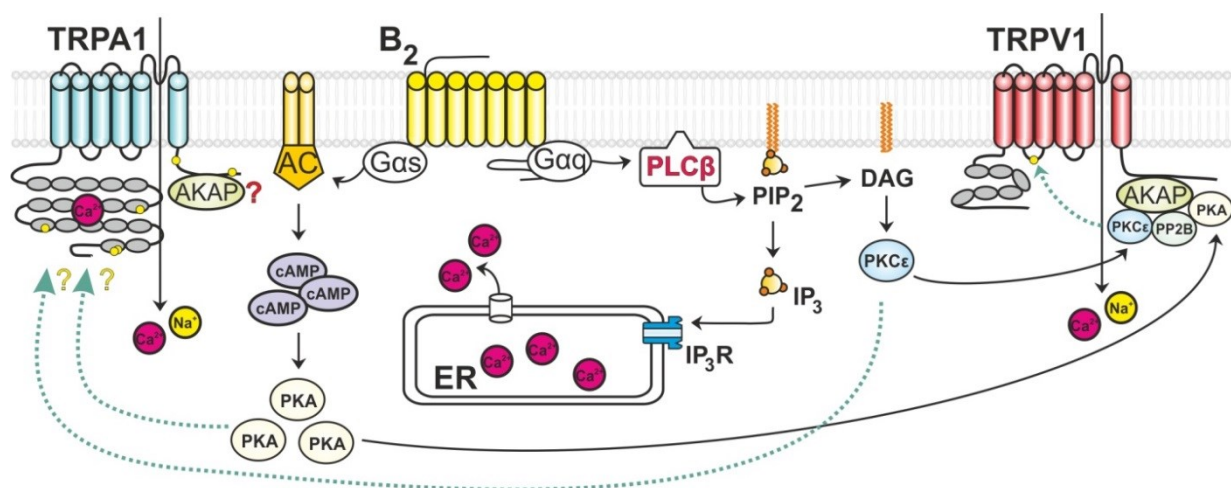
TermoTRP kanály se významně uplatňují v buněčné signalizaci vápenatými ionty Ca^{2+} . Jelikož jsou tyto kanály propustné pro Ca^{2+} a odpovídají na různorodé podněty, jejich aktivace má za následek spuštění řady intracelulárních signálních kaskád závislých na vápníku. Jako neselektivní kationtové kanály při aktivaci depolarizují membránu, a tím ovlivňují vstup Ca^{2+} vápníkovými kanály. Vápenaté ionty pak následně regulují aktivitu řady TRP kanálů, což jim umožňuje fungovat jako molekulární efektory v reakci na vnitrobuněčnou koncentraci vápníku (86).

Také aktivita TRPA1 je významně ovlivňována vápenatými ionty. Tato regulace je bimodálního charakteru v závislosti na intracelulární koncentraci Ca^{2+} : při nízké koncentraci je aktivita kanálu posílena, naopak v přítomnosti zvýšené koncentrace Ca^{2+} je kanál inaktivován (87). Při zánětlivé reakci může být koncentrace intracelulárního vápníku zvýšena, což vede ke zrychlené dopravě („trafficking“) kanálů do plazmatické membrány a následnému zvýšení nociceptivní signalizace (88). Na molekulární úrovni je tento proces řízen prostřednictvím kalmodulinu, který interaguje s karboxylovým koncem TRPA1 v oblasti L992-N1008 (89). Zvýšená cytoplazmatická koncentrace Ca^{2+} také aktivuje fosfolipázu C (PLC), enzym hydrolyzující fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP_2) na vnitřní straně cytoplazmatické membrány.

Bylo prokázáno, že PIP_2 moduluje aktivitu většiny termoTRP kanálů, obecně je desenzitizace TRP kanálů řízena hladinou membránového PIP_2 , avšak úloha PIP_2 v regulaci TRPA1 zatím není dostatečně prozkoumána (90, 91). Některé studie naznačují významnou úlohu modulace zprostředkované PIP_2 v nociceptivních drahách zahrnujících aktivaci TRPA1 prozánětlivými mediátory jako jsou bradykinin (70), nebo proteázou aktivovaný receptor PAR2 (65). Dalším z možných mechanismů působení PIP_2 je permanentní inhibice TRPA1, kdy je kanál senzitivován až následně, po snížení koncentrace PIP_2 v plazmatické membráně prozánětlivými mediátory aktivujícími fosfolipázu C (PLC), a opět nabyde citlivosti (92). Akopian a kol. (2007) naopak ukázali, že desenzitizace TRPA1 je na senzických neuronech zprostředkovaná hydrolýzou PIP_2 , a to pouze po vyvolání odpovědi kapsaicinem, agonistou TRPV1 receptoru, nikoliv agonistou TRPA1 hořčičným olejem (AITC). Naproti tomu desenzitizace TRPA1 navozená farmakologicky není způsobena vyčerpáním PIP_2 (90).

Doposud nebylo jednoznačně prokázáno, zda je regulační účinek membránových fosfolipidů na TRPA1 pozitivní, či negativní. Práce na toto téma jsou nekonzistentní, jak bylo shrnuto v publikacích (93-95). Předkládaná dizertační práce se na tuto problematiku zaměřuje z hlediska možné přímé interakce TRPA1 kanálu s membránovými fosfolipidy, zejména fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátem (PIP₂).

Signalizační drahy zodpovědné za senzitivaci TRPA1 a jejich propojení je znázorněno na obrázku 6.



Obr.6: Propojení signalizačních drah podílejících se na senzitivaci TRPA1 v nociceptivních neuronech. Navázání agonisty bradykininového receptoru 2 (B₂) vede prostřednictvím Gα_q proteinů k aktivaci fosfolipázy Cβ (PLCβ), která naštěpí fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP₂) na diacylglycerol (DAG) a inositol trifosfát (IP₃). Vazbou IP₃ na inositoltrifosfátový receptor (IP₃R) v endoplazmatickém retikulu (ER) dojde ke zvýšení koncentrace Ca²⁺ v cytosolu, a tím senzitivaci TRPA1. DAG aktivuje proteinkinázu Cε (PKCε), která se naváže na kotvící protein AKAP79/150 na C-konci TRPV1. Fosforylace TRPV1 pomocí PKCε způsobí senzitivaci TRPV1 kanálu, zvýšení odpovědi na agonisty, a tím usnadnění vtoku Ca²⁺ do buňky. AKAP79/150 se také váže na TRPA1. Bradykininový receptor B₂ stimuluje Gα_s protein, který aktivuje adenylylcyklázu (AC), čímž se zvýší hladina cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). K senzitivaci TRPA1 přispívá proteinkináza A (PKA) aktivovaná cAMP a také proteinkináza C (PKC) aktivovaná prostřednictvím DAG. Otazníkem jsou označeny možné způsoby senzitivace TRPA1 (převzato z (96)).

1.4 TRPV3

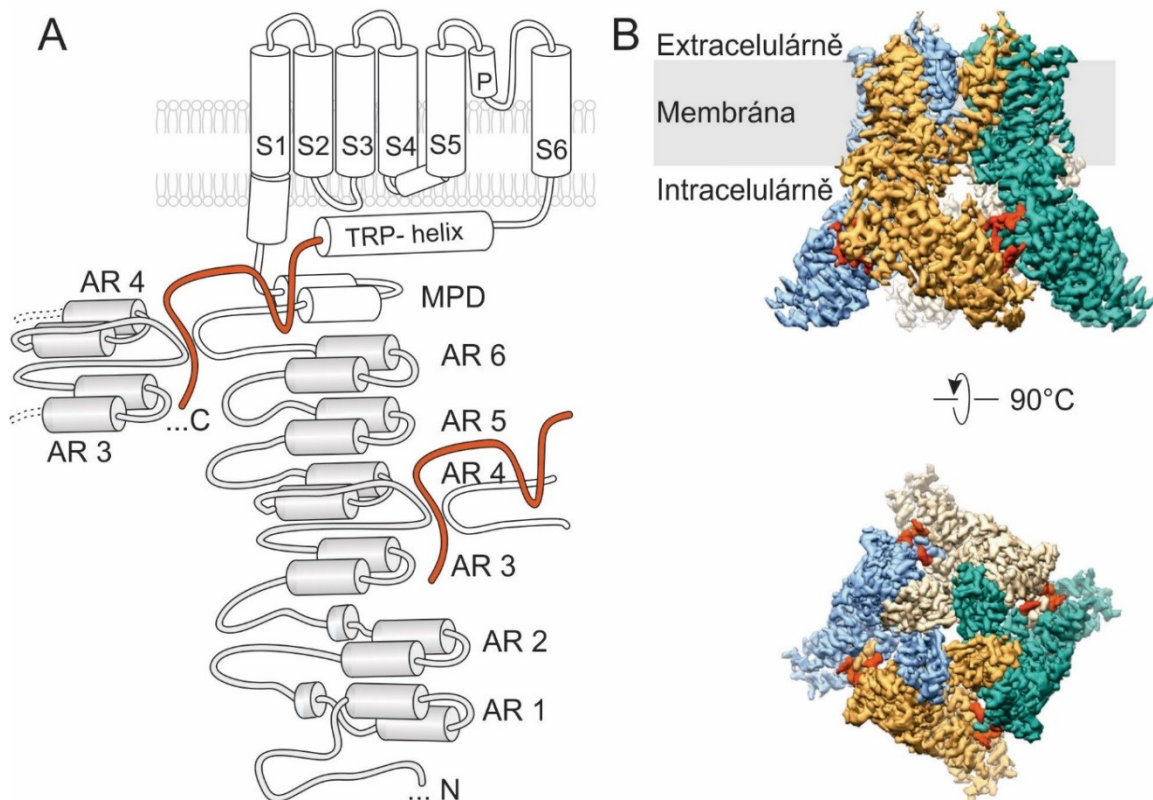
TRPV3 receptor je nejvýznamnějším vaniloidním termoTRP kanálem z hlediska fyziologie a patofyziologie kůže (97). Jedná se o neselektivní kationtový kanál, který propouští monovalentní ionty bez významné selektivity, pro ionty bivalentní je pak propustný se signifikantní selektivitou ($P_{Ca^{2+}}/P_{Na^+} = 2.57$ a $P_{Mg^{2+}}/P_{Na^+} = 2.18$) (40).

Oproti příbuznému kapsaicinovému TRPV1 je TRPV3 necitlivý ke kapsaicinu a nízkému pH (98). Přestože TRPV3 sdílí nízkou sekvenční homologii s TRPV1 (43%) a TRPV2 (41%) (40), není citlivý ke kapsaicinu, avšak citlivost k vaniloidům může podobně jako TRPV2 (36) získat záměnou jen 4-6 aminokyselin v transmembránové oblasti S3-S6 (99).

1.4.1 Molekulární struktura TRPV3

Stejně jako u jiných termoTRP je TRPV3 kanál tvořen čtyřmi podjednotkami, přičemž každá podjednotka obsahuje 6 transmembránových helixů (S1-S6) tvořících transmembránovou doménu (TMD), a dva intracelulární konce (Obr. 7). Podobně jako u napětově aktivovaných kanálů (100) je TMD tvořena dvěma hlavními strukturními doménami, periferní S1-S4 doménou a S5-S6 modulem tvořícím centrální pórovou část. Na rozdíl od napětím aktivovaných iontových kanálů není u TRP kanálů S4 helix nabitý, což vysvětluje jejich slabou napětěvou závislost (101). Intracelulární aminový konec obsahuje membránovou proximální doménu (MPD) a šest ankyrinových repetice tvořících tzv. ankyrinovou doménu (ARD) (102). Karboxylový konec obsahuje část silně konzervovanou, která tvoří α -helix, jehož primární sekvence je charakteristická pro většinu TRP kanálů (TRP helix) (103).

V roce 2018 bylo současně publikováno několik struktur TRPV3 získaných pomocí kryoelektronové mikroskopie: lidský TRPV3 ve formě apoproteinu (PDB 6MHO), v různých konformacích se specifickým agonistou 2-APB (6MHW, 6MHV, 6MHS) a ve funkčně senzitivovaném stavu (6MHS), a myší TRPV3 ve formě apoproteinu (PDB 6DVW) a jeho strukturních konformacích s 2-APB (6DVY, 6DVZ) (104, 105).



Obr.7: Struktura TRPV3. A) Schematické znázornění struktury monomeru TRPV3 kanálu a rozhraní podjednotek. C, C-konec; N, N-konec; S, segment; P, pór; MPD, membránová proximální doména; AR, ankyrinová repetice. B) 3D rekonstrukce lidského TRPV3 tetrameru v apo formě (PDB 6MHO), C-konec je vybarven červeně (převzato z (105))

1.4.2 Fyziologický výskyt a význam TRPV3

TRPV3 receptor je primárně exprimovaný v kůži, především v keratinocytech a buňkách obklopujících vlasové folikuly. Tím se liší od většiny termoTRP, které jsou ve zvýšené míře exprimovány v periferním nervovém systému. TRPV3 má prokazatelnou fyziologickou úlohu v udržování kožní homeostáze, je nezbytný pro správnou morfologii a funkci kůže a uplatňuje se v mechanismech kožní nocicepce (106).

Dále se vyskytuje v epitelálních buňkách jazyku a nosu, kde je zřejmě zodpovědný za detekci chutí, pachů a některých dráždivých látek (pro přehled viz (107)). V menší míře je TRPV3 exprimován i v trigeminálních gangliích, neuronech zadních kořenů míšních, mozku a míše, kde může vytvářet heterotetramery s jinými členy termoTRP proteinů (108-110). V souvislosti s výskytem TRPV3 na serotonergních neuronech v zadním retikulárním jádře se uvažuje o jeho zapojení v mechanismech vzniku dlouhodobých depresí (111). Prokázány byly antidepresivní a anxiolytické účinky po aktivaci TRPV3 v centrálním nervovém systému (40, 112).

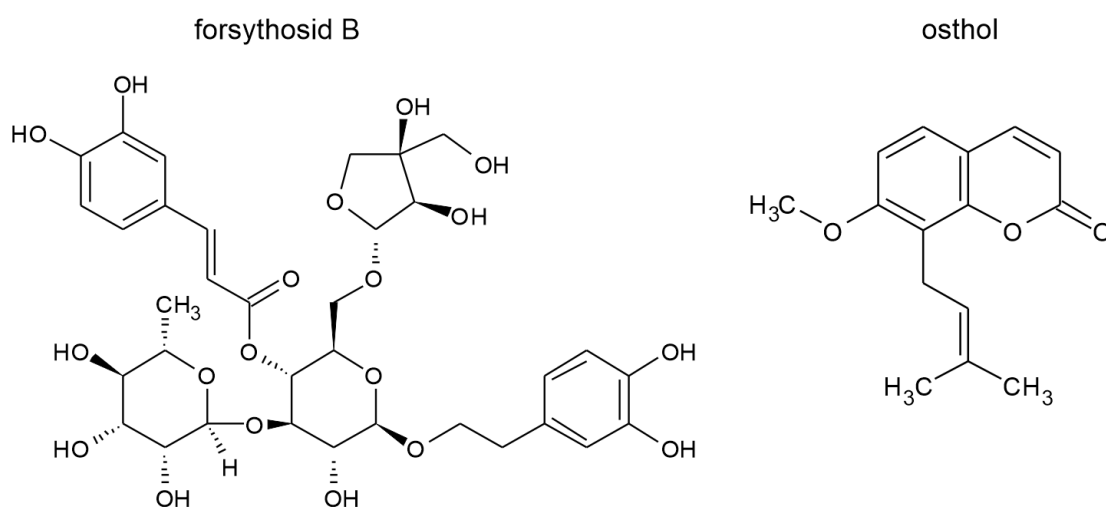
Mutace v genu kódujícím TRPV3 mají závažné patofyziologické důsledky. Myši s vyřazeným *trpv3* se od kontrolních jedinců liší morfologií srsti. Ještě výraznější postižení fyziologické funkce kůže bylo zaznamenáno u experimentálních myší, jejichž TRPV3 kanály s mutací lokalizovanou vedle pórové oblasti mezi čtvrtou a pátou transmembránovou doménou G573C nebo G573S jsou spontánně aktivní, vykazují snížený teplotní práh a vedou k dermatitidě a k bezsrstému fenotypu mutantních jedinců (113).

U člověka je dle sestřihové varianty TRPV3 kanál kódován 790 (nejčastěji), 791 a 765 aminokyselinami (114). Mnohočetné mutace *trpv3* genu byly identifikovány u pacientů s Olmstedovým syndromem, autozomálně dominantním těžkým onemocněním projevujícím se hyperkeratózou (115). Genetickým podkladem tohoto onemocnění jsou mutace glycinu 573 v oblasti mezi 4. a 5. transmembránovou doménou TRPV3, ale také záměna strukturně důležitého tryptofanu 692 (TRP box) za glycin. Elektrofyziologickými pokusy na rekombinantních TRPV3 receptorech bylo zjištěno, že obě tyto mutace vedou ke vzniku spontánně aktivních iontových kanálů (116-118). Ukazuje se, že výsledné snížení životaschopnosti a správné funkce keratinocytů, které je příčinou spontánního rozvoje zánětu kůže v důsledku nadměrné aktivace TRPV3, může představovat zvířecí model pro atopickou dermatitidu (Asakawa et al., 2006). TRPV3 by tak mohl být vhodným cílem nových látek nejen s analgetickým účinkem, ale také pro léčbu atopického exému a pruritu (118).

1.4.3 Chemická aktivace TRPV3, agonisté a antagonisté

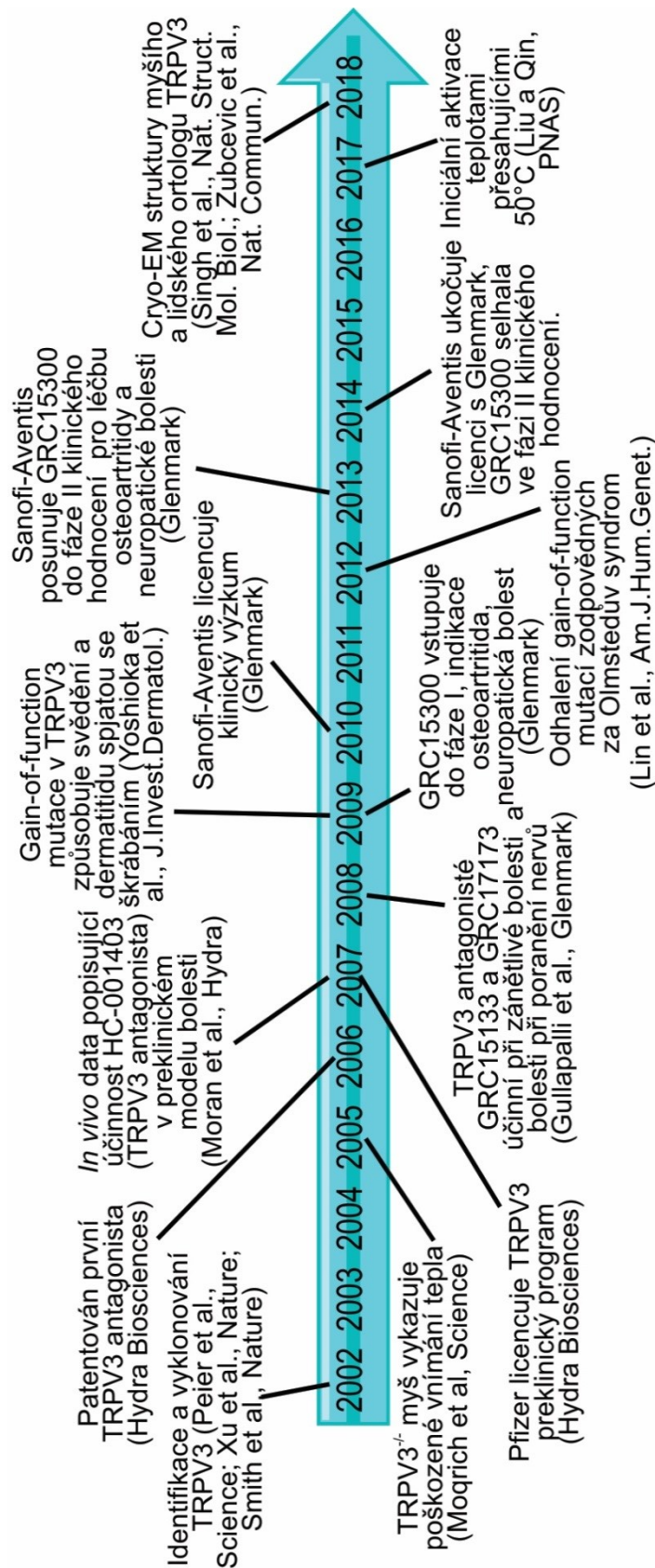
TRPV3 může být aktivován jak endogenními látkami, jako jsou mediátory zánětu (119) nebo oxid dusný (120), ale také řadou exogenních sloučenin. Mezi chemické aktivátory TRPV3 patří například syntetická látka 2-aminoethoxydifenylborát (2-APB), již byl v nedávné době prokázán antikarcinogenní účinek, dále přírodní monoterpenické látky jako tymol z tymiánu či saturejky, karvakrol obsažený v oregánu či kafr, které vyvolávají smyslový vjem tepla (121-123). Dosud jsou známy dva endogenní agonisté TRPV3: farnesylpyrofosfát a oxid dusnatý (120, 124). Endogenní 17(R)-resolvin D1 syntetizovaný z omega-3 mastných kyselin z rodiny resolvinů je selektivním antagonistou TRPV3, posunuje jeho napětíovou závislost směrem k pozitivním membránovým potenciálům, čímž snižuje míru aktivace tohoto kanálu na negativních (fyziologických) potenciálech (125). Rutheniová červeň, neselektivní inhibitor TRPV kanálů, reverzibilně blokuje teplotně vyvolané proudy u TRPV3 (114). Přehled intracelulárních aktivátorů a inhibitorů je znázorněn na obrázku 8.

Zcela nedávno byl objeven selektivní inhibiční účinek přírodního derivátu kumarinu ostholu z jarvy Monnierové (*Cnidium monnieri*) a fenylethanoid glykosidu forsythosidu B z plodů zlatice převislé (*Forsythia suspensa*) či listů *Lamiophlomis rotata* z čeledi hluchavkovitých (126, 127), které jsou tradičně používané v čínské medicíně pro potlačení svědění, zánětlivých stavů a otoků (128-131). Struktury látek jsou zobrazeny na obrázku 9. Nedávné studie ukázaly, že při selektivní inhibici TRPV3 forsythosidem B dochází ke zmírnění pruritu (127), při aplikaci ostholu dochází ke zmírnění projevů atopické dermatitidy (132). Yan a kol. prokázali, že selektivní inhibicí TRPV3 pomocí forsythosidu B dochází k navrácení růstu chlupů a jeho klinické použití představuje slibnou terapii při problémech s vypadáváním vlasů (133).



Obr.9: Struktury selektivních inhibitorů TRPV3 kanálu.

Vzhledem k zapojení termoTRP kanálů do řady signalizačních drah spojovaných s onemocněními (14, 134), jsou tyto proteiny slibným cílem při hledání nových léčiv (135). Od roku 2006 bylo v patentové literatuře zaznamenáno několik skupin malých molekul popisovaných jako selektivní antagonisté TRPV3 (Hydra Biosciences a Glenmark Pharmaceuticals). Přesto zatím jen jediný antagonista potlačující zánětlivé a neuropatické bolesti na zvířecích modelech (SAR292833, Sanofi) postoupil do II. fáze klinického testování (136). Časový přehled vývoje nových léčiv cílených na TRPV3 receptor a nejdůležitějších poznatků v tomto výzkumu je znázorněn na obrázku 10.



Obr.10: Schéma milníků ve studiu TRPV3 a souvisejícím vývoji potenciálních nových léčiv cílených na tento receptor. (34, 105, 108, 137)

1.4.4 Funkčně závislá aktivace a senzitivace TRPV3

Donedávna se předpokládalo, že TRPV3 je senzorem pro nepoškozující teplo, jehož práh pro aktivaci je 32 °C (39, 40, 114). Za využití speciálně vyvinutého aplikačního systému umožňujícího rychlou teplotní stimulaci však bylo ukázáno, že myší TRPV3 je aktivován teplotami vysoce překračujícími nocicepční práh (> 50 °C) a až při opakované, nebo déletrvající aplikaci je teplotní práh snížen k hodnotám 33-39 °C. Funkčním projevem je hystereze procesu otvírání a zavírání iontového kanálu (vrátkování) při aktivaci teplem nebo agonistou (138). Tento jev, který je označován jako funkčně závislá aktivace, je zřejmě dán specifickým strukturním uspořádáním TRPV3 proteinového komplexu, kterým se tento iontový kanál liší od ostatních členů vaniloidní termoTRP skupiny (138).

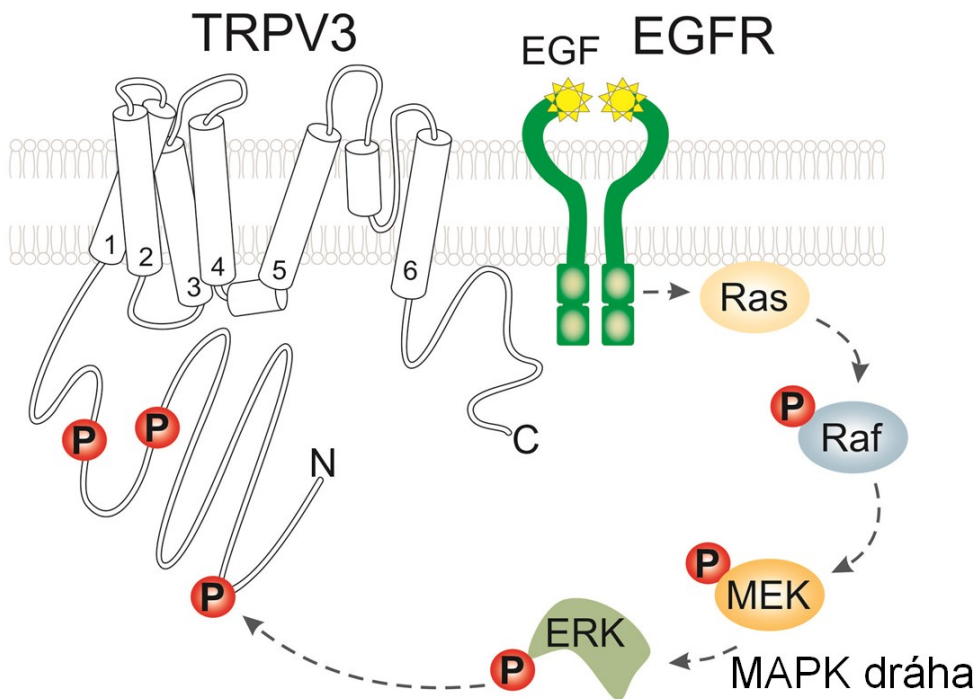
Vedle funkčně závislé aktivace vykazuje TRPV3 neobvyklou vlastnost senzitivace, tzn. že zvyšuje svou aktivitu při opakované stimulaci. Senzitivace TRPV3 se projevuje jako postupné zvyšování zdánlivé afinity pro agonistu. Bylo ale dokázáno, že se jedná o funkčně závislou senzitivaci, kterou lze popsat formálně : zavřený – otevřený – zavřený (C – O – C) nebo zavřený – zavřený – otevřený (C – C – O), přičemž první krok je nevratný. Přestože je kanál regulován vnitrobuněčnou koncentrací vápenatých iontů a vazbou kalmodulinu na ARD doménu (139), proces funkčně závislé senzitivace nevyžaduje vnitrobuněčnou signalizaci (138).

V roce 2017 se podařilo prokázat na molekulární úrovni, že funkčně závislá senzitivace je určena membránovou proximální doménou (MPD) na N-konci (34). Práh pro aktivaci myšího TRPV3 byl snížen záměnou jediné aminokyseliny v MPD (serin na pozici 412), která chybí u homologního proteinu TRPV1. Jaký molekulární mechanismus určuje charakteristickou počáteční strmou teplotní aktivace teplotně citlivých TRPV kanálů je však stále předmětem intenzivního studia (140).

1.4.5 Signální dráhy ovlivňující TRPV3

Při aktivaci TRPV3 v keratinocytech jsou uvolňovány algogenní a prozánětlivé mediátory do okolí volných nervových zakončení sensorických neuronů (40, 141). Signálními molekulami, které by mohly zprostředkovávat přenos informace z kožních buněk na nervová vlákna, jsou ATP, prostaglandin E₂, interleukin-1alfa a oxid dusnatý. Tyto mediátory jsou také uvolňovány keratinocyty při teplotní stimulaci (141-143). TRPV3 v keratinocytech tvoří

s receptorem pro epidermální růstový faktor (EGFR) signální komplex regulující kožní homeostázu. K odhalení souvislosti mezi signální drahou (EGFR) a TRPV3 kanálem vedlo poznání, že myš s vyřazeným *trpv3* genem vykazovala stejný fenotyp jako myši s mutantními geny pro transformující růstový faktor α (TGF α) a EGFR (144). Kanál přímo asociuje s EGFR v keratinocytech a tvoří signální receptorový komplex s pozitivní zpětnovazebnou smyčkou. Aktivace TRPV3 vede ke zvýšení intracelulární koncentrace Ca²⁺ následované zvýšenou produkcí a uvolněním růstového faktoru, který následně aktivuje EGFR, a ten senzitivizuje TRPV3 (109). Správné signalizace je dosaženo pomocí několika signálních drah, ve kterých TRPV3 zastupuje stěžejní pozici. K fosforylaci kanálu dochází prostřednictvím signálních drah fosfolipasy C (PLC), jejichž úloha byla experimentálně potvrzena (109, 123, 144), a mitogenem aktivované protein kinázy (MAPK) prostřednictvím Ras proteinu (Obr. 11) (144).



Obr.11: Fosforylace TRPV3 MAPK signální drahou. Možná fosforylační místa na ankyrinové repetitivní doméně.

1.5 Možný evoluční význam mutací v termoTRP kanálech

Míra konzervovanosti je u TRPV3 kanálu ve srovnání s jinými teplotně citlivými TRP proteiny poměrně vysoká (viz Příloha 1). Při sekvenaci jaderného genomu mamuta srstnatého (*Mammuthus primigenius*) a jeho následném porovnání s DNA slona indického bylo odhaleno, že u mamuta se vyskytovala mutace vysoce konzervovaného rezidua N647D v oblasti vnější pórové kličky TRPV3. Autoři vyslovili hypotézu, že záměna asparaginu za nabitou kyselinu asparagovou mohla být příčinou evoluční změny teplotní citlivosti u mamuta, jež umožnila jeho adaptaci na dobu ledovou zvýšenou tolerancí na chlad, dlouhými chlupy a velkými zásobami tuku (145). V homologní oblasti této aminokyseliny se vymykají konzervovanosti mimo jiné i obojživelníci a ryby (Příloha 2, reziduum vyznačené růžovou barvou).

Mutace v primární sekvenci termoTRP proteinů byly nalezeny také u extrémofilních savců. Z obecného hlediska se savci snaží vyhýbat povrchům teplejším než 40 °C, aby zamezili potenciálnímu poškození tkání a zároveň výskytu na neobyvatelných místech. U extrémofilních druhů, jako jsou sysel třináctiproužkovaný (*Ictidomys tridecemlineatus*) nebo velbloud dvouhrbý divoký (*Camelus ferus*), byly u kanálu TRPV1 identifikovány záměny v první ankyrinové repetici na pozici 124 (S124N) a v druhé ankyrinové repetici na pozici 188 (Q188E). Tyto mutace způsobují sníženou citlivost kanálu na teplo, kdy mutantní kanály neodpovídají na zvýšení teploty z 22 °C na 45 °C (146). Evolučně závislé záměny primárních sekvencí mohly pozměnit nejen práh aktivace a teplotní citlivost termoTRP kanálů, ale také pozměnit smysl aktivace, tj. přeměnit teplem aktivovaný kanál na iontový kanál řízený chladem. Typickým příkladem takového kanálu je TRPA1, jenž je aktivován zvýšením teploty u ryb (>32 °C), obojživelníků (>38 °C), plazů (>28-37 °C) a ptáků (40°C), ale chladem u myší (<15 °C) (147). Pomocí systematických záměn oblastí TRPA1 receptoru člověka a chřestýše západního (*Crotalus atrox*) byly identifikovány ankyrinové repetice 1-10 jako oblast zodpovědná za citlivost receptoru k tepelným podnětům (148).

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 (PIP₂). Na základě biofyzikálních, biochemických, strukturních a elektrofyziologických experimentů se pokusit navrhnout mechanismus, kterým PIP₂ může ovlivňovat aktivitu TRPA1 v nociceptivních neuronech.

3 Materiály a metody

3.1 Chemikálie a roztoky

Pro přípravu roztoků a při pokusech prováděných v laboratoři na oddělení buňčné neurofyziologie Akademie věd ČR byla používána upravená deionizovaná voda (H_2O) ze stanice Purelab Flex, ELGA (UK) o výsledném odporu 18.2 M Ω .cm.

Chemikálie byly pořízeny od Sigma (Česká republika). Výjimkami jsou pepton, agaróza a kvasniční extrakt 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 Biomartik (Kanada). Lipidy byly pořízeny od Avanti Polar Lipids (USA).

Luria-Bertani (LB) médium

Pro přípravu LB média bylo 5 g peptonu, 2.5 g kvasničního extraktu a 5 g NaCl rozpuštěno v 500 ml upravené H_2O . Po důkladném promíchání byl roztok vysterilován v autoklávu na program L105 určený pro kapaliny, kdy samotná sterilace trvala 15 minut po dosažení teploty 105 °C. Vysterilovaný roztok byl uchováván v chladničce při teplotě 2-5 °C.

Fosfátový pufr (PBS)

Fosfátový pufr o složení 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.47 mM KH_2PO_4 , 4.3 mM Na_2HPO_4 byl připraven rozpuštěním navážek příslušných složek v deionizované H_2O . Pomocí NaOH bylo pH upraveno na hodnotu 7.3, pufr byl přefiltrován přes 0.22 μ m sterilní filtr do sterilních láhví a skladován v chladničce při 2-5 °C.

TBS pufr

TBS pufr o výsledném složení 25 mM Tris, 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl byl připraven zředěním zásobního roztoku komerčně dodávaného 10x koncentrovaného TBS (Boston Bioproducts, USA). Výsledné pH bylo upraveno pomocí NaOH na hodnotu 7.6.

Tris-acetát-EDTA pufr (TAE)

Koncentrovaný 50x TAE (50x TAE) obsahoval 2 M Tris, 50 mM EDTA a 1 M kyseliny octové. Takto připravený zásobní roztok byl uchováván v chladničce při teplotě 2-5 °C

Pro přípravu 1x koncentrovaného TAE (1x TAE) o pH 8.6 byl zásobní roztok 50x TAE 50x naředěn upravenou H₂O na výslednou koncentraci 40 mM Tris, 1 mM EDTA a 20 mM kyseliny octové. Po naředění byl 1x TAE určen k okamžité spotřebě.

Agarózový gel pro horizontální elektroforézu

Navážka 0.3 g agarózy byla rozpuštěna v 29.4 ml H₂O s 600 µl 50x koncentrovaného TAE, promíchána a roztok byl přiveden k varu a povařen do rozpuštění. Po zchladnutí na 40 °C bylo k roztoku přidáno 20 µl 10x zředěného Sybr safe v bezvodém DMSO a vše opatrně promícháno k docilení homogenního složení. Roztok byl nalit do ohrádky opatřené hřebínky určené pro nalévání gelů pro horizontální elektroforézu. Gel se nechal utuhnout na vodorovné ploše na temném místě. Takto připravený gel byl připraven pro okamžité použití.

Agarové plotny

Navážka 20 g sypké směsi Nutrient agar č. 2 (Biolife) byla rozmíchána v 500 ml H₂O a roztok byl vysterilizován v autoklávu na program L121 určeném pro kapaliny, kdy samotná sterilace trvala 15 minut po dosažení teploty 121 °C. Po zchladnutí roztoku na 42 °C bylo sterilně přidáno antibiotikum volené podle rezistence expresních plazmidů nesoucích amplifikovaný gen. Agarový roztok byl před ztuhnutím rozlit na sterilní plastové Petriho misky o průměru 90 mm. Na jednu plotnu bylo použito asi 17-25 ml roztoku. Plotny zabalené do parafilmu byly uchovávány v chladničce při teplotě 2-5 °C a byly používány do 1 měsíce od nalití. Výsledné složení agarové plotny je běžně 10 g.l⁻¹ peptidicky naštěpené živočišné tkáně, 10 g.l⁻¹ hovězího extraktu, 5 g.l⁻¹ NaCl a 15 g.l⁻¹ agaru.

Příprava zásobních roztoků agonistů

Zásobní roztoky agonistů byly připraveny rozpuštěním příslušné navážky látky v bezvodém DMSO. Připravené jednosložkové zásobní roztoky obsahovaly 0.1 M karvakrol, 0.1 M AITC, 0.1 M cinnamaldehyde, 0.5 M 2-APB. Zásobní roztoky byly skladovány v chladničce při teplotě 2-5 °C a použity při elektrofyziologickém měření po rozředění na požadovanou koncentraci adekvátním extracelulárním roztokem.

Zásobní roztok rutheniové červeně

Zásobní roztok rutheniové červeně (RuR) o výsledné koncentraci 50 mM byl připraven rozpuštěním rutheniové červeně v H₂O. Zásobní roztok byl uchováván v chladničce při teplotě 2-5 °C a pro potřeby elektrofyziologického měření byl naředěn na požadovanou koncentraci adekvátním extracelulárním roztokem.

Kultivační média po transfekci

Minimálně den před transfekcí bylo sterilně připraveno kultivační médium dle požadavků transfekovaných buněk. Dle receptury v tabulce 1 bylo komerční kultivační médium OPTI-MEM (Invitrogen, USA) či DMEM (angl. Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco LifeTechnologies, USA) obohaceno fetálním telecím sérem, FTS (PAN Biotech, Německo), popřípadě glutaminem (Sigma, USA). Promíchaná pootevřená lahvička s připraveným médiem byla uložena v inkubátoru při teplotě 37 °C pod atmosférou s obsahem 5% CO₂ a médium bylo ponecháno k nasycení se oxidem uhličitým do dne samotné transfekce.

Tab.1: Kompozice kultivačních médií

Buněčná linie	HEK293T	HaCaT	F11
Složení	OPTI-MEM 5% FTS	OPTI-MEM 10% FTS	DMEM 10% FTS 1% glutamin

Extracelulární roztoky

Extracelulární roztoky pro elektrofyziologická měření byly připraveny dle receptur uvedených v tabulce 2. Poté bylo pH upraveno pomocí NaOH na hodnotu uvedenou v tabulce 2. Následně byly změřeny osmolarity roztoků, viz hodnoty v tabulce 2. Roztoky byly přefiltrovány přes 0.22 µm sterilní filtr do sterilních láhví a skladovány v chladničce při 2-5 °C. Den před experimentem bylo potřebné množství roztoků sterilně odebráno a přes noc vymrazeno v mrazáku při -18 °C. Těsně před experimentem byly roztoky vytemperovány na laboratorní teplotu.

Tab.2: Parametry extracelulárních roztoků pro elektrofyziologická měření

Buň. linie	HEK293T				HaCaT		F11	
Použití	Obecný	TRPV3	TRPA1		TRPV3 fosforylace		TRPA1	
Obsah Ca ²⁺	1 Ca ²⁺	0 Ca ²⁺	0 Ca ²⁺	2 Ca ²⁺	1 Ca ²⁺	0 Ca ²⁺	0 Ca ²⁺	0.5 Ca ²⁺
Osmolarita	317	301	280	281	320	320	285	286
pH	7.3-7.4	7.4	7.3	7.3	7.3	7.3	7.4	7.4
Složení [mM]	160 NaCl 2.5 KCl 1 CaCl ₂ 2 MgCl ₂ 10 HEPES 10 glukóza	150 NaCl 5 EGTA 10 HEPES	150 NaCl 10 HEPES 2 HEDTA	150 NaCl 10 HEPES 2 mM CaCl ₂	160 NaCl 2.5 KCl 1 CaCl ₂ 2 MgCl ₂ 10 HEPES 10 glukóza	160 NaCl 2.5 KCl 1 EGTA 2 MgCl ₂ 10 HEPES 10 glukóza	140 NaCl 4 KCl 1 MgCl ₂ 10 HEPES 5 glukóza	140 NaCl 4 KCl 0.5 CaCl ₂ 1 MgCl ₂ 10 HEPES 5 glukóza

Intracelulární roztoky

Intracelulární roztoky pro elektrofyziologická měření byly připraveny rozpuštěním navážek dle receptur uvedených v tabulce 3 v demineralizované vodě a poté intenzivně míchány pomocí magnetického míchadla minimálně 12 hodin, nejlépe přes noc. Obsahovaly-li ATP, bylo přidáno až druhý den. Hodnota pH byla upraveno pomocí CsOH na 7.3 či 7.4 (viz hodnoty v tabulce 3). Byly změřeny a zaznamenány hodnoty osmolarity hotových roztoků (viz hodnoty v tabulce 3). Roztoky byly přefiltrovány přes 0.22 μm stríkačkové filtry Millex GP (Millipore, Merck, Německo) do plastových zkumavek o objemu 1.5 ml (Eppendorf, Německo) a skladovány v mrazáku při $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tab.3: Parametry intracelulárních roztoků pro elektrofyziologická měření

Buň. linie	HEK293T			HACAT	F11
Použití	TRPV3	TRPA1	TRPV3 fosforylace	TRPV3 fosforylace	TRPA1
Osmolalita [mOsm]	263	291	280	290	275
pH	7.4	7.3	7.3	7.3	7.4
Složení [mM]	140 CsCl 10 HEPES 1 EGTA	145 CsCl 5 EGTA 3 CaCl ₂ 10 HEPES 2 MgATP	125 Cs-glukono- δ -laktón 15 CsCl 10 HEPES 5 EGTA 0.5 CaCl ₂ 2 MgATP	125 Cs-glukono- δ -laktón 14 CsCl 10 HEPES 5 EGTA 0.5 CaCl ₂ 1 MgCl ₂ 2 MgATP 0.3 NaGTP	140 KCl 2 MgCl ₂ 5 EGTA 10 HEPES

3.2 Cílená mutagenese

Za účelem cílené bodové mutagenese byla použita komerčně dodávaná sada QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornie, USA) obsahující PfuUltra High Fidelity DNA polymerázu ($2.5\text{ U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$), $10\times$ reakční pufr, restriční enzym Dpn I ($10\text{ U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) dvojici kontrolních primerů ($100\text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$), pWhitescript 4.5-kb kontrolní plazmid ($5\text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) QuikSolution reagensii, směs deoxynukleotidů dNTP, XL10-Gold ultracompetentní buňky, XL10-Gold směs β -mercaptoetanolu (β -ME), pUC18 kontrolní plazmid ($0.1\text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ v TE pufru). Expresní plasmidy nesoucí nemutované typy lidských TRPV3 a TRPA1 receptorů byly využity jako templáty pro cílenou mutagenesi.

Návrh dvojice primerů

Pro každou aminokyselinovou záměnu prováděnou metodou cílené mutagenese byla navržena komplementární dvojice primeru o 18-38 nukleotidech se záměnou v 1-7 nukleotidech nacházejícími se uprostřed sekvence. Primer byl vždy navržen tak, aby začínal i končil guaninem či cytosinem. Výsledný podíl guanino-cytosinového komplementárního GC páru činil v navrženém primeru 50-78%. Navržené primery byly objednány a nasyntetizovány společností Sigma-Aldrich, (Merck, Německo).

Polymerázová řetězová reakce (angl. polymerase chain reaction, PCR)

Polymerázová řetězová reakce probíhala v Thermo-cycleru (Eppendorf, Německo). Reakční směs o výsledném objemu 50 μ l obsahovala sterilní H₂O, 150 ng templátové DNA, 5 μ l 10x reakčního pufru, 1 μ l směsi deoxynukleotidů, 3 μ l QuikSolution reagentie, 1 μ l od každého z dvojice primerů o molární koncentraci 25 μ M a 1 μ l polymerázy PfuUltra High Fidelity. Reagentie a pufr byly použity komerčně dodávané v rámci Quikchange XL II SiteDirected kitu pro cílenou mutagenesi (Agilent technologies, USA). Po promíchání na vortexu byla směs umístěna do Thermo-cycleru a podrobena jednomu z programů uvedených v tabulce 4 voleného dle teploty tání navržených primerů.

Tab.4: Nastavení programů pro PCR

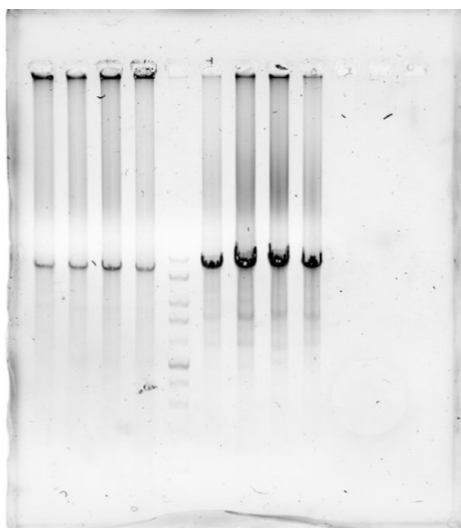
PCR program	GOLDGR49	GOLDGR55	GOLDGR59
Teplota víka	105 °C	105 °C	105 °C
Start	95 °C 1 min	95 °C 1 min	95 °C 1 min
1 cyklus	95 °C 50 s 49 °C 50 s 68 °C 16 min	95 °C 50 s 55 °C 50 s 68 °C 16 min	95 °C 50 s 59 °C 50 s 68 °C 16 min
Cyklus proběhl	26 x	26 x	26 x
Závěr	68 °C 10 min	68 °C 10 min	68 °C 10 min
Drženo v chladu při	4 °C	4 °C	4 °C

Inkubace s restrikční endonukleázou Dpn I

Hotové PCR produkty byly po přidavku 1 μ l Dpn I a promíchání na vortexu inkubovány 1 hodinu při 37 °C. Restrikční endonukleáza Dpn I zapříčiní naštěpení methylované templátové plazmidové cDNA.

Horizontální elektroforéza (ELFO)

PCR produkt ošetřený Dpn I byl následně zkontrolován z hlediska výskytu a velikosti získaného produktu za pomoci horizontální elektroforézy. Na připravený agarózový gel pro horizontální elektroforézu zbaveného hřebínku a čelních stran ponořeného v 1x TAE umístěného do elektroforetické vany bylo nanášeno 5 μ l PCR produktu spolu s 2 μ l barvy (loading dye), pro kontrolu velikosti byly do jedné jamky aplikovány 3 μ l DNA žebříčku s přídatkem 2 μ l barvy. Takto připravený gel se vzorky byl zapojen do okruhu pod napětím 80 V po dobu 45 min. Gel byl pod UV lampou zkontrolován na přítomnost PCR produktu (Obr. 12).

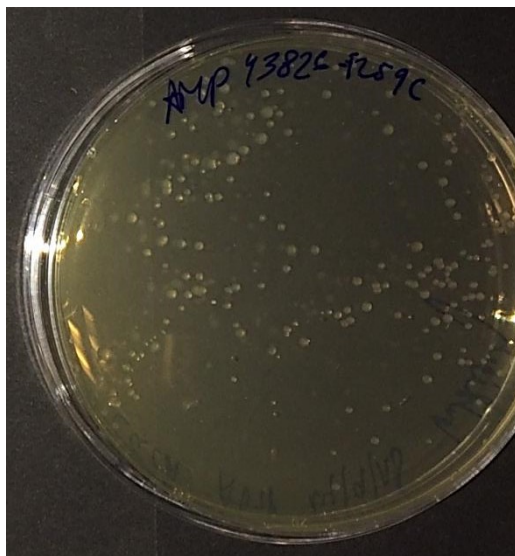


Obr.12: Agarózový gel po proběhnutí horizontální elektroforézy vyvolaný pomocí systému ChemiDoc. Prostřední sloupec obsahuje DNA žebříček v rozsahu 250 – 10000 bp indikující velikost produktu v reálných vzorcích ve sloupečcích ostatních.

Transformace bakterií plasmidovou DNA metodou teplotního šoku (angl. heat shock)

Pro transformaci bakterií plasmidovou DNA byly využívány ultrakompetentní bakterie kmene XL10-Gold *E. coli*, které byly dlouhodobě skladovány v mrazáku při $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$. Z ověřeného PCR produktu byl odebrán alikvot 2 μ l a přidán k 30 μ l bakteriální suspenze rozmrazené na ledu a předem inkubované spolu se 2 μ l β -ME po dobu 15 minut. Po 30 minutách inkubace suspenze bakterií s PCR produktem na ledu byla provedena transformace bakterií prostřednictvím teplotního šoku $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 45 s následnou inkubací na ledu po dobu 2 minut. Bakteriální suspenze byla poté naředěna 0.2 ml předeřátého LB média a intenzivně třepána na třepačce NB-205 (N-Biotek, Korea) v $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ při 200 rpm po dobu 1 hodiny. Po transformaci byla suspenze buněk rozetřena na předeřáté agarové plotny selekčním antibiotikem ampicilinem nebo kanamycinem pro selekci pozitivních klonů bakterií. Antibiotikum bylo voleno dle plasmidové rezistence klonů. Agarové plotny s bakteriemi byly

přes noc inkubovány v termostatu při teplotě 37 °C. Ráno byl zkontrolován nárůst rezistentních bakterií (Obr. 13) a plotny byly zabaleny do parafilmu a uchovány v chladničce při 2-5 °C nejdéle 1 týden. Poté byly zlikvidovány dle pravidel práce s GMO odpadem.



Obr.13: Agarová plotna s bakteriemi. Narostlé bakterie *E. coli* na agarové plotně s obsahem ampicilinu nesou plazmidovou rezistenci k ampicilinu a v plazmidové DNA kódují mutantní kanál hTRPV3 s dvoumutací Y382C a F259C

Kultivace bakterií *E. coli* v kapalném médiu

Do 6 ml LB média s přidaným antibiotikem dle plazmidové rezistence kultivovaných bakterií byla sterilně odpíchnuta pomocí jednorázové špičky kolonie z narostlé plotny, viz bod výše. V pootevřených centrifugačních kyvetách o objemu 15 ml se bakterie v kapalném médiu třepaly v 37 °C při 200 rpm po dobu 16 hodin.

Izolace plazmidové DNA z bakteriální suspenze

Bakterie v suspenzi nakultivované v kapalném médiu byly odstředovány na předchlazené odstředivce při 6000 rpm po dobu 8 minut. Kultivační médium bylo slito do GMO odpadu a z koláče stočených bakterií byla dle přiloženého návodu pomocí kitu High-Speed Plasmid Mini (GeneAid, Taiwan) vyizolována plazmidová DNA.

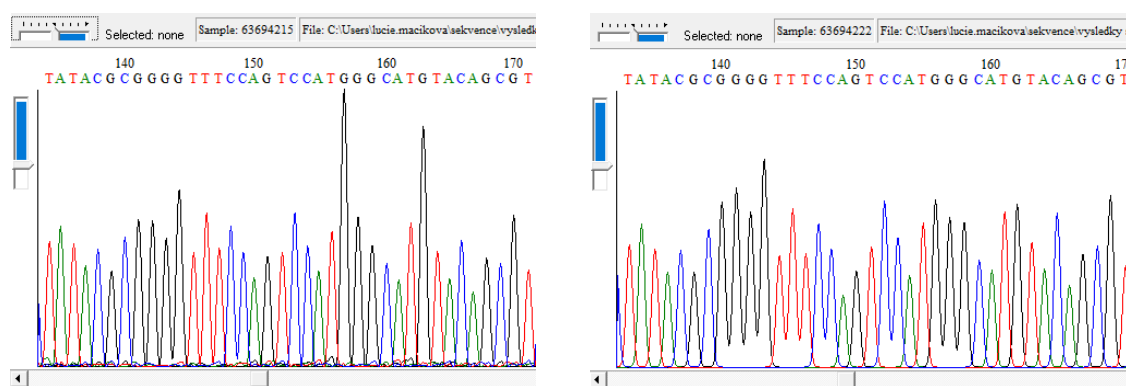
Zjištění koncentrace plazmidové DNA pomocí nanodrop

Na principu měření optické hustoty roztoku nukleových kyselin (NK) byla zjištěna koncentrace vyizolované cDNA pomocí přístroje Nanodrop 1000 (NanoDrop Technologies, USA). Jako blank byl použit eluční roztok z kitu Miniprep či sterilní deionizovaná voda volená dle rozpouštědla ve vzorku měřené DNA.

Sekvence plazmidové DNA

Pro ověření úspěšnosti cílené mutagenese a čistoty vzorku byla získaná plazmidová cDNA osekvenována. Pro daný plazmid a lokaci mutace byl navržen sekvenační primer o 20 nukleotidech tak, aby podíl guanino-cytosinového komplementárního GC páru činil v navrženém primeru 50-60% a byl komplementární k sekvenci nacházející se asi 150 nukleotidů před kontrolovanou oblastí.

Alikvot kontrolovaného vzorku DNA byl naředěn sterilovanou vodou na výslednou koncentraci 80-100 ng.μl⁻¹. Do ependorf zkumavek opatřených čárovým kódem bylo převedeno 5 μl zředěného DNA a doplněno o 5 μl sekvenačního primeru o koncentraci 5 μM. Pomocí dopravní společnosti byly vzorky odeslány do sídla Eurofins Genomics (Německo) a osekvenovány. Výsledky sekvenace byly v digitální podobě nahrány na uživatelský účet. Kvalita, čistota a přítomnost mutace u sekvenované cDNA byla ověřena pomocí programu BioEdit (Ibis Therapeutics, USA) (Obr. 14).



Obr.14: Kontrola osekvenovaných vzorků v programu BioEdit. Ukázka sekvenace cDNA znečištěného vzorku (vlevo) oproti čisté cDNA (vpravo).

3.3 Buněčné linie a transfekce

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 myšími neuroblastomovými buněčnými liniemi (F11; ECACC, Velká Británie).

Buněčné linie byly sterilně kultivovány v inkubátoru při teplotě 37 °C pod atmosférou s obsahem 5% CO₂ v kulturačních médiích o složení uvedených v tabulce 1 volených dle typu

buněčné linie. Každé 2-3 dny při konfluentním nárůstu byly kultivované kultury pasážovány, tedy k liniím omytých vytemperovaným PBS pufrem byly přidány do kultivačních jamek 4 kapky trypsinu, po společné inkubaci 2-5 minut byly rozpasážovány v kultivačním médiu a nasazeny na 6 jamkové destičky pro potřeby kultivace a na 24 jamkové destičky pro přípravu na transfekci a dále k elektrofyziologickým měřením. Dno 24 jamkových destiček bylo před nasazením buněk potaženo kolagenem a vysušeno. Po 1-2 dnech od nasazení buněk na 24 jamkovou destičku prokryly buňky z 80% konfluentně dno jamek a byly připraveny k transfekci.

Pro elektrofyziologická měření z HEK293T linie byly buňky transfekovány příslušnou cDNA kódující měřený iontový kanál pomocí MATra (IBA GmbH, Německo), transfekcí pomocí magnetických částic. Byla připravena směs 50 μ l OPTI-MEM s 300 ng cDNA kódující měřené iontové kanály, 200 ng GFP (zelený fluorescenční protein, angl. Green fluorescent protein; pQBI 25, Japonsko) a 0.5 μ l MATra reagentie obsahující magnetické částice v koncentraci dodávané výrobcem. Po rozmíchání vortexem a inkubaci 20 minut při laboratorní teplotě byla připravená směs přidána na HEK293T buňky a společně byly inkubovány po dobu 15-30 minut na neodymovém magnetu v kultivátoru při teplotě 37 °C s obsahem 5% CO₂.

Pro elektrofyziologická měření z HaCaT a F11 tkňáňových linií a pro transfekci pro potřeby sklizení buněk proběhla transfekce pomocí Lipofectamin 2000 (Invitrogen, USA). Pro transfekci v měřítku jedné jamky na 24 jamkové destičce byly 2 μ l Lipofectamin zředěny v 50 μ l OPTI-MEM a společně inkubovány 5 minut při 25 °C. Mezitím byla připravena druhá směs obsahující 50 μ l OPTI-MEM, 300 ng cDNA kódující měřené iontové kanály, 200 ng GFP, promíchána vortexem. Po uplynutí 5 minut byla druhá směs přidána ke směsi s Lipofektaminem 2000, opatrně promíchána a inkubována 30 minut při 25 °C. Celý objem vzniklé směsi byl poté přidán k buňkám a inkubován po dobu 5 hodin v kultivátoru při teplotě 37 °C pod atmosférou s obsahem 5% CO₂.

Po uběhnutí času transfekce pomocí MATra či Lipofectamin 2000 byla destička s buňkami vyjmuta z inkubátoru. Médium bylo z buněk odebráno, buňky byly opatrně opláchnuty 1-2 ml vytemperovaného PBS pufru o teplotě 37 °C, po odsátí PBS byly buňky inkubovány se 2 kapkami přehřátého trypsinu po dobu 2 minut v kultivátoru při 37 °C. Když se buňky začaly pouštět dna, byly sterilně rozpasážovány v 1 ml kultivačního média a 1-3 kapky vzniklé buněčné suspenze byly nasazeny do 1.5-2 ml kultivačního média umístěného ve sterilních plastových Petriho miskách o průměru 3.5 cm opatřených sklíčkem s povrchem upraveným kolagenem a poly-L-lysinem.

Pro potřeby sklizení buněk byla všechna buněčná suspenze kultivovaných rozpasážívaných buněk nasazena na kultivační láhve typu T25 do 7.5 ml kultivačního média, po nárůstu a konfluentním pokrytí dna byly opět buňky rozpasážívány a veškerý objem byl nasazen na kultivační láhve typu T75 do 20 ml kultivačního média a obdobně v posledním kroku do láhví typu T150 do 30-45 ml kultivačního média.

3.4 Elektrofyziologické měření metodou terčíkového zámku

Elektrofyziologická měření byla prováděná metodou terčíkového zámku v uspořádání měření z celé buňky (angl. *whole cell patch-clamp*). Dále se v textu vyskytuje označení techniky v původním anglickém názvu.

Pro elektrofyziologická měření byla použita 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 (149, 150), 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).

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 M Ω .

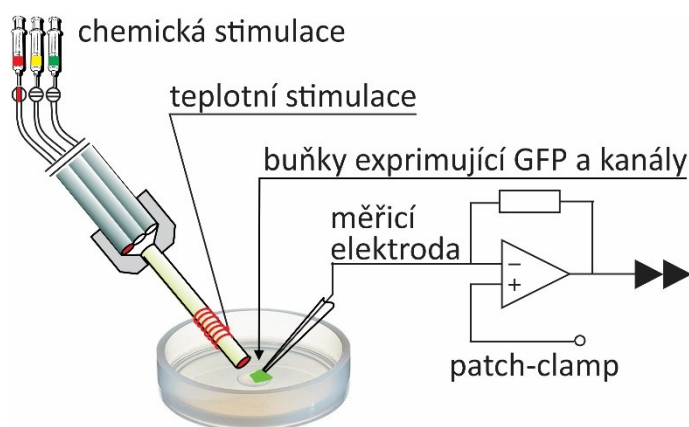
Skleněné pipety byly plněny intracelulárním roztokem voleným dle buněčné linie a typu experimentu o složení a parametrech uvedených v tabulce 3, s pozorností kladenou na absenci bublin ve zúžení hrotu. Do roztoku v pipetě byla zasunuta elektroda tvořená stříbrným drátkem potaženým vrstvou chloridu stříbrného zajišťující vodivé spojení mezi měřeným prostředím mikroelektrodou a vstupem do zesilovače. Hrot vzniké mikroelektrody udržované pod pozitivním natlakováním byl ponořen do roztoku v misce a přiblížen k buňce omývané pomocí aplikačního systému extracelulárním roztokem voleným dle buněčné linie a typu experimentu o složení a parametrech uvedených v tabulce 2. Po přiblížení se k membráně buňky projevujícím se mírným zvýšením odporu elektrody asi o 0.3 M Ω byl aplikován podtlak a bylo vytvořeno pevné spojení mezi skleněnou stěnou pipety a membránou buňky o odporu v řádech G Ω (angl. gigaseal). Aplikací silnějšího podtlaku byla membrána buňky v místě kontaktu s pipetou protržena a intracelulární prostředí buňky bylo propojeno s intracelulárním

roztokem uvnitř skleněné mikroelektrody voleným dle tkáňové linie a typu experimentu o složení a parametrech uvedených v tabulce 3.

Pro měření byly vybírány samostatně vitálně vypadajících buňky exprimujících zelený fluorescenční protein. Všechny elektrofyziologické záznamy byly pořízeny v konfiguraci 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.

Před začátkem měření byl aplikační systém promyt a zbaven prachových částic. Do jednotlivých nádobek nad ventily byly aplikovány extracelulární roztoky vymrazením zbavené bublin vytemperované na 25 °C. Dle uspořádání experimentu byly do takto vytemperovaných extracelulárních roztoků přidány modulátory kanálů o dané koncentraci a složení.

Pro aplikaci lineárně se zvyšujících teplotních stimulů až k 60 °C s rychlostí ohřevu dosahující 30-50 °C.s⁻¹ byl využit speciální systém pro rychlou aplikaci ohřátých roztoků vyvinutý v naší laboratoři (Obr. 15). Princip ohřevu roztoku spočívá v tom, že se měděný drátek obtočený okolo ústí trubičky aplikující roztoky na buňky se zvyšujícím se protékajícím proudem zahřívá, a tím ohřívá roztoky omývající buňky.



Obr.15: Schematické znázornění elektrofyziologické techniky patch-clamp. Schéma znázorňuje uspořádání měření, transfekovanou buňku exprimující GFP a příslušný typ kanálů (zeleně), skleněnou pitetu s vloženou měřicí elektrodou, aplikační systém složený z řady ventilů a teflonových trubiček ústících do společné ohřívané kapiláry (červeně), určený pro aplikaci extracelulárních roztoků a pro chemickou stimulaci, a termočlánek zaznamenávající teplotu roztoků umístěný v ústí trubičky přivádějící extracelulární roztoky nad buňku.

3.5 Příprava malých jednodamelárních vezikul (SUV)

Malé jednodamelární vezikuly byly připraveny ve složení 100 % palmitoyl-oleoyl-fosfatidylcholinu (POPC) bez přítomnosti PIP₂, s obsahem 5 % PIP₂ a 95 % POPC, a s vysokým obsahem 20 % PIP₂ a 80 % POPC.

Předem určené navážky lipidu či směsi lipidů tak, aby výsledná koncentrace připravených SUV činila 2 mg.ml⁻¹, byly rozpuštěny v čistém chloroformu či směsi chloroform-metanol v poměru 2:1. Rozpouštědlo bylo poté odfoukáno pod proudem dusíku za vzniku filmu na stěnách plastové zkumavky o objemu 1.5 ml (Eppendorf, Německo). Zbytky rozpouštědla byly odstraněny inkubací zkumavky s filmem po dobu 2-3 hodiny ve vakuové komůrce napojené na past s tekutým dusíkem. Film byl poté hydratován pufrem voleným dle následného použití malých jednodamelárních vezikul (SUV), promíchán vortexem při teplotě vyšší než je teplota fázového přechodu za zisku multilamelárních vezikul (MLV). MLV byly finálně sonikovány na ledu ultrazvukovou sondou po dobu 2x 10 min při nastavení amplitudy na hodnotu 40 pro zisk SUV.

Pro měření plazmonové vlnovodné rezonance a infračervené spektrometrie typu *p*ATR-FTIR byl film hydratován TBS pufrem o pH 7.6, pro účely cirkulárního dichroizmu byl aplikován pro hydrataci filmu 10 mM fosfátový PBS pufr o pH 7.6.

3.6 Plazmonová vlnovodná rezonance (PWR)

Experimenty plazmonové vlnovodné rezonance (angl. Plasmon waveguide resonance, PWR) byly prováděny na přístroji beta PWR (Proterion Corp, USA) se spektrálním úhlovým rozlišením 1 mdeg. Rezonance byla zaznamenávána v paralelním (*p*) a kolmém (*s*) směru vůči povrchu rezonátoru. Lipozomy SUV o daném složení byly imobilizovány na povrchu rezonátoru a umístěny do kontaktu s vodným prostředním TBS pufrem, do kterého byly přidávány peptidy o koncentraci postupně se zvyšující. Spektrální změny rezonance v obou polarizacích byly zaznamenávány před přidáním peptidu a po ustanovení rovnováhy mezi každým dalším přidáním peptidu. Afinity mezi peptidy a lipidy o daném složení lipidové dvojvrstvy byly stanoveny v program Graph Prism (GraphPad, USA) proložení hyperbolické saturační křivky spektrálními změnami PWR. Software Graph Prism vygeneroval rovnovážné disociační konstanty K_D po daný pár ligand - analyt.

3.7 Mikrofluidní difúzní dimenzování (MDS)

Mikrofluidní difúzní dimenzování (angl. Microfluidic diffusional sizing, MDS) na přístroji Fluidity One vyvinuté společností Fluidic Analytics je nově vyvinutá a velmi citlivá metoda poskytující informace o koncentraci vzorku a velikosti na základě zaznamenávání rychlosti difúze. Za ustáleného stavu proudí vzorek proteinu a pomocná tekutina paralelně bez konvekčního mísení, nativní proteiny mohou přecházet do pomocného roztoku pouze na principu difúze. Poté jsou jednotlivé proudy rozděleny na frakce a značeny skrze primární aminy peptidů a lipidů.

Hydrodynamický radius vezikul je přímo spjatý s difúzním koeficientem D získaným ze Stokes-Einsteinovy rovnice (1), kde K_B je Boltzmanova konstanta, T je teplota, η je viskozita pomocné tekutiny.

$$D = \frac{K_B T}{\pi \eta R_h} \quad (1)$$

Pro studium interakce peptidů s lipidy byly připraveny nanodisky na bázi polymeru styrenu s kyselinou maleinovou (SMALP) s lipidy o složení POPC a POPC/PIP₂ (9/1 mol.mol⁻¹). SMALP byly připraveny společnou inkubací MLV (1.3 mM v PBS) (viz kapitola 3.5 *Příprava jednolamelárních vezikul SUV*) s roztokem styren maleinanhidridu (6.5 mM v PBS) a promícháním. Tvorba SMALP byla v průběhu sledována pomocí techniky dynamického rozptylu světla (angl. Dynamic Light Scattering, Vasco) a MDS. Tímto postupem byly připraveny SMALP o velikosti 10-15 nm, které byly používány několik týdnů od přípravy.

Peptidy o koncentraci 450 mg.ml⁻¹ byly titrovány vzrůstající koncentrací lipidů. Zaznamenával se radius při každém dosažení ustáleného stavu, který vypovídal o interakci mezi lipidem a peptidem při dané koncentraci SMALP. Získané body byly vyneseny do grafu a proloženy vazebnou křivkou, z té byly následně získány rovnovážné disociační konstanty K_D proložení hyperbolické závislosti v software PRISM (GraphPad Software, USA).

3.8 Infračervená spektrometrie typu *pATR-FTIR*

Pomocí infračerveného spektrometru s Fourierovou transformací využívající techniky polarizovaného zeslabeného úplného odrazu (angl. Polarized attenuated total reflection-Fourier transformation infrared, *pATR-FTIR*) na přístroji Nicolet 6700 FT-IR (Nicolet Instrument, USA) vybaveného detektorem HgCdTe rtuť-kadmia-telluridu (ThermoFischer, USA) chlazeným tekutým dusíkem jedenkrát plněným byla měřena spektra se spektrálním rozlišením 4 cm⁻¹. Lipidová dvojvrstva adsorbovaná na germaniový ATR krystal byla získána spontánní

fúzi malých jednolamelárních vezikul (SUV) složených jen z POPC nebo směsi PIP₂ s POPC. Výsledná koncentrace lipidu byla 1.5 mg.ml⁻¹. Neadherované SUV byly poté z krystalu odmyty pomocí TBS pufru. Peptid o koncentraci 1 mM byl s dvojvrstvou inkubován 10 min, poté byl nenavázaný peptid odstraněn trojnásobným promytím TBS pufrem. Spektra byla zaznamenávána v paralelním (*p*) a kolmém (*s*) směru vůči rovině dopadu. Z naměřených hodnot je získán tzv. poměr dichroizmu R_{ATR} . Poměr dichroizmu R_{ATR} nese informace o orientaci a je určen vztahem(2), kde A_p a A_s vyjadřují absorbance sledovaného analytu pro *p*- a *s*- polarizace kolizního světla.

$$R_{ATR} = \frac{A_p}{A_s} \quad (2)$$

3.9 Fluorescenční analýza membránové integrity lipozomů

Na principu fluorescenční analýzy za použití sulforhodaminu B byla testována integrita membrán lipozomů. Lipozomy (velké jednolamelární vezikuly, LUV) s enkapsulovaným sulforhodaminem B byly připraveny z MLV (3.5 Příprava jednolamelárních vezikul SUV) s drobnou modifikací v postupu, kdy film lipidu byl hydratován 2x zředěným TBS pufrem s obsahem 50 mM sulforhodaminu B. Pro tvorbu LUV, disperse MLV prošla 6x cyklem zamrazení v tekutém dusíku a následném tání při pokojové teplotě a poté byla 11x protlačena miniextrudérem vybaveným dvěma polykarbonovými filtry o velikosti 0.1 μm (Avanti). Do lipozomů neenkapsulovaný sulforhodamin B byl oddělen pomocí gelové permeační chromatografie (Sephadex G-75) za použití elučního pufru TBS. Koncentrace lipidů ve vzniklých lipozomech byla stanovena pomocí Rouserova protokolu (151).

Pro testování membránové integrity byly lipidy o koncentraci 1 μM inkubovány na 96-jamkové destičce s peptidy o koncentracích od 1 do 500 nM (P/L poměr od 1/100 do 1/10). Fluorescenční analýza byla provedena pomocí čtečky destiček (angl. plate reader) BMG LabTech. Měření bylo prováděno při 25 °C, každou 1 s při vlnových délkách excitace $\lambda_{ext} = 565$ nm a emise $\lambda_{em} = 586$ nm se stěrbinou 2.5 nm. Enkapsulovaný sulforhodamin B nevykazoval žádnou fluorescenci z důvodu samozhášení při vysoké koncentraci uvnitř lipozomů, až po vylití sulforhodaminu B do roztoku byla fluorescence měřitelná. Po 60 min sběru dat bylo ke vzorkům přidáno 100 μl tenzidu nadbytku, 10% Triton X-100, který narušil zbylé lipozomy. Následně získaná fluorescence vzorků byla vyhodnocena jako maximální fluorescence sulforhodaminu B. Množství uvolněného sulforhodaminu B z lipozomů bylo vyhodnoceno podle vztahu (3), kde procentuální únik je frakce uvolněného sulforhodaminu B

v daném čase t , F_t je fluorescence v čase t , F_0 je míra fluorescence na počátku pokusu, F_f je fluorescence po přidání tenzidu.

$$\% \text{ úniku} = \frac{F_t - F_0}{F_f - F_0} * 100\% \quad (3)$$

3.10 Cirkulární dichroizmus (CD)

Měření cirkulárního dichroizmu (CD) byla prováděna na CD spektrofotometru Jasco J-815 s optickou dráhou 1 mm. Spektra byla měřena při laboratorní teplotě v rozsahu od 185 do 250 nm s krokem 0.5 nm. Skenovací rychlost činila 50 nm.min⁻¹ a konečné spektrum bylo získáno jako průměr ze 7 měření. CD spektra byla měřena na peptidech o koncentracích od 20 μM do 120 μM v 10 mM PBS pufru, nebo v přítomnosti 1220 μM 20% PIP₂ a 80% POPC, 1290 μM 5% PIP₂ a 95% POPC nebo 1320 μM POPC. Pro každý vzorek bylo automaticky odečteno pozadí. Data byla vyhodnocena a zastoupení sekundárních struktur bylo stanoveno pomocí database BeStSel.org (152).

3.11 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 laboratorní teploty až k 60 °C s maximální rychlostí ohřevu 30-50 °C.s⁻¹. 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 (4), 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 (kJ.mol⁻¹) vypočtené ze směrnice lineární oblasti grafu v rozsahu T_1 a T_2 .

$$Q_{10} = \left(\frac{A_2}{A_1} \right)^{\frac{10}{(T_2 - T_1)}} \quad (4)$$

3.12 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.

Všechna data uvedená v této práci jsou prezentována ve formě průměrné hodnoty \pm směrodatné odchylky průměru (SEM) nebo standardní odchylky (SD), pokud není uvedeno jinak. Hodnoty pravděpodobnosti pro jednotlivé statistické testy jsou uvedeny v legendách obrázků.

3.13 Simulace molekulární dynamiky

Simulace molekulární dynamiky TRPV3 kanálu byly prováděny ve spolupráci s pracovištěm Matematicko-fyzikální fakulty UK za použití metod simulace molekulární dynamiky (MD). Pro simulace byla použita struktura kanálu získaná z proteinové databanky PDB (PDB kód 6DVW). Po parametrizování struktury silovým polem AMBER_ILDN (153) a jejím obklopení molekulami vody TIP3P (154) byly provedeny molekulárně dynamické simulace při třech různých teplotách (300, 330 a 400 K). Za využití softwarového balíčku AMBER14 (155) a počítače vybaveného operačním systémem Linux s rozhraním NVIDIA GPU byly shromážděny trajektorie získané simulací. Délka získaných molekulárně dynamických simulací byla až 50 ns, vždy posouzeno dle míry ustálení systému. Analýza trajektorií získaných simulací byla zpracována v naší laboratoři za využití programu Chimera 1.13 (University of California, San Francisco).

3.14 Molekulární dokování

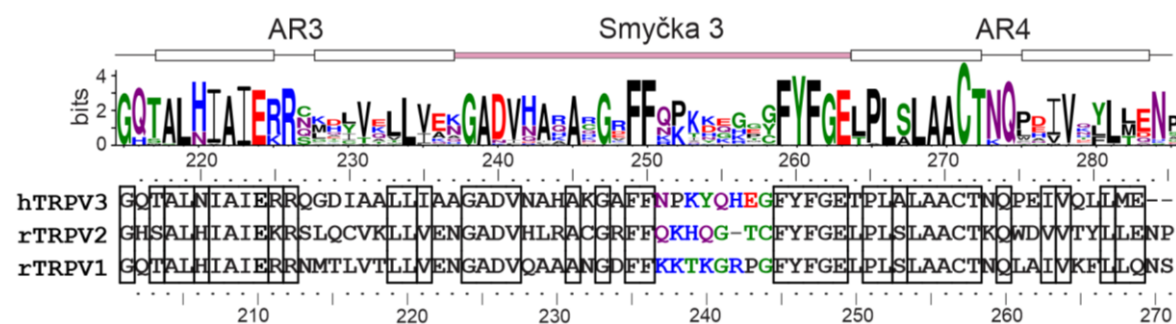
Molekulární dokování fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu (PIP₂) do oblasti senzoru TRPA1 bylo provedeno pomocí programu AutoDock Vina (<http://vina.scripps.edu/>), které je součástí softwaru UCSF Chimera 1.12 (www.cgl.ucsf.edu/chimera/), který využívá krychli o rozměrech 100 x 100 x 100 Å³ s implicitními dokovacími parametry.

4 Výsledky

4.1 Cytoplazmatické rozhraní mezi podjednotkami určuje charakteristiku teplotní aktivace TRPV3¹

Cílem studie popsané v této kapitole bylo a) charakterizovat parametry teplotní aktivace rekombinantního lidského TRPV3 receptoru a určit podmínky, za kterých dochází k funkčně závislé senzitivaci. b) Porovnáním primárních sekvencí a struktur TRPV1 a TRPV3 identifikovat oblast TRPV3 receptoru, která by mohla být zodpovědná za funkčně závislou senzitivaci TRPV3 při aktivaci teplem.

Ve fázi návrhu studie byla známa pouze krystalová struktura části intracelulárního N-konce myšního TRPV3 (156). 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 senzitivaci, tj. při opakované aktivaci zvyšuje pravděpodobnost otevření, zatímco TRPV1 při opakované aktivaci desenzitivuje. Protože primární sekvence N251-E257 v třetí smyčce je silně proměnlivá v rámci teplotně citlivých TRPV receptorů (Obr. 16), zaměřili jsme se na tuto oblast s cílem zjistit, jaká je její úloha v aktivaci teplem.



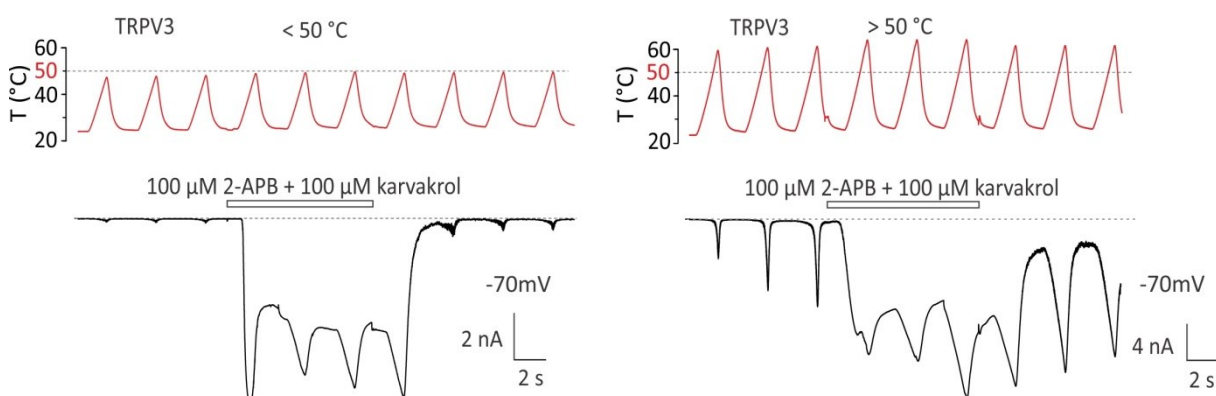
Obr.16: Schématické znázornění třetí smyčky ankyrinové domény TRPV3 receptoru. Logo teplotně aktivovaných TRPV1-4 receptorů napříč obratlovci (ryba, žába, had, pták, myš, potkan, člověk) vygenerované pomocí WebLogo3 serveru (157). Výška každého aminokyselinového zbytku zobrazuje pravděpodobnost výskytu aminokyseliny na dané pozici. Dole, seřazení aminokyselinové sekvence lidského TRPV3, potkaních TRPV2 a TRPV1. Číslování sekvencí je uvedeno nahoře podle TRPV3 a pod sekvencemi podle TRPV1. Prvky sekundární struktury jsou uvedeny nad logem. Oblast studované nekonzervované oblasti třetí smyčky je vyznačena barevně.

¹ **Příspěvek autora** na získání uvedených dat převzatých z publikace Máčiková *et al.* (2019): L. Máčiková (L.M.) provedla většinu elektrofyziologických měření, připravila všechny mutace, prováděla heterologní transfekce HEK293T buněk, vyhodnotila naměřená data a připravila některé obrázky.

Pro ověření funkčního významu 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

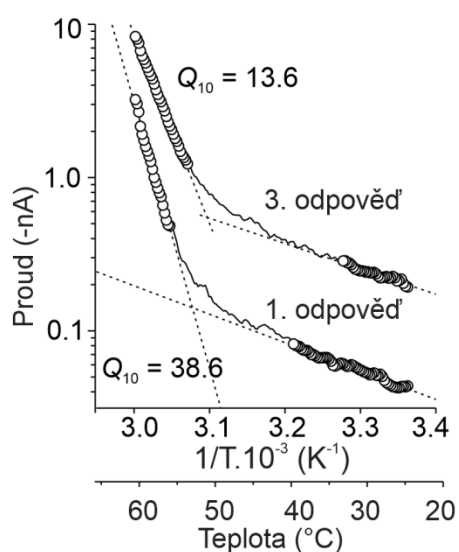
Již dříve bylo ukázáno, že iniciální aktivace myšího TRPV3 receptoru vyžaduje teploty přesahující 50 °C a aktivační práh spolu s citlivostí (směrnicí) teplotní závislosti klesá při opakované stimulaci (34). Pro potvrzení funkční závislosti teplotní aktivace lidského ortologu TRPV3 heterologně transfekovaného pomocí magnetických částic do HEK293T buněk (kapitola 3.3) byla použita metoda patch-clamp (kapitola 3.4). Pomocí teplotního stimulatoru (149) byl na buňky aplikován kontrolní extracelulární roztok (150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES), jehož teplota byla lineárně zvyšována z laboratorní teploty (25 °C) až k 60 °C v 3s intervalech s maximální rychlostí ohřevu 35 °C.s⁻¹. 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. 17 vlevo), nebo přesahující 50 °C (Obr. 17 vpravo). Pro určení maximální aktivační kapacity kanálů byly v obou případech buňky následně stimulovány třemi teplotními pulzy v přítomnosti směsi dvou aktivátorů TRPV3, 2-APB (100 μM) a karvakrolu (100 μM).



Obr.17: 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 μM 2-APB + 100 μM karvakrol). Vlevo, teploty pod 50 °C. Vpravo, teploty nad 50 °C.

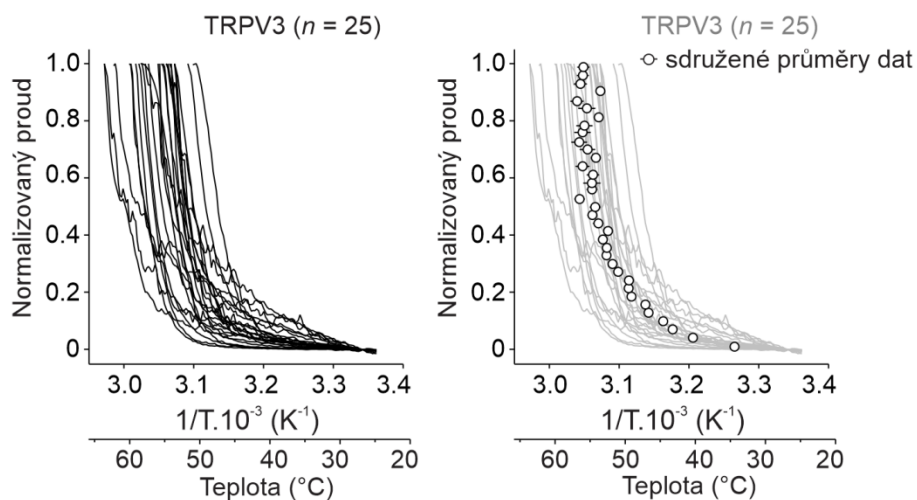
Při opakované stimulaci TRPV3 kanálů přirozeného typu teplotními lineárními pulzy dosahujícími ~48 °C byly vyvolány pouze velmi malé proudové odpovědi (154 ± 21 pA; n = 9) se slabou teplotní závislostí v rozsahu 45-48 °C (Q_{10} , teplotní koeficient 2.8 ± 0.3) (Obr. 17

vlevo). Naproti tomu směs agonistů vyvolala velké proudy již při teplotě 25 °C (5.3 ± 0.3 nA; $n = 9$), které byly při ~ 40 °C satureovány (9.8 ± 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 (Obr. 17 vpravo): první teplotní odpověď dosahovala průměrné amplitudy 1.7 ± 0.6 nA ($n = 25$). Zatímco maximální proudové odpovědi se při opakované teplotní stimulaci zvyšovaly, práh pro aktivaci teplem se snižoval (Obr. 18). 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 ± 1.2 °C až 53.9 ± 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 ± 1.1 °C do 55.7 ± 1.2 °C). V lineární oblasti nižších teplot (25.9 ± 0.4 °C až 34.4 ± 1.2 °C) se průměrná hodnota Q_{10} první teplotní odpovědi (1.8 ± 0.1) statisticky významně nelišila od druhé teplotní odpovědi (1.6 ± 0.1 ; $P = 0.222$).



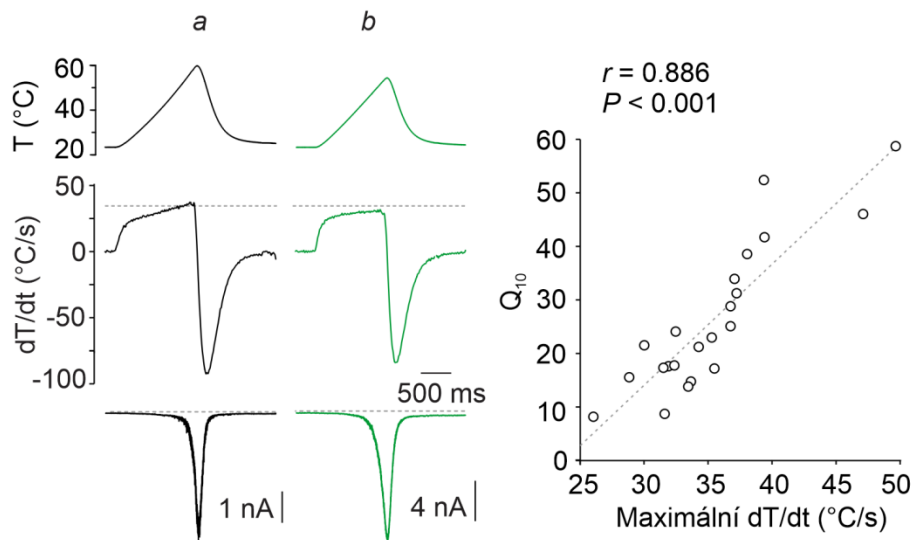
Obr.18: Porovnání první a třetí proudové odpovědi lidského TRPV3 na teploty převyšující 50 °C bez přítomnosti agonisty, vynesené v Arrheniovské závislosti. Graf vynesení proudu (osa y, logaritmické měřítko) proti převrácené hodnotě absolutní teploty (osa x). Maximální teplotní koeficient Q_{10} byl odhadnut z lineární regrese (přerušované čáry) sklonu Arrheniovské závislosti v rozsahu teplot vyznačených prázdnými kolečky.

Ze závislosti proudu na teplotě prvních teplotních odpovědí přirozeného typu TRPV3 byla patrná variabilita teplotních prahů i hodnot maximálního teplotního koeficientu Q_{10} pro jednotlivá měření (Obr. 19 vlevo). Pro celkové porovnání této variabilní skupiny dat byla zvolena metoda sdružování průměru dat (více v metodách, kap. 3.12) (Obr. 19 vpravo).



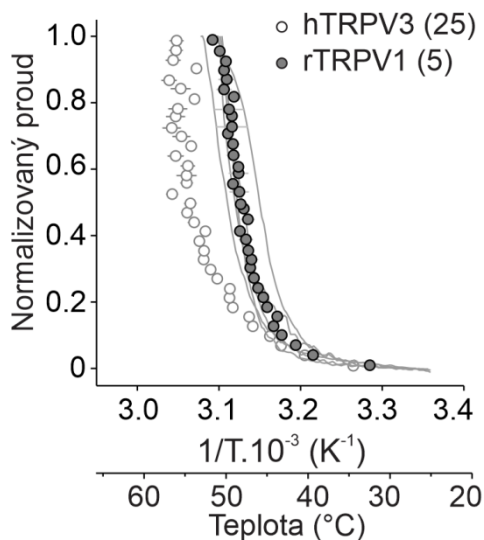
Obr.19: Teplotou vyvolané proudy normalizované na maximum. Vlevo, teplotou vyvolané proudy naměřené z 25 buněk exprimujících lidský ortolog TRPV3. Vpravo, sdružené hodnoty teplotou vyvolaných proudů zobrazených vlevo, znázorněné jako prázdná kolečka s chybovými úsečkami v šedé indikující SEM ($n = 25$). Proudů jednotlivých buněk jsou pro porovnání zobrazeny (šedé čáry). Chybové úsečky jsou v mnoha případech menší než symbol.

Variabilita proudových odpovědí byla přičtena nevyhnutelným odchylkám v časovém průběhu ohřevu extracelulárního roztoku, což způsobilo odchylky v maximální rychlosti teplotní výměny (Obr. 20 vlevo). Již dříve Qin a kolektiv (34) na myším TRPV3 ukázal, že rychlost přechodu ze zavřeného stavu kanálu do otevřeného je primárně řízena teplotou a pro přímé měření aktivační entalpie je nutný speciální teplotní stimulátor umožňující dosáhnout velmi vysoké rychlosti teplotní výměny ($55 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{ms}^{-1}$). Zřejmě naše pomalejší rychlost teplotní výměny ($35 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$; $n = 22$) způsobila, že velká část kanálů po aktivaci přecházela do stavu se sníženou energetikou vrátkování již v průběhu stimulačního pulzu. Tuto hypotézu podporuje naše zjištění, že hodnoty Q_{10} jednotlivých buněk silně korelují s časovým průběhem teplotní aktivace (Obr. 20 vpravo).



Obr.20: Variabilita aktivačního práhu a sklonu citlivosti teplotní závislosti TRPV3 souvisí s časovým průběhem teplotní výměny. Vlevo, Časový průběh první derivace teplotního stimulu (horní část) a teplotně vyvolané proudy (spodní část) znázorněné pro dvě různé buňky *a* a *b*. Vpravo, hodnota Q_{10} lineárně koreluje s odpovídajícím maximem první derivace časového průběhu teplotního stimulu (Pearsonův produktově-momentový korelační koeficient, $r = 0.886$; $n = 22$).

I přes uvedenou variabilitu dat byl teplotní práh sdružených proudů normalizovaných vzhledem k maximální dosažené amplitudě zřetelně a statisticky odlišitelný od teplotního práhu pro aktivaci potkaního ortologu TRPV1 (Obr. 21).

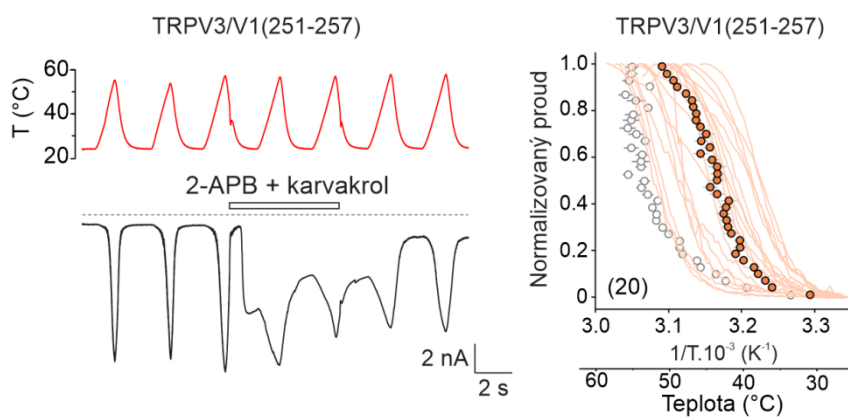


Obr.21: Teplotou vyvolané proudy normalizované na maximální amplitudu, snímané z buněk exprimujících potkaní ortolog TRPV1. Sdružené průměry proudů jsou znázorněny jako šedá kolečka s šedými chybovými úsečkami indikujícími SEM. Pro porovnání jsou sdružené průměry proudů lidského ortologu TRPV3 znázorněné jako prázdná kolečka (SEM, šedé úsečky). Počty buněk jsou uvedeny v závorkách.

Naše data podporují dřívější zjištění získaná na myším TRPV3 (34) a navíc prokazují, že také lidský TRPV3 je aktivován vysokými teplotami, jejichž iniciační aktivační práh přesahuje 50 °C. Podobně jako myší TRPV3, lidský ortolog při opakované aktivaci silně senzitivizuje funkčně závislým způsobem.

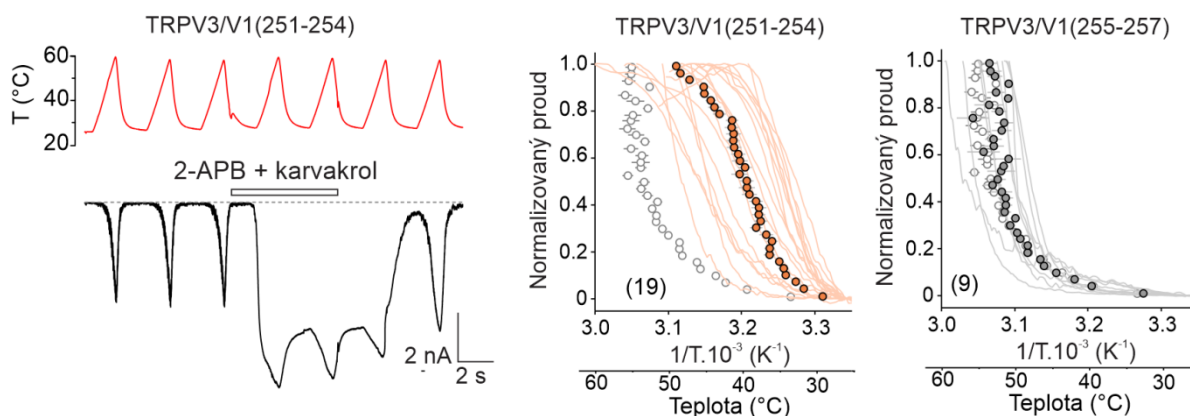
4.1.2 Třetí smyčka ankyrinové domény určuje funkční závislost teplotní senzitivace TRPV3

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) (Obr. 16 kap. 4.1, úvod). Nejprve jsme vygenerovali plně chimérický kanál se sedmi záměnami TRPV3/V1(251-257), ve kterém byly nahrazena sekvence NPKYQHE sekvencí KKTKGRP a tento konstrukt byl funkčně charakterizován protokolem s teplotními lineárními pulzy od 25 °C do teplot přesahujících 50 °C (Obr. 22 vlevo). 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 (Obr. 22 vpravo).



Obr.22: Chimerní receptor TRPV3/V1(251-257) vykazuje senzitivovaný fenotyp. Vlevo, reprezentativní elektrofyziologický záznam proudů vyvolaných opakovanou teplotní stimulací chimérického kanálu v kontrolním roztoku a v přítomnosti směsi agonistů (100 μM 2-APB + 100 μM karvakrol), měřený při membránovém napětí -70 mV v uspořádání snímání z celé buňky. Vpravo, teplotní proudové odpovědi chimérického kanálu normalizované na maximální první teplotní odpovědi (oranžové křivky) se sdruženým průměrem (oranžová kolečka s chybovými úsečkami SEM) v porovnání s průměrnou odpovědí přirozeného typu receptoru (šedá kolečka s chybovými úsečkami). Počet buněk je vyznačen v závorkách.

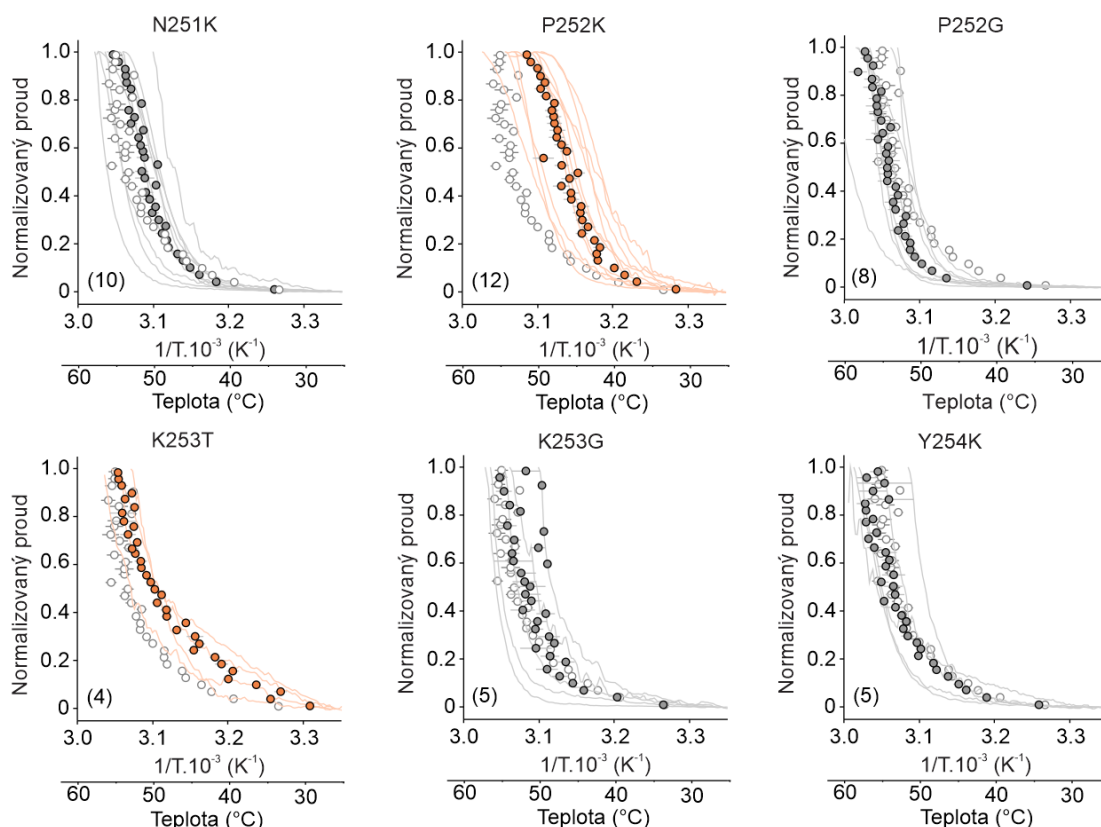
Abychom upřesnili místo, které se rozhodujícím způsobem podílí na senzitivovaném fenotypu kanálu, vytvořili jsme v dalším kroku dva chimérické konstrukty TRPV3, ve kterých byly zaměněny oblasti receptoru N251-Y254 a Q255-G257 (Obr. 23). Zatímco se mutace TRPV3/V1(255-257) nelišila od TRPV3 přirozeného typu (graf vpravo), TRPV3/V1(251-254) vykazoval senzitivovaný fenotyp (záznam vlevo, graf uprostřed). Maximální proudová odpověď vyvolaná první teplotní aplikací v kontrolním extracelulárním roztoku se nelišila od proudové odpovědi vyvolané aplikací směsi agonistů za laboratorní teploty ($P = 0.200$, 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; $n = 13$).



Obr.23: Trojmutace TRPV3/V1(251-254) vykazuje senzitivovaný fenotyp, zatímco TRPV3/V1(255-257) vykazuje fenotyp kanálu přirozeného typu. Vlevo, reprezentativní elektrofyziologický záznam membránových proudů vyvolaných opakovanou teplotní stimulací kanálu TRPV3/V1(251-254) v absenci či přítomnosti směsi agonistů (100 μM 2-APB + 100 μM karvakrol), měřený při membránovém napětí -70 mV v uspořádání měření z celé buňky. Uprostřed, vpravo, teplotní proudové odpovědi chimérického kanálu normalizované na maximum první teplotní odpovědi (oranžové křivky). Průměr pro TRPV3/V1(251-254) je vyznačen oranžovými kolečkami s chybovými úsečkami v šedé barvě (uprostřed), plnými šedými kolečkami pro TRPV3/V1(255-257) (vpravo). Pro porovnání je zobrazena průměrná odpověď TRPV3 přirozeného typu (prázdná kolečka s šedými chybovými úsečkami). Počet buněk je vyznačen v závorkách.

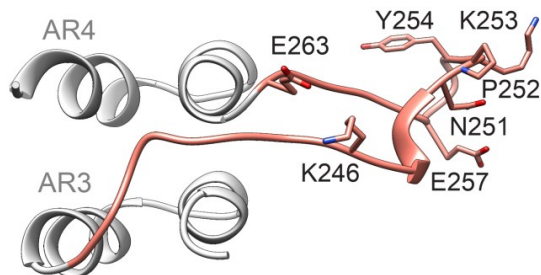
Analýza rozptylu jednoduchého třídění, one-way ANOVA, jednoznačně potvrdila rozdíly mezi konstrukty. Maximální hodnota Q_{10} a teplotní práh specifické aktivace chimerního receptoru byly statisticky významně sníženy u TRPV3/V1(251-257) a trojmutantního TRPV3/V1(251-254) kanálu ($P < 0.001$), nikoliv 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. Sdružené průměry normalizovaných prvních teplotních odpovědí mutantů jsou na obrázku 24. Výsledky ukázaly, že v oblasti třetí smyčky je pro funkci receptoru rozhodující velikost a flexibilita aminokyseliny v poloze 252, v menším rozsahu 253.



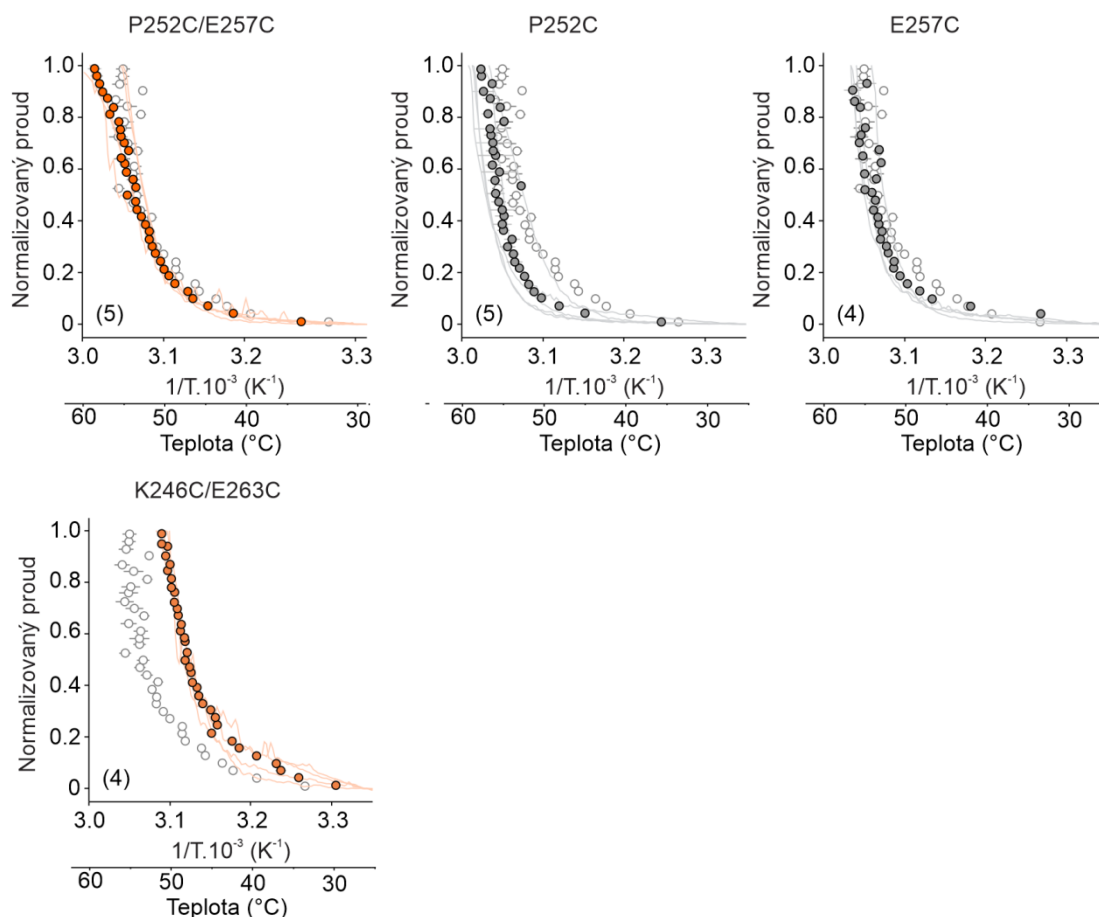
Obr.24: Normalizované proudové odpovědi mutantů z oblasti N251-Y254. Pro porovnání je v grafech zobrazen průměr normalizovaných odpovědí přirozeného typu TRPV3 (prázdná kolečka s chybovými úsečkami). Počet buněk je vyznačen v závorkách. Oranžově jsou vyznačené mutace, které způsobily senzitivovaný fenotyp. Chybové úsečky v šedé barvě značí SEM. Počet buněk je vyznačen v závorkách.

Abychom podrobněji zjistili mechanismus, kterým identifikovaná oblast třetí smyčky přispívá k teplotní aktivaci TRPV3 kanálu, dvojice reziduí ležící dle dostupného strukturního modelu (156) v těsné blízkosti (Obr. 25) jsme nahradili cysteiny: P252C/E257C a K246C/E263C.



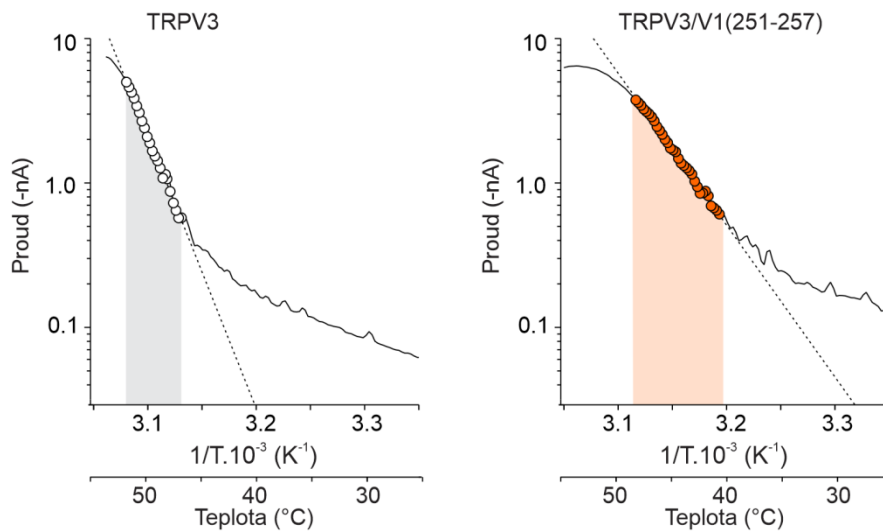
Obr.25: Rezidua ze třetí smyčky ankyrinové domény mutovaná v této studii.

Dvojmutace P252C/E257C statisticky významně ($P = 0.004$; $n = 5$) snížila sklon teplotní závislosti proudových odpovědí (na 12.3 ± 1.5), zatímco proudy vyvolané kanály s jednocysteinovými záměnami P252C a E257C nebyly statisticky odlišné od kanálu přirozeného typu (Obr. 26).



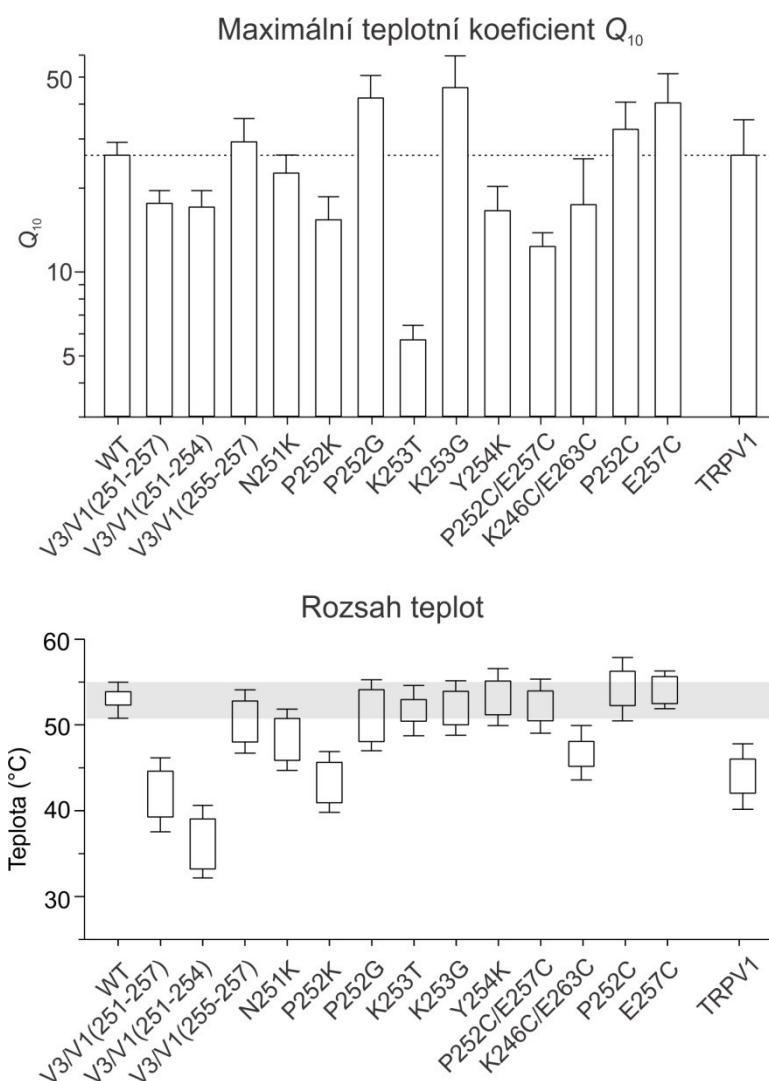
Obr.26: Modifikace třetí ankyrinové smyčky cysteinovými mutacemi na pozicích 252 a 257 a dvoucysteinovou mutací K246C/E263C. Proudové odpovědi vyvolané první teplotní stimulací HEK293T buněk exprimujících uvedené mutantní TRPV3 kanály, normalizované na maximální amplitudu s podkreslenými sruženými průměry (plná kolečka s chybovými úsečkami v šedé barvě značící SEM). Pro porovnání jsou sružené průměry TRPV3 kanálu přirozeného typu podkresleny prázdnými kolečky s chybovými úsečkami v šedé barvě značící SEM).

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) (Obr. 27).



Obr.27: Teplotní závislost proudových odpovědí snímaných z dvou reprezentativních buněk exprimujících přirozený typ TRPV3 (vlevo) a chiméru (vpravo). Teplotní koeficient Q_{10} byl stanovován pro první teplotní odpověď v lineární oblasti Arrheniovy závislosti (přerušovaná čára, $r^2 = 0.98 - 0.99$). Teplotní rozsahy použité pro vyhodnocení Q_{10} jsou vyznačeny šedou (vlevo) a oranžovou (vpravo) plochou pod grafem.

Statistické porovnání hodnot maximálních teplotních koeficientů Q_{10} a příslušných rozsahů teplot pro všechny testované konstrukty TRPV3 a pro potkaní TRPV1 je na obrázku 28.

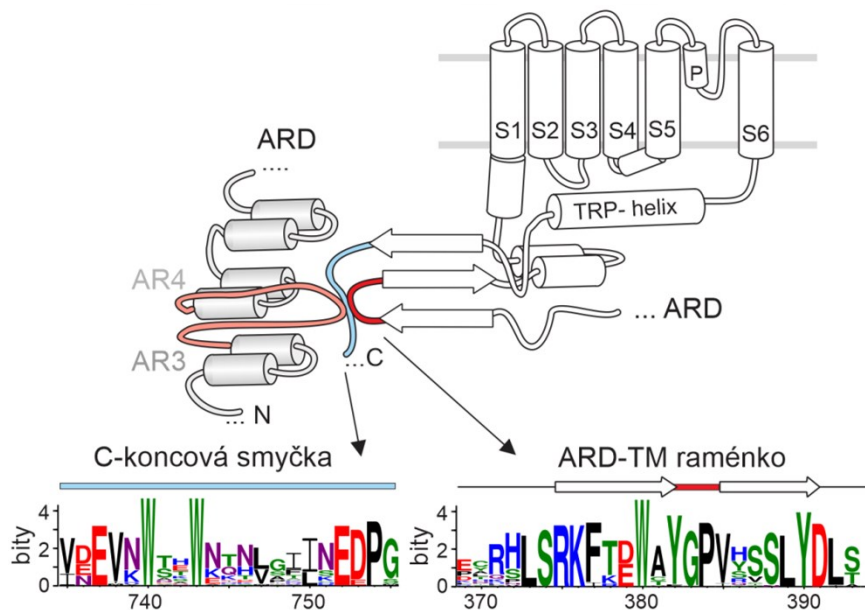


Obr.28: Statistické vyhodnocení Q_{10} a příslušných teplotních intervalů pro mutace ze třetí smyčky. Nahoře, souhrnné maximální teplotní koeficienty pro všechny testované chiméry a mutace ve srovnání s lidským TRPV3 a potkaním TRPV1 přirozeného typu. Přerušovaná čára vyznačuje maximální Q_{10} TRPV3 přirozeného typu. Dole, 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 v třetí smyčce jsou jen částečně zodpovědné za senzitivovaný fenotyp kanálu. Vzhledem k tomu, že konstrukty P252C a P252G vykazovaly stejný fenotyp jako TRPV3 kanál přirozeného typu (Obr. 24 a Obr. 26), 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

V průběhu přípravy studie byly zveřejněny struktury myšičího (137) i lidského ortologu TRPV3 (105) získané pomocí kryoelektronové mikroskopie. Dostupné struktury TRPV kanálů (105, 137, 158-162) odhalují blízkost centrální části třetí smyčky ankyrinové domény s β skládaným listem tvořeným β vlásenkou N-koncové membránové proximální domény (MPD) a C-koncovou smyčkou, který se obtáčí okolo β vlásenky a vytváří β skládaný list (105, 137) (Obr. 29).

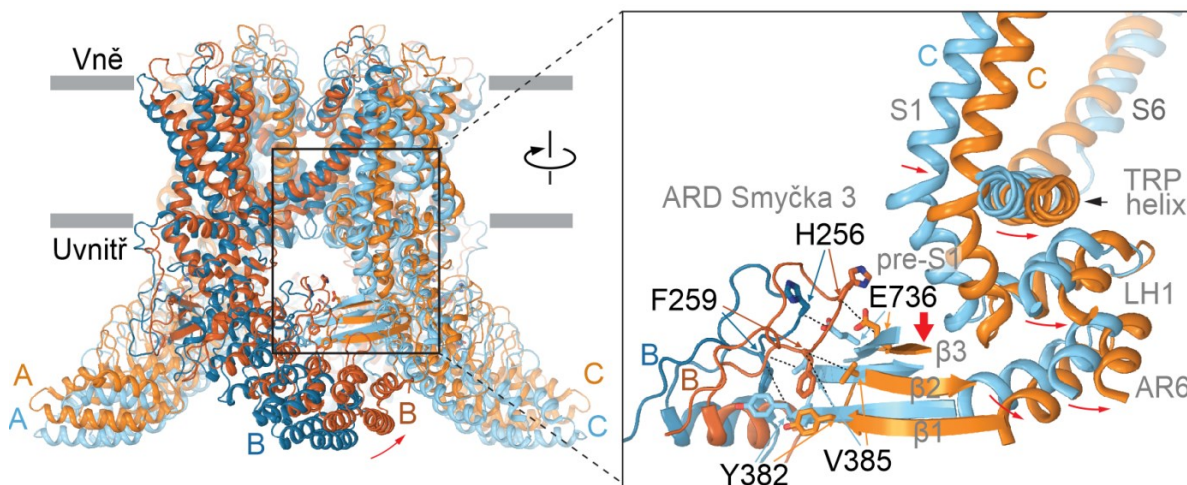


Obr.29: Topologické umístění třetí smyčky ankyrinové domény (ARD) na rozhraní s vedlejší podjednotkou v blízkosti C-koncové domény a ARD-TM raménka. Míra konzervovanosti C-koncové smyčky (modrá) a ARD-TM raménka (červená) v blízkosti se třetí smyčkou (lososová) zobrazená pomocí loga vygenerovaného za použití serveru WebLogo (157). Výška každého rezidua zobrazuje pravděpodobnost výskytu aminokyseliny na dané pozici. ARD – ankyrinová repetitivní doména, TM – transmembránová, P – pór, S – segment.

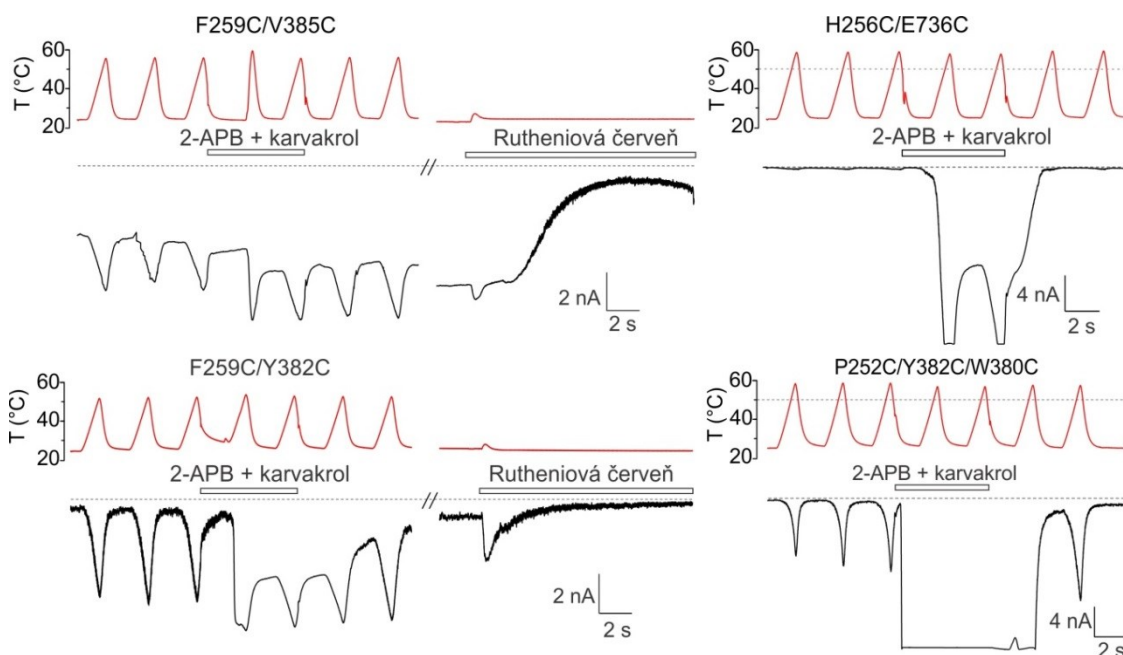
Z porovnání struktur (137) myšičího TRPV3 kanálu v otevřeném a v zavřeném stavu je patrný posuv sousedních podjednotek na rozhraní mezi třetí smyčkou ankyrinové domény a β skládaným listem vedlejší podjednotky (Obr. 30). Nejvýraznější změny vzdálenosti $C\alpha$ atomů na rozhraní podjednotek byly pozorovány 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 posuvu 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. Záznamy z těchto pokusů jsou na Obr. 31.

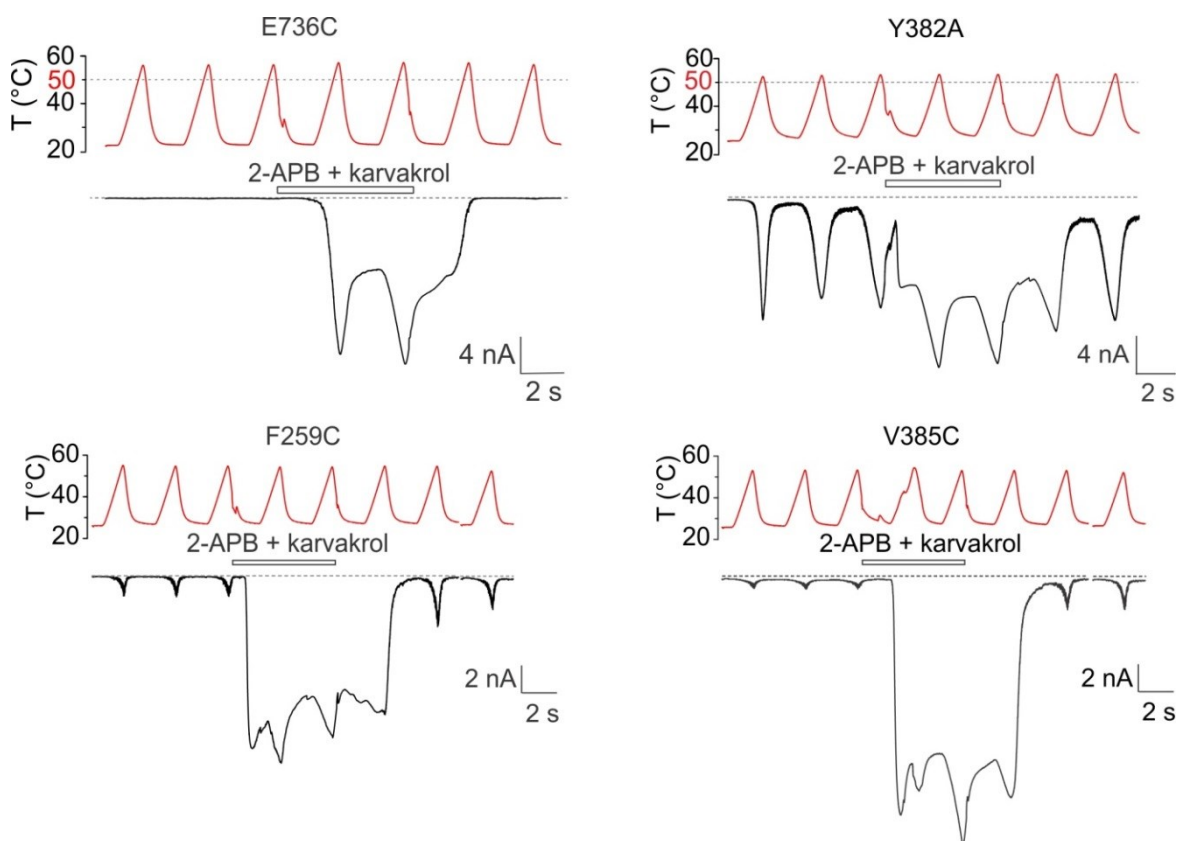


Obr.30: Změny na rozhraní třetí smyčky ankyrinové domény a β skládaného listu sousední podjednotky během vrátkování kanálu. Vlevo, superpozice zavřené (PDB ID: 6DVW, podjednotka B v modré, A a C v tyrkysové barvě) a otevřené (PDB ID: 6DVZ, podjednotka B je v hnědé, A a C v oranžové barvě) struktury kanálu TRPV3. Vpravo, detailní pohled na rozhraní podjednotek se zvýrazněnými aminokyselinovými zbytky studovanými v této práci. Směr pohybu na rozhraní podjednotek je vyznačen červenými šipkami.



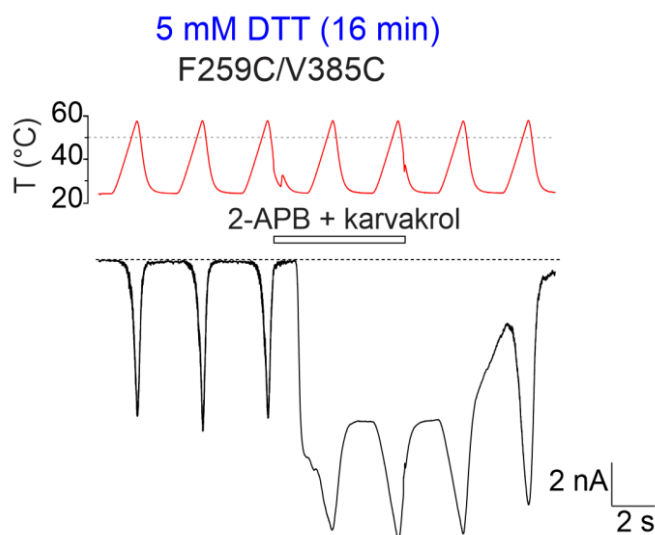
Obr.31: Repräsentativní záznamy dvojcysteinových mutací. Proudové odpovědi TRPV3 s vnesenými záměnami v pozicích F259C/V385C, F259C/Y382C, H256/E736C a P252C/Y382C/W380C vyvolané teplotní stimulací získané technikou patch-clamp v uspořádání měření z celé buňky na membránovém potenciálu -70 mV v kontrolním extracelulárním roztoku a v přítomnosti směsi agonistů (100 μ M 2-APB + 100 μ M karvakrol). Vlevo, konstrukt F259C/V385C vykazoval výraznou bazální aktivitu, která byla zcela blokovatelná nespecifickým blokátorem rutheniovou červení (10 μ M). Vpravo nahoře, teplotně rezistentní konstrukt. Vlevo dole, senzitivizující fenotyp kontraktu F259C/Y382C.

Buňky exprimující F259C/V385C nebo F259/Y382C vykazovaly vysoký klidový proud při teplotě 25 °C na membránovém potenciálu -70 mV, jenž byl zcela blokovatelný nescifickým blokátorem TRP kanálů rutheniovou červení (10 μM). 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. Amplituda proudových odpovědí vyvolaných kombinací směsi agonistů a tepla byla však srovnatelná s kanálem přirozeného typu. Trojcysteinová mutace P252C/Y382C/W380C se nelišila od kanálu přirozeného typu a ponechala si vlastnost funkčně závislé senzitivizace. E736C se 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 (Obr. 32). To nasvědčuje tvorbě disulfidických můstků mezi blízkými rezidui a podporuje naši hypotézu o významu ve stabilizaci otevřeného stavu kanálu.



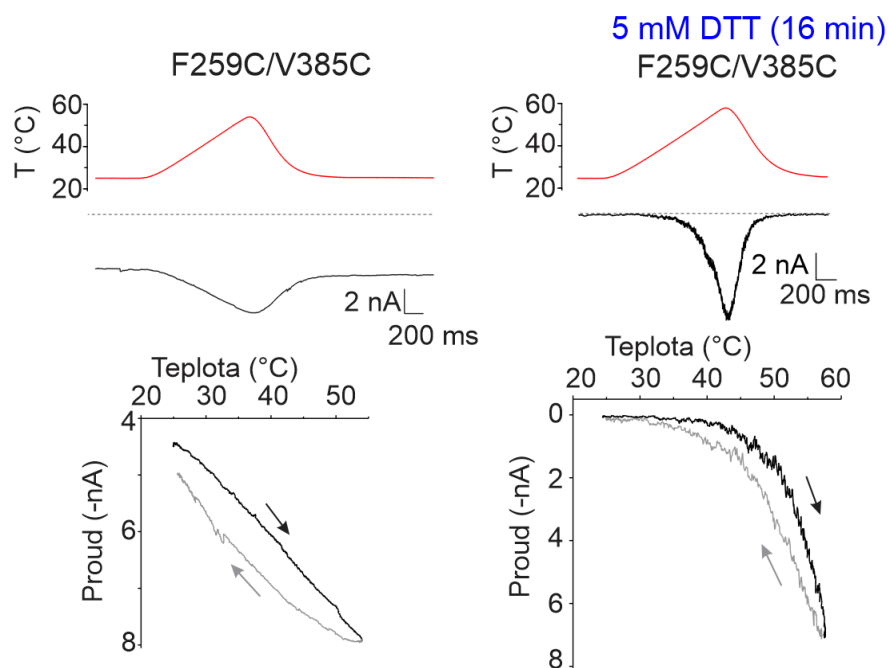
Obr.32: Reprezentativní záznamy z HEK293T buněk exprimujících uvedené konstrukty TRPV3. Proudové odpovědi vyvolané teplotními podněty snímané technikou patch-clamp v uspořádání měření z celé buňky v kontrolním extracelulárním roztoku a v přítomnosti směsi agonistů (100 μM 2-APB + 100 μM karvakrol). Membránový potenciál -70 mV.

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 (Obr. 33).



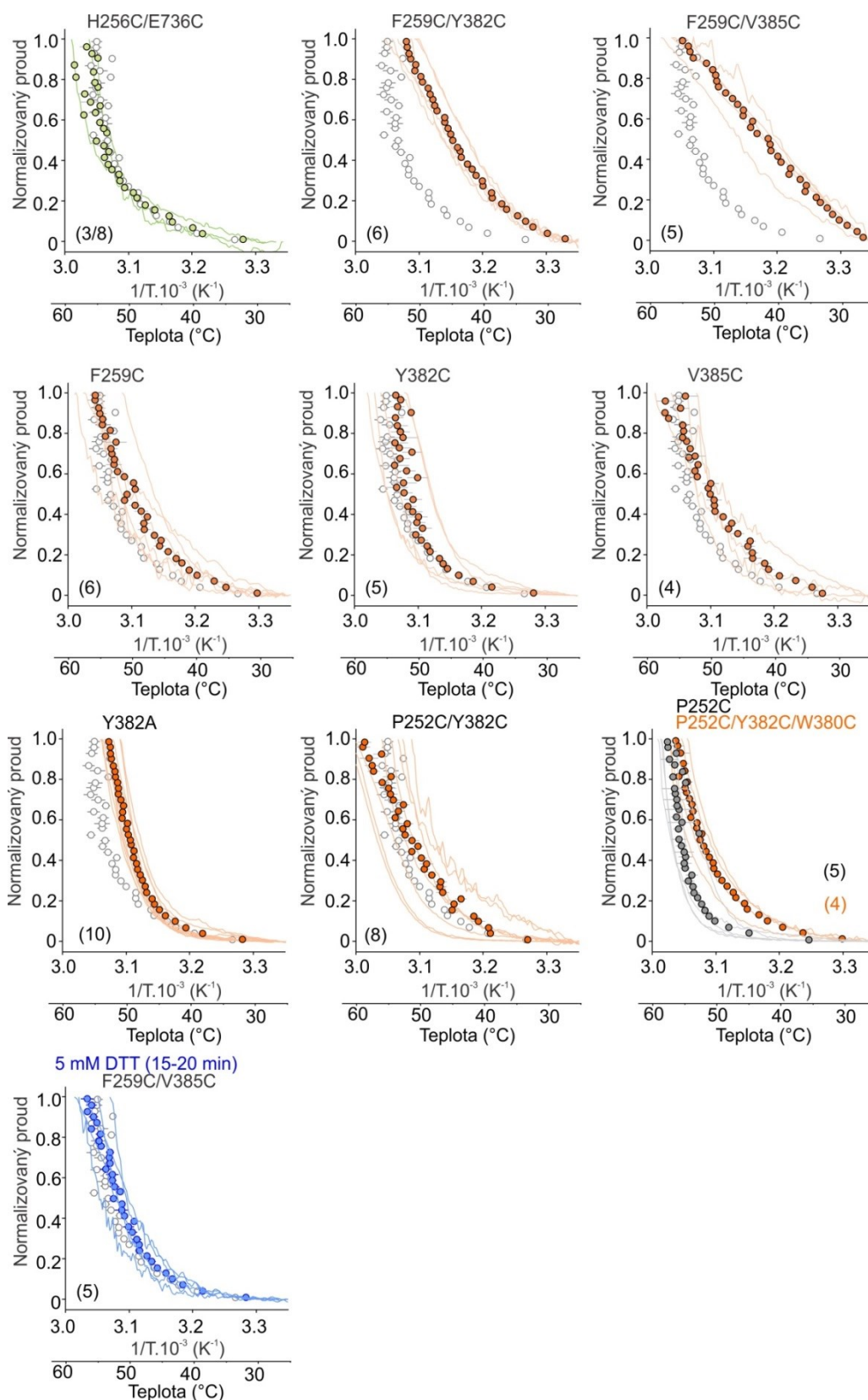
Obr.33: Bazální aktivita F259C/V385C konstrukt TRPV3 byla potlačena inkubací v DTT. Reprezentativní proudové odpovědi vyvolané teplotními podněty, snímané technikou patch-clamp z HEK293T buněk inkubovaných 16 min v DTT (5 mM). Aplikace agonistů (100 μ M 2-APB + 100 μ M karvakrol) je vyznačena nad záznamem. Membránový potenciál -70 mV.

Inkubací dvojcysteinové mutace v DTT byl potlačen bazální proud a navrácena vysoká teplotní citlivost kanálu (Obr. 34 dole).



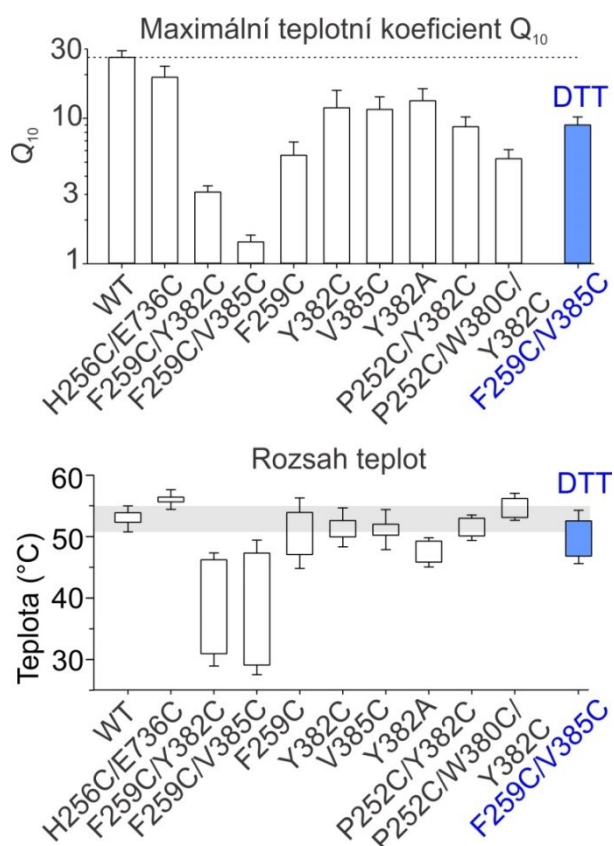
Obr.34: Redukční činidlo DTT vrátilo mutantnímu kanálu F256C/V385C teplotní citlivost. Porovnání prvních proudových odpovědí vyvolaných teplotním rampem indikované dvojcysteinové mutace v absenci (vlevo) a přítomnosti (vpravo) redukčního činidla DTT (nahore) vnesených jako závislosti proudu na teplotě (dole).

Sdružené průměry normalizovaných prvních teplotních odpovědí pro všechny mutace TRPV3 popsané v kapitole 4.1.3, včetně mutace F259C/V385C, inkubované v DTT jsou uvedeny na obrázku 35.



Obr.35: Teplotní proudové odpovědi cysteinových mutantů normalizované na maximum první teplotní odpovědi. Pro porovnání je v grafech zobrazen průměr odpovědi TRPV3 přirozeného typu (šedá prázdná kolečka). Zeleně je vyznačen konstrukt, u kterého nebylo možné vyhodnotit všechna měření. Modře je označen konstrukt F259C/V385C snímaný po 15-20min inkubaci v DTT. Chybové úsečky v šedé barvě značí SEM. Počet buněk je vyznačen v závorkách.

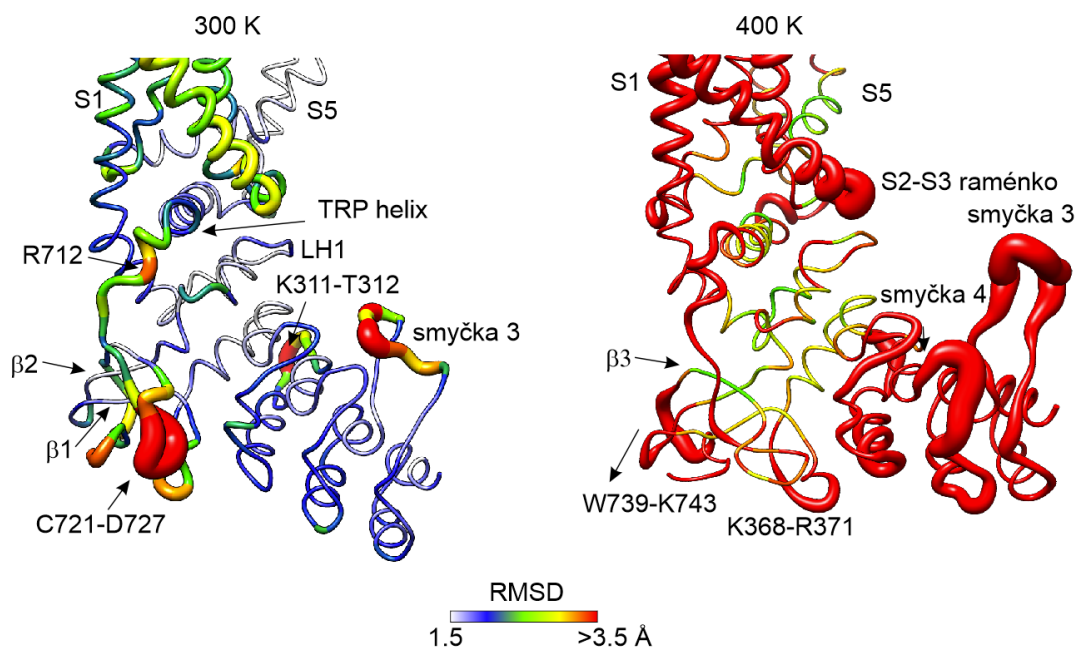
Na obrázku 36 je uvedeno celkové statistické vyhodnocení maximálních teplotních koeficientů a rozsahů teplot pro všechny konstrukty popsané v kapitole 4.1.3 porovnávaných s lidským ortologem TRPV3 přirozeného typu.



Obr.36: Statistické vyhodnocení hodnot Q_{10} a příslušných teplotních intervalů pro cysteinové mutace na rozhraní podjednotek. Nahoře, souhrnné maximální teplotní koeficienty cysteinových mutací ve srovnání s lidským TRPV3. Přerušovaná čára vyznačuje průměrné maximální Q_{10} TRPV3 přirozeného typu. Dole, průměrné rozsahy teplotních intervalů, ve 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. Modře je vybarven konstrukt snímaný po inkubaci v 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 (~27 °C), 330 K (~57 °C) a 400 K (~127 °C). Trajektorie molekul ze simulací v délce 50 ns byly vyhodnoceny a vyobrazeny ve formě stužkového diagramu středních kvadratických odchylek (RMSD). Diagram barevně i tloušťkou stužky zobrazuje rozsah RMSD páteře (C α) proteinu při molekulárně dynamických simulacích na dvou teplotách (Obr. 37).



Obr.37: Molekulárně dynamická simulace zahřívání TRPV3. Změna ve flexibilitě podjednotky A molekuly TRPV3 vyjádřená jako střední kvadratická odchylka RMSD páteře molekuly při 300 K (vlevo) a 400 K (vpravo).

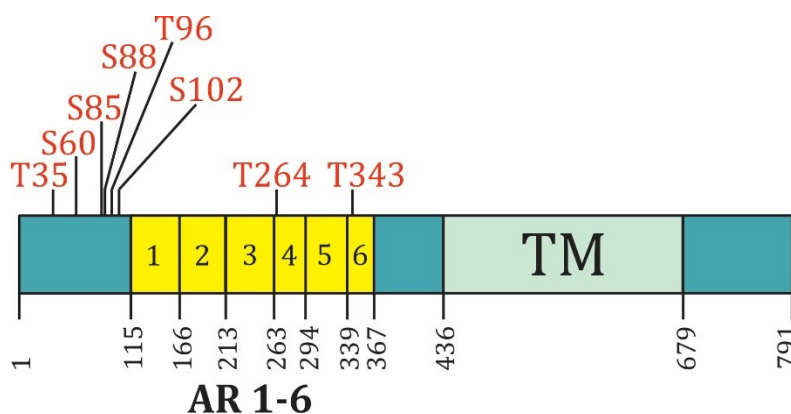
Z diagramu je patrné, že při zahřátí molekuly se silně zvýší flexibilita smyčky 3 a smyčky 4 ankyrinové domény, zatímco oblast β -skládaného listu, membránová proximální doména a TRP-helix zůstávají poměrově rigidní. Z toho plyne, že rigidní oblast by mohla přenášet teplotní signál ze třetí smyčky ankyrinové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

4.2 Funkční regulace TRPV3 kanálu fosforylací²

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. 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 1/2 kinázu. Celkem bylo na N-konci TRPV3 vyhledáno 8 ERK 1/2 konsenzuálních míst o sekvenci (PX(S/T)P), čtyři z nich obsahující PXSP motiv: Ser⁶⁰, Ser⁸⁵, Ser⁸⁸, Ser¹⁰² a čtyři s PXTIP motivem: Thr³⁵, Thr⁹⁶, Thr²⁶⁴, Thr³⁴³. Na obrázku 38 je znázorněna pozice jednotlivých potenciálních fosforylačních míst v rámci TRPV3 podjednotky.

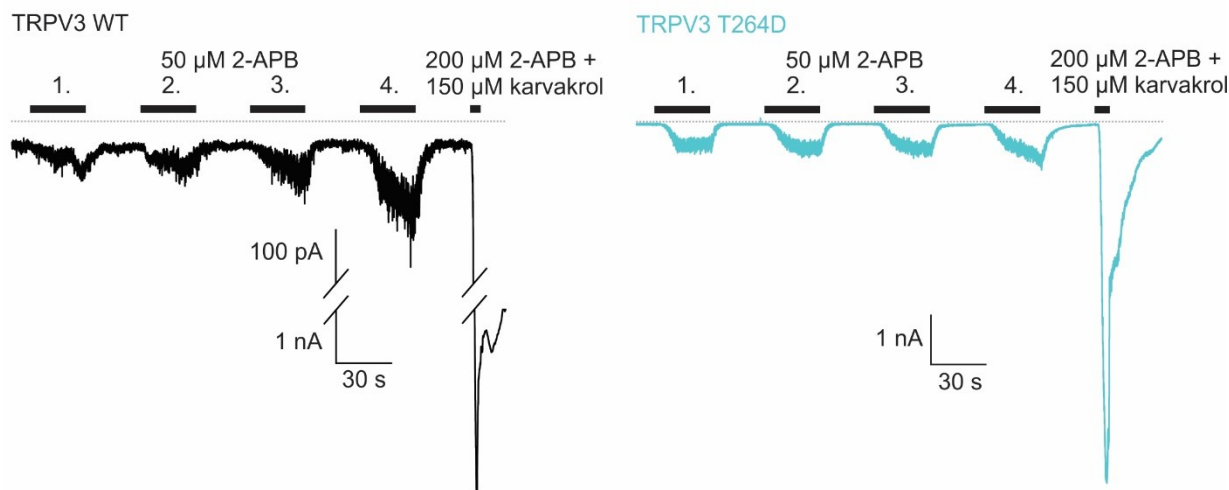


Obr.38: Pozice potenciálních fosforylačních míst TRPV3 kanálu.

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 elektrofyziologickému měření. Na buňky byl čtyřikrát po dobu 30 s aplikován agonista 2-APB

² Příspěvek autora na získání uvedených dat převzatých z publikace Vyklická *et al.* (2017): L. Máčiková (L.M.) provedla část elektrofyziologických měření na transfekovaných HEK293T a HaCaT buňkách a jejich následné vyhodnocení, zajišťovala kultivaci HaCaT buněk a podílela se na experimentech ověřujících míru exprese kanálů.

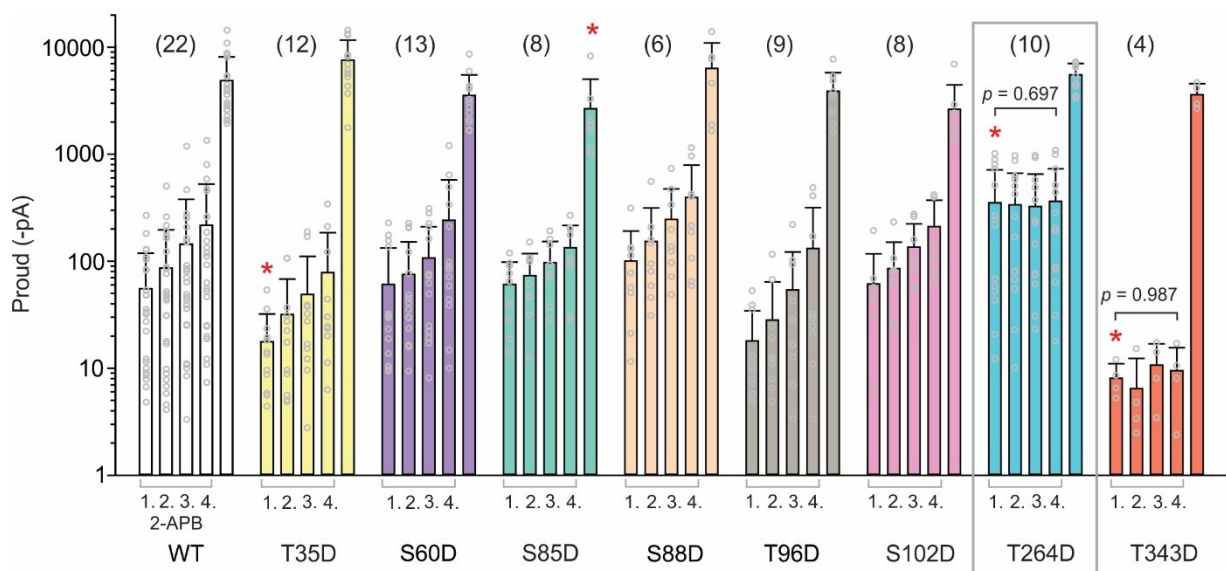
o koncentraci 50 μM , po každé aplikaci následovalo odmytí trvající 30 s. Na závěr měření byla po dobu 10 s aplikována směs agonistů o saturující koncentraci (200 μM 2-APB a 150 μM karvakrol). Proudová odpověď vyvolaná směsí agonistů byla považována za maximální proudovou odpověď saturovaných kanálů a byla používána jako referenční hodnota (Obrázek 39).



Obr.39: Reprezentativní záznam proudových odpovědí snímaných z HaCaT buněk tranzientně transfekovaných TRPV3 kanály přirozeného typu (černě) a mutantních kanálů se záměnou na pozici T264D (modře). Vlevo, proudové odpovědi kanálů přirozeného typu lidského TRPV3 vyvolané aplikací agonisty 2-APB byly značně menší než maximální proudová odpověď kanálů vyvolaná směsí agonistů, proto byla použita dvě měřítka.

Při porovnání velikostí proudových odpovědí TRPV3 přirozeného typu je patrné, že s opakovanou aplikací 50 μM 2-APB velikost odpovědí rostla a při čtvrté aplikaci agonisty dosahovala 5% velikosti maximální proudové odpovědi (Obr. 40). Konstrukt T264D vykazoval statisticky signifikantně vyšší amplitudy proudových odpovědí na první aplikaci agonisty než přirozený typ TRPV3. T264D a T343D nebyly senzitivizovány při opakované stimulaci 50 μM 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 již během 30 s proudové odpovědi, která se dále nezvyšovala (Obr. 39). 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 senzitivizoval

ve srovnatelné míře jako kanály přirozeného typu, proto na něj nebyla soustředěna další pozornost při hledání hlavního fosforylačního místa. Až na výjimku konstruktů S85D, hodnoty proudových odpovědí vyvolaných aplikací směsi agonistů o saturující koncentraci byly srovnatelné mezi mutantními kanály a kanály přirozeného typu TRPV3.



Obr.40: Proudové odpovědi TRPV3 kanálů exprimovaných v HaCaT buňkách vynesené v logaritmickém měřítku. Data jsou zobrazena jako průměr + SD. Hvězdičkou * jsou označena data statisticky významně se lišící od kanálů přirozeného typu (t-test, $P \leq 0.05$).

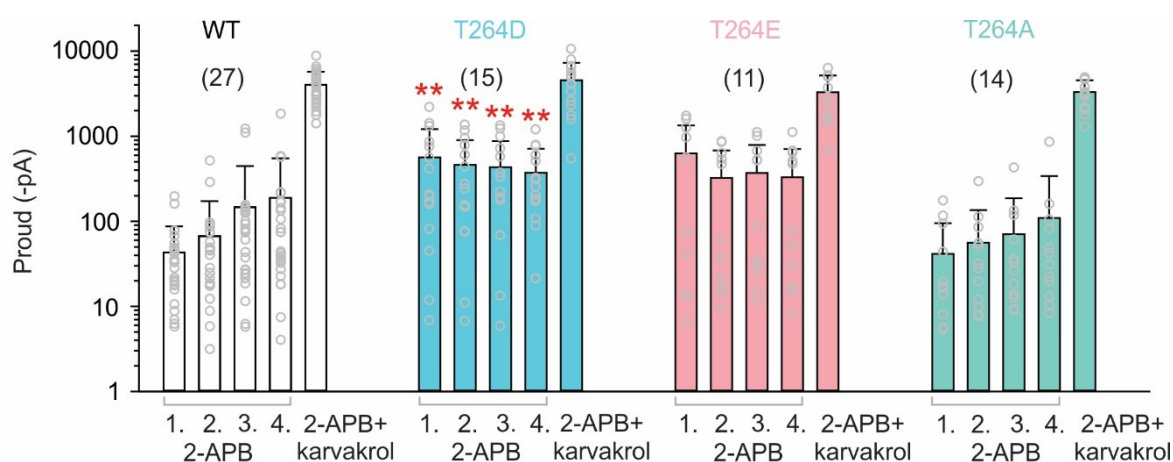
Fosfomimikující mutace T264D senzitivizovala kanál beze změny ve velikosti maximální proudové odpovědi vyvolané saturující koncentrací směsi agonistů, jak jsme očekávali v případě potenciace kanálu MEK kinázou. Z toho důvodu bylo reziduum T264 vybráno za hlavního kandidáta na fosforylační místo pro fosforylaci 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 proto, 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

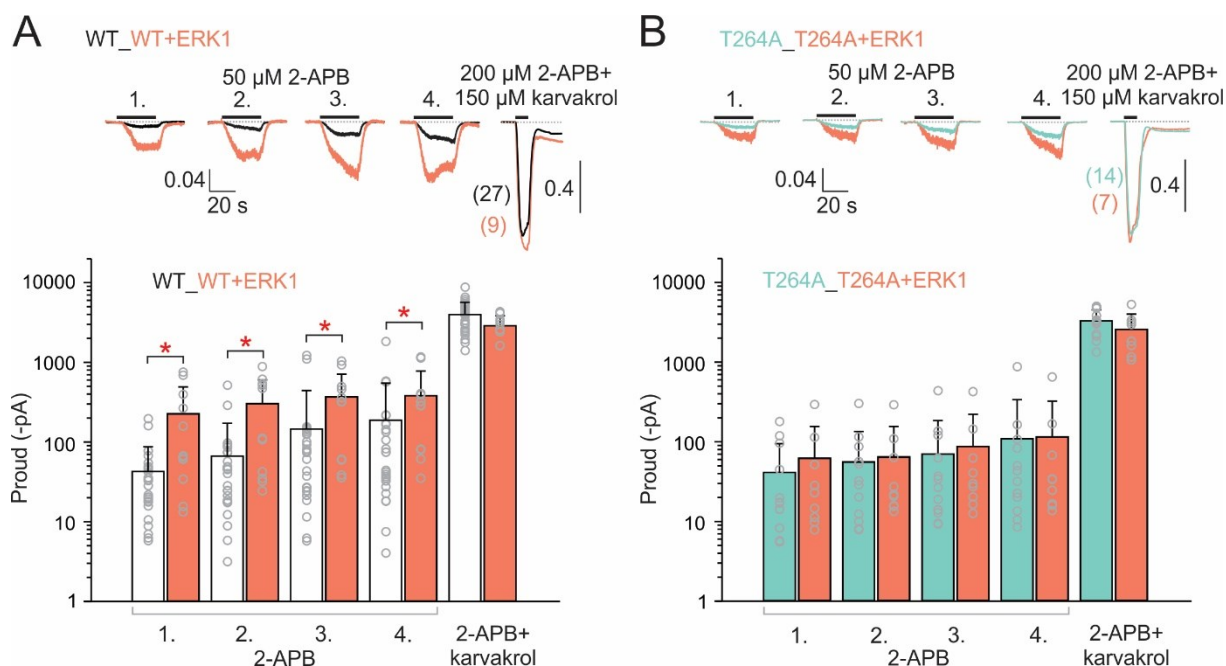
T264E a mutací T264A, u které jsme předpokládali, že zamezí fosforylaci (Obr. 41). Všeobecný charakter proudových odpovědí přirozeného typu TRPV3 a T264D se shodoval s experimenty na HaCaT buňkách. Proudové odpovědi vyvolané první aplikací agonisty 2-APB u T264D byly statisticky významně vyšší v porovnání s TRPV3. Při opakované stimulaci nesenzitizoval 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.



Obr.41: Proudové odpovědi TRPV3 kanálů exprimovaných v HEK293T buňkách vynesené v logaritmickém měřítku. Data jsou zobrazena jako průměr + SD. Dvojitou hvězdičkou ** jsou označena data statisticky významně se lišící od kanálů přirozeného typu (t-test, $P \leq 0.01$).

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 (Obr. 42). 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 ($P = 0.230$).

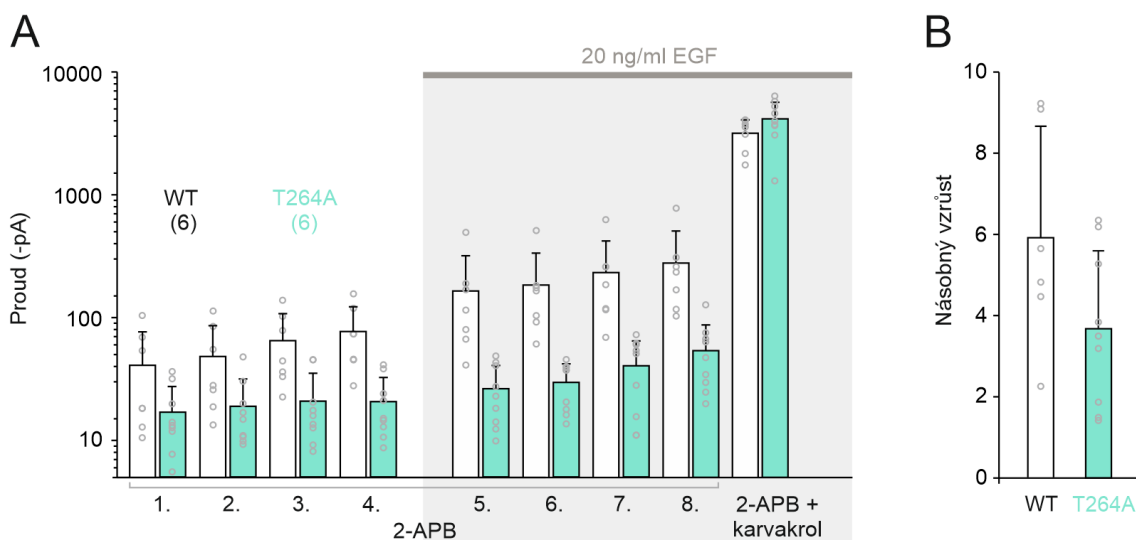


Obr.42: Proudové odpovědi TRPV3 (A) a mutantu T264A (B) v nepřítomnosti a v přítomnosti ERK1. Data jsou zobrazena jako průměr + SD. Hvězdičkou * jsou označena data statisticky významně se lišící od kanálů přirozeného typu (t-test, $P \leq 0.05$). Amplitudy membránových proudů v logaritmické transformaci vykazovaly normální statistické rozdělení.

V přítomnosti ERK1 kinázy byly zvýšeny proudové odpovědi přirozeného typu TRPV3 vyvolané 50 μM 2-APB, které při opakované stimulaci nesenzitizovaly a podobaly se svým fenotypem fosfomimikujícími mutacím T264D a T264E. 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 μM) 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 aplikována po dobu 10 s směs agonistů o saturující koncentraci 200 μM 2-APB a 150 μM karvakrol (Obr. 43).



Obr.43: Míra potenciace indukovaná EGF. A, Proudové odpovědi vyvolané opakovanou aplikací nízké koncentrace 2-APB (50 μ M), snímané z HaCaT buněk tranzientně transfekovaných přirozeným typem TRPV3 (bílá) nebo mutantem T264A (zelená) v nepřítomnosti a v přítomnosti EGF. B, Pro názornost vynesena poměry osmé proudové odpovědi vůči první.

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.

4.3 Oblast TRPA1 receptoru interagující s membránovými fosfolipidy reguluje aktivaci TRPA1 na fyziologických membránových potenciálech³

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 (163) a zjištěna vysoká afinita peptidu o sekvenci odpovídající oblasti I964-L992 TRP-like domény k membránovému PIP₂ (164). Z později publikované struktury TRPA1 vyplynulo, že PIP₂ 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 (5). 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 PIP₂ (Tab. 5).

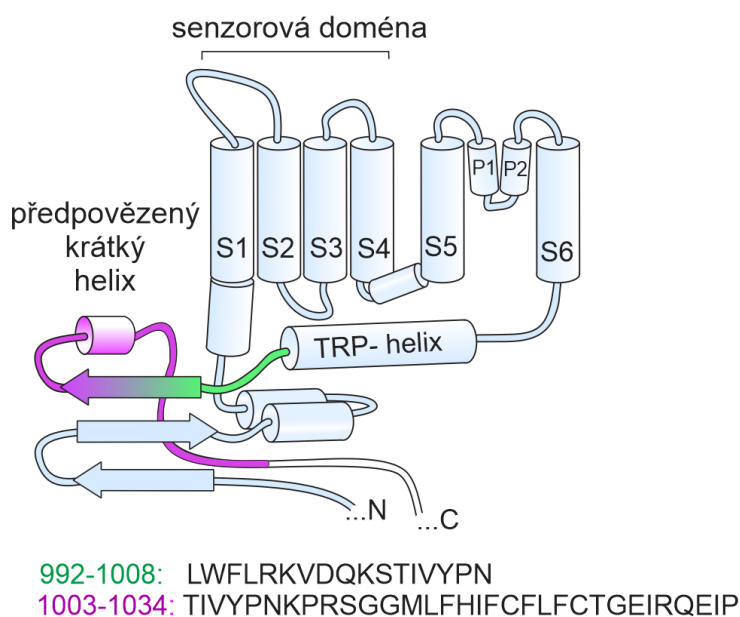
Tab.5: Přehled vybraných předpovězených sekvencí peptidů z C-konce TRPA1 s nejvyšším skóre pravděpodobnosti antibakteriální aktivity (AntiBP, viz. výše) a tedy potenciální interakce s membránovými fosfolipidy.

Sekvence peptidu	Počáteční pozice	Skóre
FHIFCFLFCTGEIRQ	1017	1.477
TVLRAVKAKTHHLEP	1105	1.178
RWNTVLRAVKAKTHH	1102	1.046
HTSLEKKLPLWFLRK	983	0.861
GDIAEVQKHASLKRI	962	0.712
IVYPNKPRSGGMLFH	1004	0.659
DIAEVQKHASLKRIA	963	0.598
VGDIAEVQKHASLKR	961	0.542
VYPNKPRSGGMLFHI	1005	0.490

Dostupná cryo-EM struktura receptoru (PDB 3J9P) v maximálním rozlišení 4.24 Å má špatně rozlišenou oblast klíčky 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

³ **Příspěvek autora** na získání uvedených dat převzatých z publikace Máčiková *et al.* (2019): L. Máčiková (L.M.) provedla většinu biofyzikálních měření, veškerá elektrofyziologická měření na transfekovaných F11 buňkách a část měření na transfekovaných HEK293T, data vyhodnotila a zpracovala do grafické formy.

L992-N1008 odpovídající části TRPA1 vázající kalmodulin (89), překrývající částečně C-konec první sekvence. Cílem studie bylo objasnit, zda navržené peptidy mohou interagovat s PIP₂, zda se vazebné místo pro PIP₂ či jiné membránové fosfolipidy může překrývat s vazebným místem pro kalmodulin a o toto vazebné místo účinně kompetovat při aktivaci receptorů. Umístění sekvencí v rámci podjednotky TRPA1 a aminokyselinové složení peptidů jsou vyznačeny na obrázku 44.

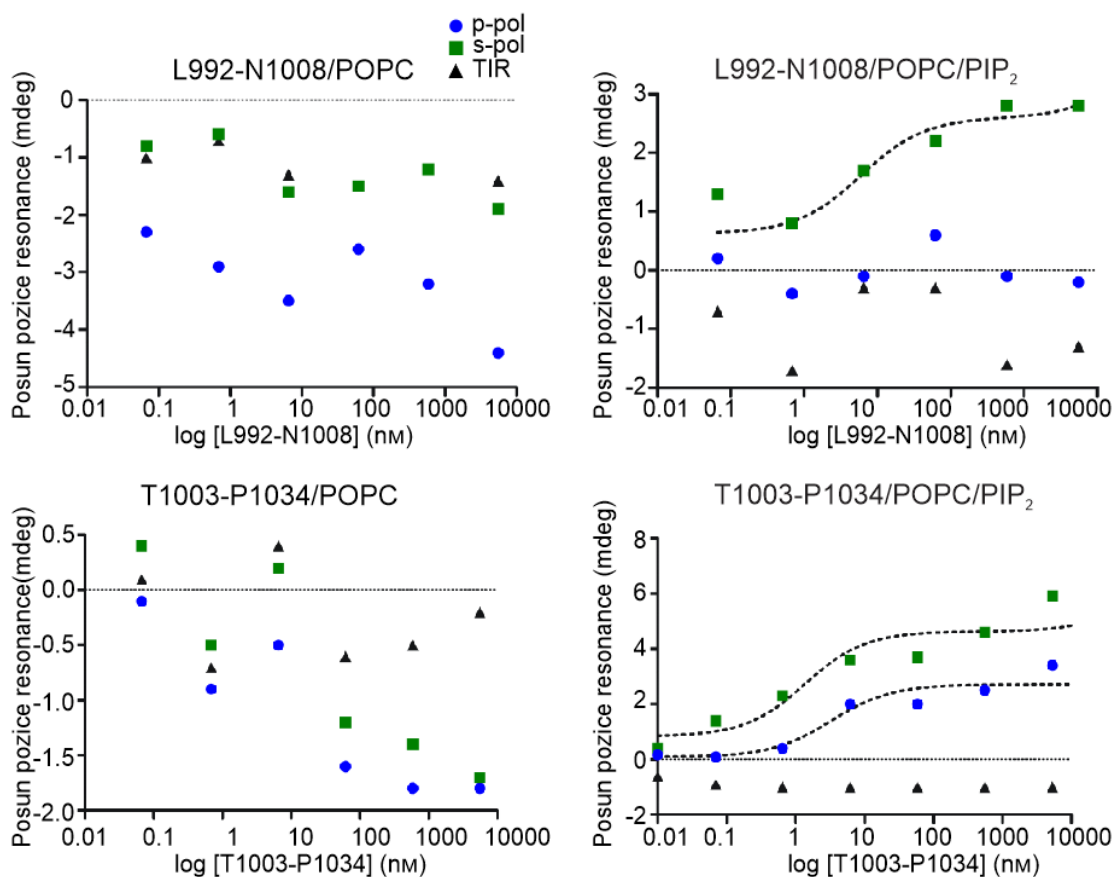


Obr.44: Schematické znázornění podjednotky TRPA1 receptoru s vyznačenými oblastmi s predikovanou interakcí s membránovými fosfolipidy. Barevně je vyznačena málo rozlišená oblast kličky propojující TRP-helix s „coiled-coil“ doménou C-konce. Zeleně je vyznačena oblast receptoru vázající kalmodulin, fialově pak přiléhající oblast s předpovězenou sktrukturou krátkého α -helixu. Dole pod schématem jsou zobrazeny sekvence peptidů použitých v této studii.

4.3.1 Povrchová vazba peptidů k membránovým fosfolipidům s PIP₂

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.

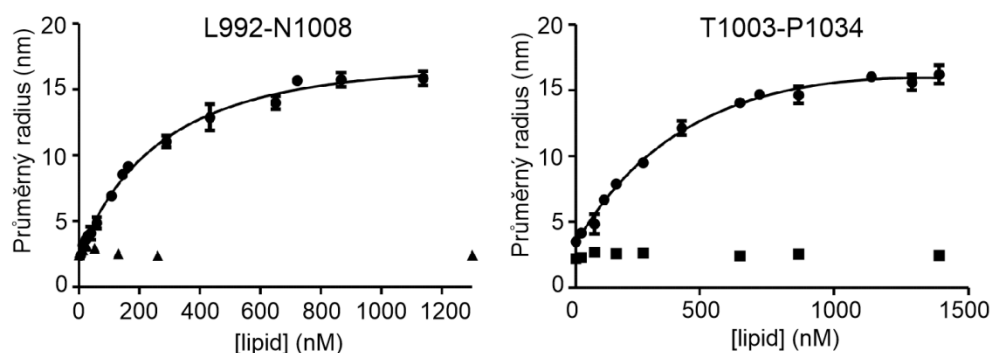
Technika PWR ukázala, že přítomnost PIP₂ je nutná pro interakci (Obr. 45).



Obr.45: Reprezentativní pokusy pro stanovené interakce peptidů L992-N1008 a T1003-P1034 s modelovou planární membránou složenou POPC nebo směsí POPC/PIP₂ měřené metodou PWR. Posun pozice rezonance získané v *p*- (modrá kolečka), *s*- (zelené čtverečky) polarizaci a při měření úhlu totálního vnitřního odrazu (angl. total internal reflection, TIR; černé trojúhelníčky) při vzrůstajících koncentracích peptidů a při složení modelových membrán 100% POPC nebo 95% POPC a 5% PIP₂.

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 μ M. V případě modelové membrány s obsahem 5 % PIP₂ docházelo se zvyšující se koncentrací peptidů ke změnám v *s*- a *p*-rezonancích. Přestože bylo možné křivky proložit teoretickou hyperbolickou saturační křivkou (obr. 45 grafy vpravo), vzhledem k rozlišovací schopnosti přístroje (≤ 5 mdeg) nebylo možné určit rovnovážnou disociační konstantu K_D mezi peptidy a lipidy. V přítomnosti 20% PIP₂ a 80% POPC v modelové membráně nedošlo v dalším navýšení amplitudy rezonance (data nejsou ukázána).

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/PIP₂ (9/1 mol.mol⁻¹) byla prokázána vazba obou peptidů s afinitami v rozmezí 300 – 700 nM (Obr. 46).



Obr.46: Interakce peptidů L992-N1008 a T1003-P1034 se SMALP složenými z POPC nebo směsi POPC/PIP₂ 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.

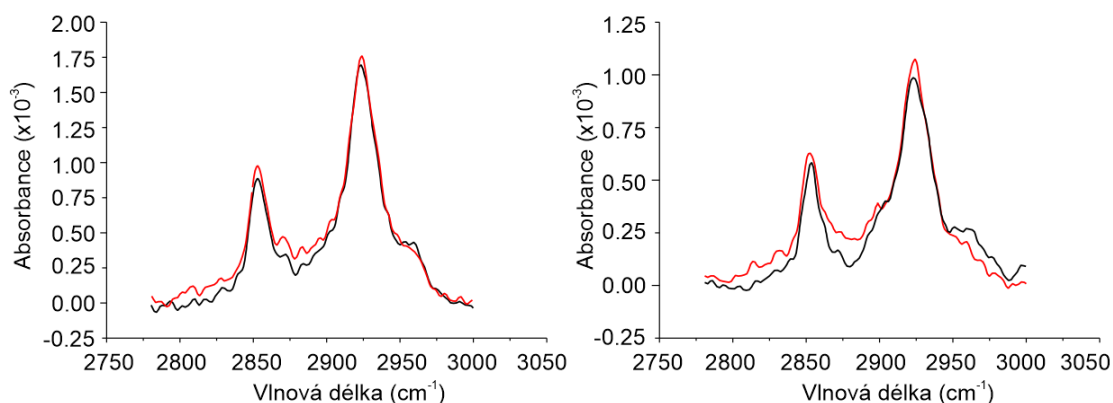
Následně byl pomocí stejné techniky pozorován vliv přítomnosti vápenatých iontů (2 mM Ca²⁺) na afinitu interakce mezi SMALP o složení POPC/PIP₂ (9/1 mol.mol⁻¹) a oběma peptidy (Tab. 6). Přítomnost vápenatých iontů v pufru snížila afinitu obou peptidů ke SMALP s obsahem PIP₂.

Tab.6: Vazebné afinity (uvedené v nM koncentracích) získané pomocí MDS pro peptidy L992-N1008 a T1003-P1034 ke SMALP složených z POPC a směsi POPC/ PIP₂ 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 ₂ (9/1 mol.mol ⁻¹) bez Ca ²⁺	330 ± 68	685 ± 114
POPC/PIP ₂ (9/1 mol.mol ⁻¹) s 2 mM Ca ²⁺	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 CH₂ valenčních vibrací symetrických (2852 cm⁻¹) a antisymetrických (2923 cm⁻¹) v obou polaritách (Obr. 47).



Obr.47: Interakce peptidu L992-N1008 s modelovou membránou tvořenou SUV o kompozici 80% POPC a 20 % PIP₂ studované metodou *p*ATR-FTIR. ATR-FTIR spektra měřená v p- (levý graf) a s- (pravý graf) polarizovaném světle v absenci (černá) a přítomnosti (červená) peptidu L992-N1008.

Signály pro amid I (1640 cm⁻¹) a amid II (1535 cm⁻¹) 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 PIP₂ přítomností peptidů L992-N1008 a T1003-P1034 metodou fluorescenční analýzy měřením fluorescence internalizovaného sulforhodaminu B. Slabá perturbace membrány byla potvrzena i výsledky *p*ATR-FTIR a PWR, kdy další zvyšování obsahu PIP₂ v modelové membráně nezvýšilo signál, ani nezměnilo rezonanci. Výsledky fluorescenční analýzy jsou uvedeny v tabulce 7.

Tab.7: Vliv peptidů L992-N1008 a T1003-P1034 na integritu LUV o složení POPC/PIP₂ (9.5/0.5 mol.mol⁻¹) s internalizovaným sulforhodaminem B. Množství (%) uvolněného sulforhodaminu B z LUV do prostředí při různých poměrech peptid/lipid. Data jsou uvedena jako střední hodnota ± SD, byly provedeny 2 opakování pro každé měření.

P/L poměr	T1003-P1034		L992-L1008	
	POPC	95 % POPC + 5 % PIP ₂	POPC	95 % POPC + 5 % PIP ₂
1/100	2.5 ± 0.3	0	2.4 ± 0.6	0
1/50	1.3 ± 0.2	0	1.6 ± 0.4	0
1/25	2.9 ± 0.3	0	1.9 ± 0.2	0
1/10	2.5 ± 0.4	0	2.5 ± 0.3	0

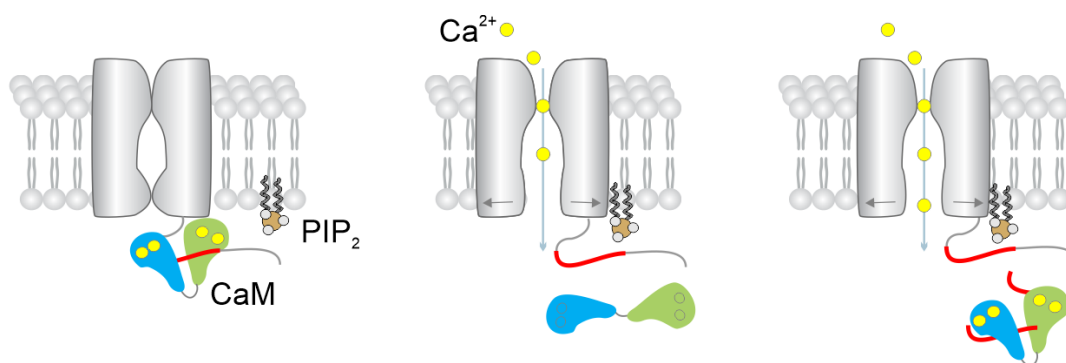
Nebyl pozorován žádný únik sulforhodaminu B z lipozomů ani při nejvyšším použitém poměru peptid/lipid (P/L) 1/10.

Z našich výsledků vyplývá, že k interakci mezi peptidy a lipidy dochází pouze v přítomnosti PIP₂ 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 PIP₂ kompetuje o místo s komplexem Ca²⁺/kaldmodulin

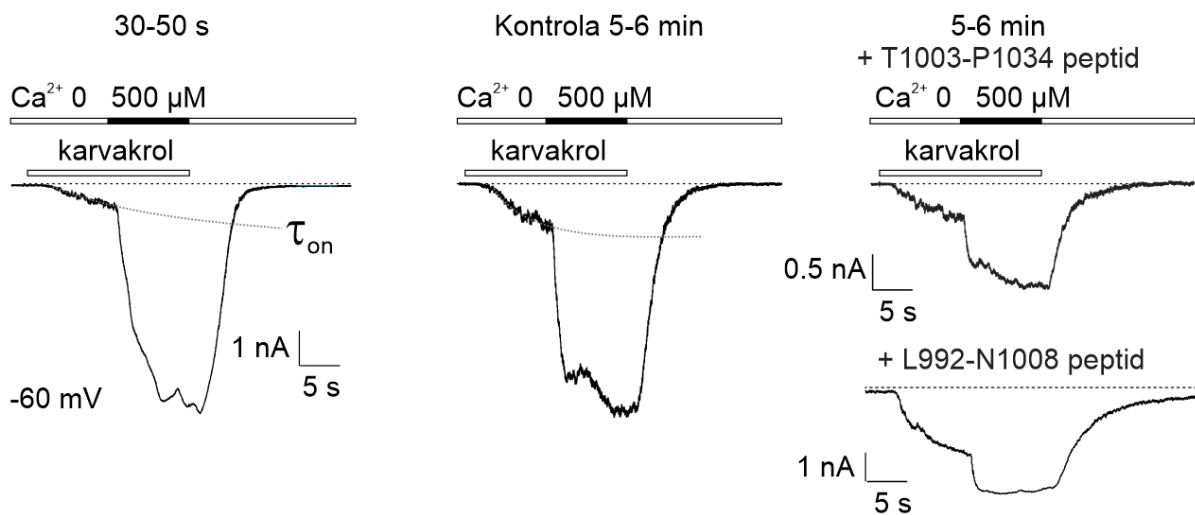
V nedávné době bylo ukázáno, že komplex Ca²⁺/kaldmodulin se váže na TRPA1 v oblasti L992-L1008 a zvyšuje aktivaci kanálu při fyziologických membránových potenciálech (89). Tato sekvence se shoduje s aminokyselinovým složením jednoho ze studovaných peptidů (Obr. 48 vlevo). Výsledky uvedené v kapitole 4.3.1 ukazují, že peptid L992-L1008 interaguje s PIP₂ a v přítomnosti Ca²⁺ jeho afinita klesá. Jaká je úloha PIP₂ v nociceptivních neuronech za fyziologických podmínek je stále předmětem intenzivního studia. Je známo, že PIP₂ reguluje aktivitu mnoha receptorů včetně TRPV1, který je exprimován společně s TRPA1 (90). Testovali jsme možnost, že PIP₂ se může za nativních podmínek vázat na stejné místo TRPA1 receptoru, ze kterého je komplex Ca²⁺/kaldmodulin uvolněn v závislosti na hladině intracelulární koncentrace Ca²⁺ (Obr. 48 uprostřed).

Pro zachování podmínek blízkých nativnímu prostředí byla elektrofyziologická měření prováděna na F11 buněčných liniích, které jsou hybridními somatickými buňkami embryonálních potkaních zadních kořenů míšních a myších neuroblastomů. Výhodou tohoto expresního systému je, že neexprimuje TRPA1 ani TRPV1 receptory a umožňuje tak sledovat aktivitu heterologně exprimovaného TRPA1 nezávisle na TRPV1. Předpokládali jsme, že pokud Ca²⁺/kaldmodulin kompetuje s PIP₂ o stejné vazebné místo, měla by nitrobuněčná 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 Ca²⁺/kaldmodulinu (89), ale také PIP₂. Účinek zvýšení intracelulárního množství peptidů by měl být závislý na nitrobuněčné koncentraci Ca²⁺ (Obr. 48 vpravo).



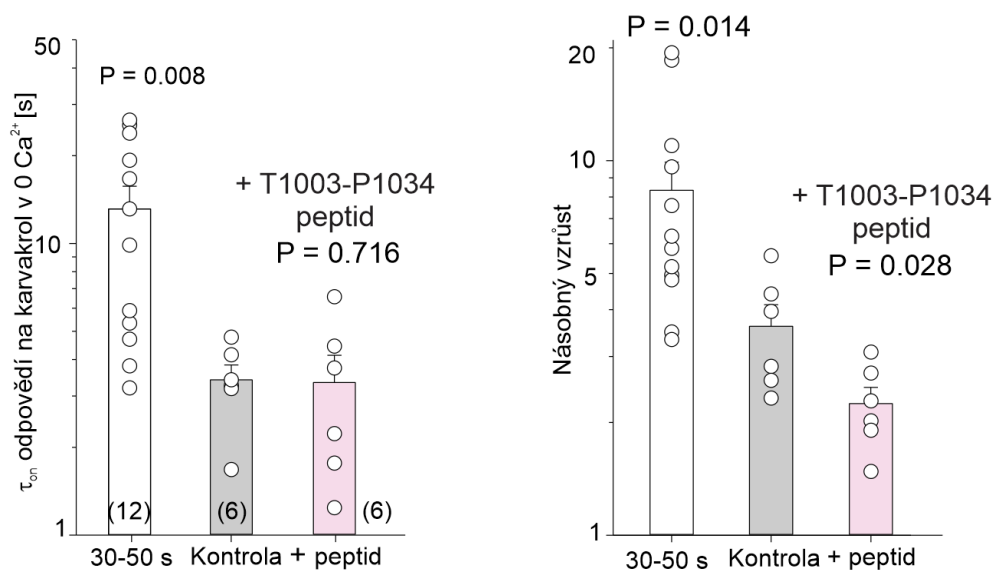
Obr.48: Schéma navrhovaného mechanismu kompetice kaldmodulinu (CaM) s PIP₂ o vazebné místo na TRPA1 receptoru a dominantně negativními peptidy (červená). Vlevo, komplex Ca²⁺/kaldmodulin se váže v oblasti receptoru L992-L1008 (89) potencuje kanál při klidovém membránovém napětí. Uprostřed, komplex Ca²⁺/kaldmodulin je uvolněn díky vychytání Ca²⁺ chelátory v intracelulárním prostředí a PIP₂ se naváže na stejné vazebné místo. Vpravo, navýšení intracelulárního množství peptidů vychytá PIP₂ a CaM a tím potlačí jejich regulační vliv na receptor.

Cílem experimentů bylo: a) zobecnit dříve publikovaná pozorování, že Ca^{2+} /kaldmodulin dependentní potenciaci myšního ortologu TRPA1 lze zabránit přidáním dominantně negativního peptidu L992-1008 do intracelulárního roztoku (89), b) zjistit, zda perfúze peptidu T1003-P1034 bude mít podobný dominantně-negativní účinek na funkci receptoru a c) ověřit hypotézu, že PIP_2 kompetuje o vazebné místo s Ca^{2+} /kaldmodulin komplexem a zjistit funkční účinky vazby na stabilitu/citlivost kanálu za podmínek blízkých fyziologickým. Snímali jsme membránové proudy vyvolané agonistou TRPA1 karvakrolem (100 μM) ve třech různých typech experimentů: a) 30-50 s po protržení membrány, b) po 5-6 min perfúze intracelulárním roztokem, c) po 5-6 min perfúze intracelulárním roztokem s obsahem peptidu L992-1008 nebo T1003-P1034 (Obr. 49). Analyzována byla míra potenciace odpovědi při zvýšení extracelulární koncentrace vápenatých iontů z 0 na 500 μM .



Obr.49: Reprezentativní záznamy naměřené z F11 buněk exprimujících lidský TRPA1. Buňky byly vystavené karvakrolu (100 μM) v absenci a v přítomnosti (500 μM) extracelulárního vápníku ve třech experimentálních uspořádáních. Vlevo, záznam pořízený 30-50 s po protržení buňky; uprostřed, záznam pořízený po 5-6 min perfúze intracelulárním roztokem. Vpravo, záznam pořízený po 5-6 min perfúze intracelulárním roztokem s obsahem peptidu T1003-P1034 (nahore) a L992-1008 (dole).

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 (Obr. 50 vlevo). Na konci 10s aplikace byla amplituda odpovědi na karvakrol statisticky významně nižší u kontrolních buněk (median 8.5 $\text{pA}\cdot\text{pF}^{-1}$; $n = 12$) oproti buňkám snímaným s intracelulárním roztokem obsahujícím peptid T1003-P1034 (median 18.7 $\text{pA}\cdot\text{pF}^{-1}$; $n = 6$, $P = 0.044$). Přidání 500 μM Ca^{2+} do extracelulárního roztoku zvýšilo přibližně 8-krát odpověď snímanou 30-50 s po protržení buňky (Obr. 50 vpravo).



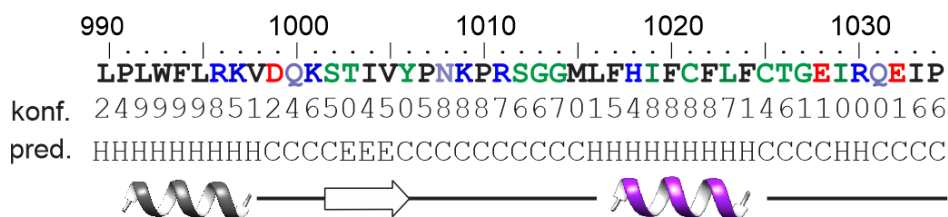
Obr.50: Statistické vyhodnocení proudových odpovědí TRPA1 měřených z F11 buněk. Vlevo, sloupcové grafy hodnot průměrných časových konstant τ_{on} aktivace TRPA1 karvakrolem (100 μ M) měřených v prostředí bez vápenatých iontů. Konstanty byly získány aproximací aktivační fáze odpovědi monoexponenciální křivkou na obrázku 49 znázorněnou šedou přerušovanou čarou. Pravděpodobnost statistické významnosti (P) vyznačená nad sloupcovými grafy byla určena pomocí t-testu. V závorkách je počet buněk. Vpravo, souhrnný graf hodnot relativní míry potenciace TRPA1 odpovědí extracelulárním Ca^{2+} (500 μ M). Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SEM.

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 ($P = 0.028$, $n = 6$) snížila míru potenciace TRPA1 vyvolané vápenatými ionty, obdobně jako bylo již dříve popsáno u peptidu L992-N1008 (89).

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 Ca^{2+} /kalmodulin může účinně kompetovat o stejné (nebo částečně se překrývající) vazebné místo s PIP_2 .

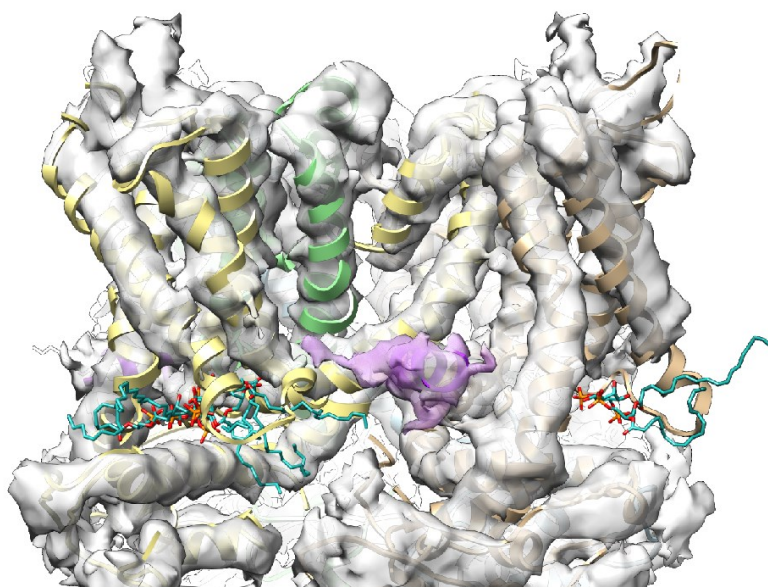
4.3.3 Změny ve struktuře receptoru vyvolané přítomností PIP_2

Dostupná struktura TRPA1 receptoru není doposud zcela rozlišena v oblasti Y1006-Q1031. Pomocí serveru PSIPRED (165) byla predikována sekundární struktura této části receptoru. Predikce s vysokou jistotou určila helikální charakter oblasti F1017-L1023 peptidu T1003-P1034 (Obr. 51). V další části práce jsme se spektroskopickou metodou cirkulárního dichroizmu pokusili odhalit sekundární strukturu této doposud nerozlišené části receptoru.



Obr.51: Predikovaná sekundární struktura nerozlišené oblasti TRPA1 receptoru s uvedenou konfidenčí předpovědi pro jednotlivá aminokyseliny. Určitost je v rozmezí hodnot od 0 po 9. Helix (H), coil (C), strand (E).

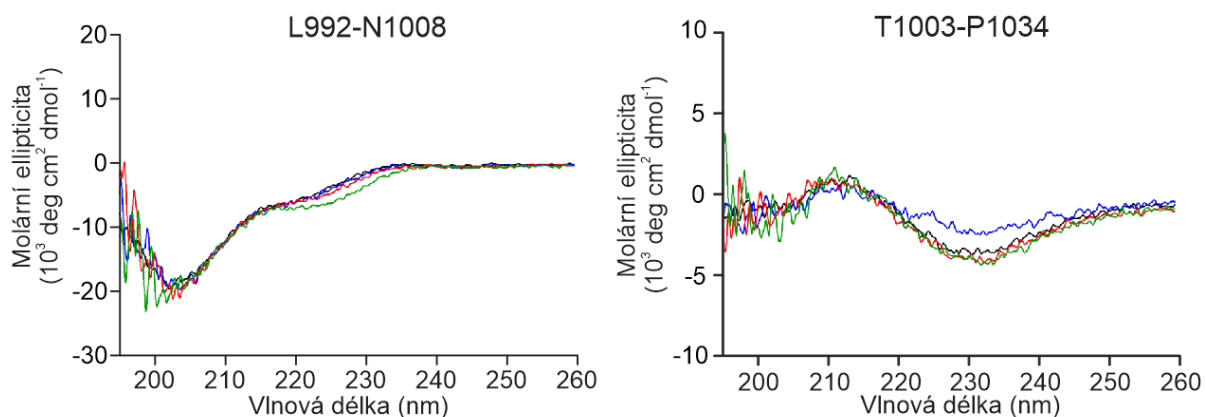
Z Coulombovy hustoty TRPA1 získané pomocí kryoelektronové mikroskopie je patrné, že oblast T1003-P1034 je, pravděpodobně díky své flexibilitě, nerozlišená až na krátký helix (fialová oblast na Obr. 52). Do obrázku 52 byly pomocí dokovacího experimentu (software AutoDock Vina) vloženy do míst pravděpodobné interakce s receptorem molekuly PIP₂. Je zřejmé, že struktura nerozlišené části receptoru by mohla být s PIP₂ v kontaktu. Jejich vzájemné strukturní ovlivnění bylo předmětem dalších experimentů.



Obr.52: Model části TRPA1 receptoru vytvořený na základě Coulombovy hustoty získané pomocí kryoelektronové mikroskopie s dokovanými molekulami PIP₂. Model vytvořený na základě cryo-EM struktury s Coulombovou hustotou vyznačenou světle šedě, fialově je znázorněna elektronová hustota části receptoru s predikovanou helikální oblastí. Molekuly PIP₂ s naznačením potenciálních interakčních míst s receptorem, polární hlavičky PIP₂ jsou červené, nepolární části modré.

Se záměrem potvrdit sekundární strukturu nerozlišené části receptoru a objasnit její změny v přítomnosti PIP₂ byly peptidy podrobeny spektroskopickým experimentům cirkulárního dichroizmu. Ze získaných dat lze usoudit, že oba peptidy jsou vysoce nestrukturované se zastoupením β -skládaného listu (Obr. 53 a Tab. 8). 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/PIP₂ (5% a 20% PIP₂) v poměrech v rozsahu 1/50 až 1/10 P/L.



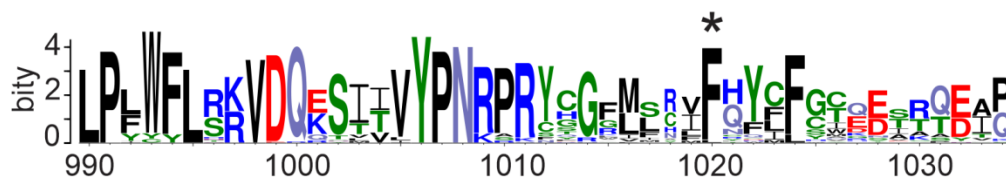
Obr.53: Sekundární struktura peptidů získaná cirkulárním dichroizmem. Barevně jsou znázorněny křivky pro jednotlivé peptidy v pufru (černá), po inkubaci s lipozomy o složení POPC (modrá), POPC/PIP₂ v zastoupení 5 % PIP₂ (červená) a 20 % PIP₂ (zelená) při poměrech P/L 1/10 až 1/50.

Tab.8: Zastoupení sekundárních struktur u peptidů L992-N1008 a T1003-P1034 určené pomocí cirkulárního dichroizmu v prostředí pufru, POPC a POPC/PIP₂ (5 % a 20 % PIP₂). Obsah zastoupení sekundárních struktur byl získán z dat pomocí softwaru BeStSel.

Sekundární struktura	L992-N1008				T1003-P1034			
	Pufr	POPC	5% PIP ₂	20% PIP ₂	Pufr	POPC	5% PIP ₂	20% PIP ₂
α-helix	6.4	3.1	6.9	6.9	1.0	0.9	1.1	0.8
Antiparalelní β-skládaný list	30.2	27.5	26.2	30.1	33.9	34.2	33.0	31.5
Paralelní β-skládaný list	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Otočka	15.3	15.4	15.3	15.3	16.5	16.1	16.4	17.0
Neuspořádaná struktura	48.1	54.1	51.7	47.7	48.6	48.9	49.5	50.8

4.3.4 Konzervovaný F1020 přispívá ke stabilizaci vrátek TRPA1

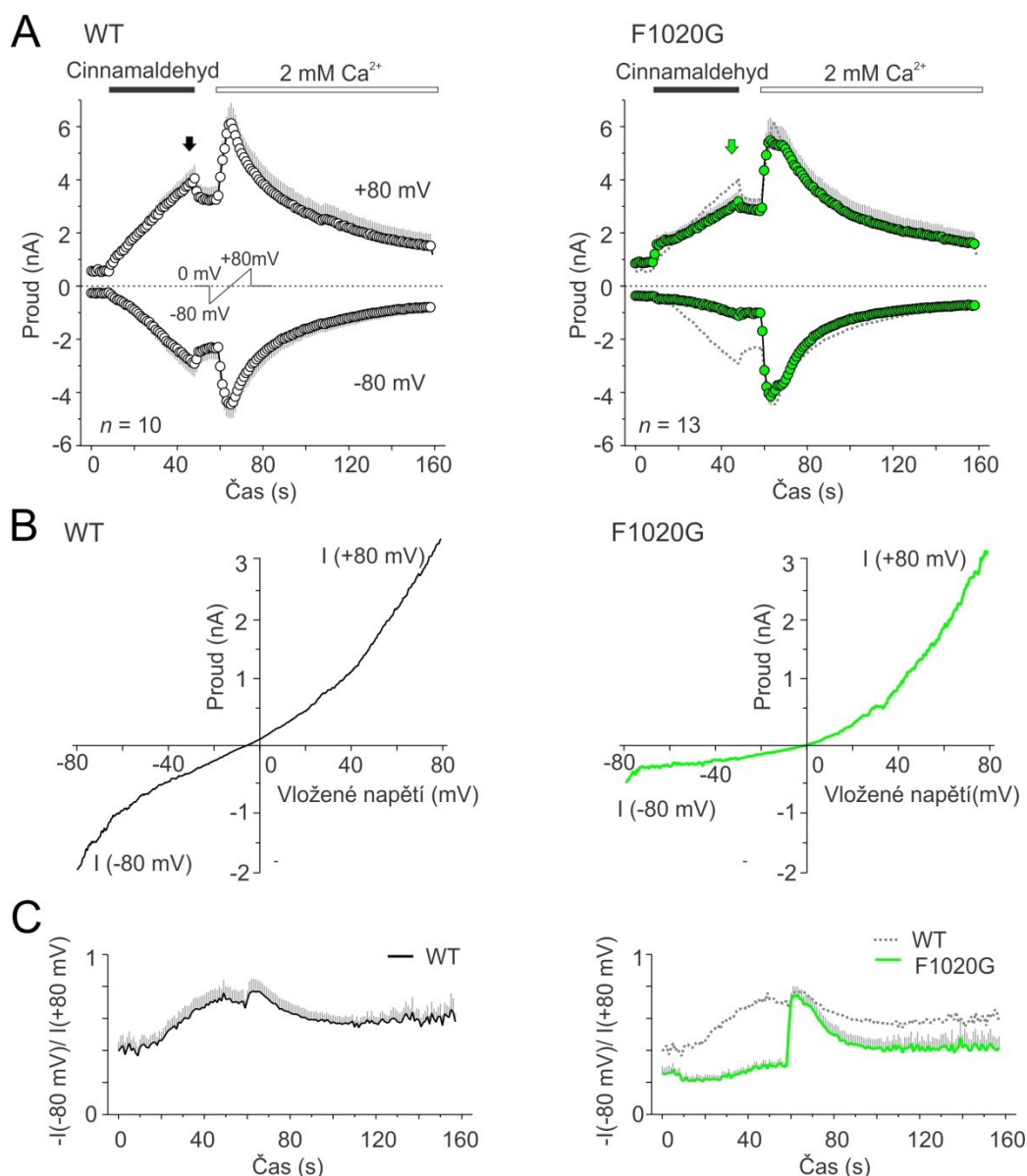
Z porovnání sekvencí oblasti proximálního C-konce TRPA1 proteinu 65 různých druhů obratlovců je patrná vysoká konzervovanost fenyloalaninu F1020 (Obr. 54, vyznačeny hvězdičkou). Tento aminokyselinový zbytek je situován v centrální části určeného krátkého helikálního úseku, který je v těsné (~5 Å) blízkosti funkčně důležitých oblastí receptoru: páté transmembránové domény (R875) a S2-S3 klíčky (F800 a M801).



Obr.54: Konzervovanost aminokyselinových reziduí z oblasti proximálního C-konce TRPA1 sestavená na základě sekvencí TRPA1 proteinu 65 různých druhů obratlovců. Logo bylo vygenerované za použití serveru WebLogo (157). Výška každého rezidua zobrazuje pravděpodobnost výskytu aminokyseliny na dané pozici. Reziduum F1020 (označené hvězdičkou) je druhově konzervované.

Konzervovaný fenylalanin 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 μ M) aplikovaným v extracelulárním roztoku bez vápenatých iontů a poté byl aplikován extracelulární roztok obsahující 2 mM Ca^{2+} (Obr. 55). Na buňky byl současně aplikován frekvencí 1 Hz 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 usměrnění proudů měřených bez přítomnosti Ca^{2+} na záporných potenciálech, jak je patrné z proudově-napěťové charakteristiky vyhodnocené po 30 s od počátku aplikace agonisty (Obr. 55 A a B) a z časového průběhu rektifikačního poměru měřeného při potenciálech -80 mV a 80 mV (Obr. 55 C). U konstruktu F1020G dosahoval průměrný proud na záporných membránových potenciálech třetinové hodnoty proudu oproti kanálu přirozeného typu (-1.0 ± 0.1 nA oproti -2.9 ± 0.5 nA pro WT, $P \leq 0.001$; $n = 13$ a 10). V extracelulárním roztoku obsahujícím 2 mM Ca^{2+} se amplitudy proudů F1020G nelišily od proudů zprostředkovaných kanály přirozeného typu (-4.0 ± 0.5 nA oproti -4.4 ± 0.5 nA při napětí -80 mV; $P = 0.554$; a 5.6 ± 0.7 oproti 6.1 ± 0.8 nA při napětí +80 mV; $P = 0.637$; $n = 13$ a 10).

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 subsaturující koncentrace agonistů, nebo při změnách redukční/oxidační rovnováhy).



Obr.55: Mutace F1020G ovlivňuje aktivaci TRPA1 vyvolanou chemicky a napětím.

A, Průměrné proudy vyvolané 100 μ M cinnamaldehydem snímané v režimu z celé buňky technikou patch-clamp z HEK293T exprimujících TRPA1 v prostředí bez Ca²⁺ a poté v 2mM Ca²⁺, měřené při lineárně rostoucím napětí od -80 do +80 mV rychlostí 1 V.s⁻¹. 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-napěťová charakteristika vynesena v časech vyznačených šipkami v A (černá pro WT vlevo, zeleně F1020G vpravo). C, Časový průběh relativního poměru amplitud proudů zaznamenaných na -80 mV a +80 mV. SEM jsou vyznačeny jako vertikální čáry. Šedou přerušovanou čarou je zobrazen pro porovnání průměrný časový průběh relativního poměru proudů přirozeného typu TRPA1.

5 Diskuze

5.1 Mechanizmy teplotní aktivace TRPV3

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 agonistou 2-APB vzájemně posunují (137). 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 (166), ve které byly identifikovány interakce mezi rezidui 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 repetitiv jsou nutné dvě až tři konsensuální sekvence a při porušení sekvence může dojít ke změně vedení signálu v rámci ankyrinové domény jako celku (162, 167). Funkční změny způsobené mutacemi v našem případě pravděpodobně nejsou způsobeny narušením sbalení ankyrinových repetitiv, 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 (56, 168-172) a bylo odhaleno několik domén podléhajících konformačním změnám vlivem teplotní stimulace. Bylo navrženo několik možných mechanismů teplotní aktivace. Podle jedné z teorií (171) je kanál teplotně otevřen poté, co se série konformačních změn vyvolaných teplotním působením přenesou z periferních částí receptoru až do oblasti póru kanálu. Předpovídané 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 TRPV3 v otevřeném a v zavřeném stavu (137). Podle této struktury je konformace extracelulárního S1-S2 raménka závislá na výskytu lipidů, přičemž S2-S3 raménko je v přímém kontaktu s TRP-doménou a membránovou proximální doménou u vrátek. Tento model není v rozporu s dalším předpokládaným mechanismem založeným na vytlačení fosfatidylinositolů z vazebných míst pro vaniloidy nacházejících se v oblasti segmentů S3 a S4, raménka S4-S5 jedné podjednotky a transmembránových domén S5-S6 podjednotky vedlejší (56, 173). Kromě toho může mít vliv na stabilitu konformace kanálu v jeho vodivém stavu také hydratace póru (149).

U TRPV1 kanálu byly pomocí modelování za zvýšených teplot (60 °C a 72 °C) odhaleny kontakty mezi třemi dvojicemi reziduí z ARD a MPD, které při teplotě 30 °C v kontaktu nebyly pozorovány (171). Tato rezidua jsou u myšského 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 β -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 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 (34), naše výsledky však nenasvědčují přímé interakci centrální části třetí smyčky s MPD.

5.2 Funkční regulace TRPV3 kanálu fosforylací

Studie, ve které jsme určovali hlavní fosforylační místo TRPV3 pro ERK1/2 kinázu, vycházela z původního pozorování Cheng a kol. (109), 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 aplikací inhibitorů MEK (U0126, PD98059), která je součástí MAPK kaskády. Dále se nám podařilo ukázat, že v prostředí prostém Ca^{2+} tyto inhibitory zcela brání potenciaci vyvolané EGFR, 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 lokalizováno 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 (156), regulace prostřednictvím tohoto rezidua je nejspíše specifická pro TRPV3.

Autoři krystalové struktury ARD domény TRPV3 (156) 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 (104, 105) 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 (156) 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 (174), ještě více podporuje naši představu o souvislostech buněčných signalizačních drah zapojených v udržení kožní homeostáze.

5.3 Úloha membránových fosfolipidů v regulaci TRPA1

Přestože literatura zabývající se určením úlohy PIP₂ v regulaci TRPA1 je rozsáhlá, není dosud jednotný názor, zda fosfoinositidy jsou pro funkci TRPA1 nezbytné (51), zda je TRPA1 fosfoinositidy inhibován (65, 90, 175), aktivován (176) či jimi není vůbec regulován (177).

Obecně je známo, že záporně nabitě fosfoinositidy se k proteinům vážou pomocí elektrostatických interakcí v oblastech s kladně nabitým řetězcem. Na TRPA1 bylo navrženo mnoho možných interakčních míst pro fosfoinositidy (163, 164, 176, 178). Konkrétně pro vazbu PIP₂ 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) (176). Podle funkčních studií provedených v minulosti naším týmem (163, 179) a z dostupných strukturních studií (5) se z tohoto hlediska jeví C-konec jako velmi pravděpodobná regulační oblast TRPA1. Witschas *a kol.* (164) zmapovali C-konec TRPA1 proteinu za použití speciálního bioinformatického přístupu, AntiBP Serveru.

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 různých savců.

V rámci studie se nám podařilo dokázat, že pro interakci sekvencí L992-N1008 a T1003-P1034 s membránovými fosfolipidy je nezbytná přítomnost PIP₂. 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 Ca²⁺/kalmmodulin, které bylo u TRPA1 kanálu v nedávné době identifikováno (89). Je známé, že častým mechanismem regulace kanálů je kompetice PIP₂ a kalmodulinu, ke kterému dochází u TRPV1 (180) nebo jiných iontových kanálů, jako u draslíkových napětově závislých kanálů typu Kv7 (181). 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 PIP₂ s klesající afinitou v přítomnosti vápenatých iontů Ca²⁺. Bylo prokázáno, že aktivita TRPA1 kanálu je zvyšována nízkými koncentracemi Ca²⁺ a naopak snižována vysokými koncentracemi Ca²⁺ (89, 177) a oba procesy závisí na vazbě Ca²⁺/kalmodulinu. Naše výsledky ukazují, že při snížení koncentrace Ca²⁺ pod bazální úroveň se zvyšuje zjevná afinita kanálu

k neelektrofilnímu agonistovi karvakrolu (Obr. 49 vlevo a vpravo). Usuzujeme, že PIP₂ by na TRPA1 mohl za bazálních koncentrací Ca²⁺ kompetovat o vazebné místo pro Ca²⁺/kalmodulin. 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 PIP₂ relevantní? V našich experimentech (182) záměna histidinu 1018 za arginin zvýšila afinitu TRPA1 kanálu k PIP₂ 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 alodynii 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 (82). Také metabolit nejčastěji používaného analgetika paracetamolu *N*-acetyl-*p*-benzochinonimin, NAPQI, aktivuje a následně funkčně desenzibilizuje TRPA1 (183). 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 (obrné) 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.

6 Závěr

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 peptidergických sensorických neuronů. Je také citlivým senzorem reaktivních forem kyslíku v endoteliálních buňkách uplatňujících 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.

Literatura

1. Cosens DJ, Manning A (1969) Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 224: 285-7.
2. Montell C, Rubin GM (1989) Molecular characterization of the *Drosophila* *trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2: 1313-23.
3. Blair NT, Carvacho I, Chaudhuri D, Clapham DE, DeCaen P, Doerner JF, Fan L, Jordt SE, Julius D, Kahle KT, Liu B, McKemy D, Nilius B, Oancea E, Owsianik G, Riccio A, Sah R, Stotz SC, Tong D, Wu L-J, Xu H. Transient Receptor Potential channels. *IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY*
4. Akopian AN (2011) Regulation of nociceptive transmission at the periphery via TRPA1-TRPV1 interactions. *Curr Pharm Biotechnol* 12: 89-94.
5. Paulsen CE, Armache JP, Gao Y, Cheng Y, Julius D (2015) Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. *Nature* 520: 511-7.
6. Ramsey IS, Delling M, Clapham DE (2006) An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol* 68: 619-47.
7. Latorre R, Zaelzer C, Brauchi S (2009) Structure-functional intimacies of transient receptor potential channels. *Q Rev Biophys* 42: 201-46.
8. Venkatachalam K, Montell C (2007) TRP channels. *Annu Rev Biochem* 76: 387-417.
9. Gregorio-Teruel L, Valente P, Gonzalez-Ros JM, Fernandez-Ballester G, Ferrer-Montiel A (2014) Mutation of I696 and W697 in the TRP box of vanilloid receptor subtype I modulates allosteric channel activation. *J Gen Physiol* 143: 361-75.
10. Phelps CB, Wang RR, Choo SS, Gaudet R (2010) Differential regulation of TRPV1, TRPV3, and TRPV4 sensitivity through a conserved binding site on the ankyrin repeat domain. *Journal of Biological Chemistry* 285: 731-40.
11. Walker RG, Willingham AT, Zuker CS (2000) A *Drosophila* mechanosensory transduction channel. *Science* 287: 2229-34.
12. Laing RJ, Dhaka A (2016) ThermoTRPs and Pain. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 22: 171-87.
13. Minke B (2010) The history of the *Drosophila* TRP channel: the birth of a new channel superfamily. *Journal of neurogenetics* 24: 216-33.
14. Nilius B (2007) TRP channels in disease. *Biochim Biophys Acta* 1772: 805-12.
15. Nilius B, Szallasi A (2014) Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine. *Pharmacological Reviews* 66: 676-814.
16. Gees M, Colsoul B, Nilius B (2010) The role of transient receptor potential cation channels in Ca²⁺ signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2: a003962.
17. Moran MM, Szallasi A (2017) Targeting nociceptive transient receptor potential channels to treat chronic pain: current state of the field. *British Journal of Pharmacology*
18. Rokyta R. 2012. In *Bolest Monografie algeziologie*, ed. R Rokyta, M Kršiak, J Kozák, pp. 66-7. Praha: Tigris s.r.o.
19. Nilius B, Owsianik G (2010) Transient receptor potential channelopathies. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 460: 437-50.
20. Smani T, Shapovalov G, Skryma R, Prevarskaya N, Rosado JA (2015) Functional and physiopathological implications of TRP channels. *Biochimica et Biophysica Acta* 1853: 1772-82.
21. Shapovalov G, Ritaine A, Skryma R, Prevarskaya N (2016) Role of TRP ion channels in cancer and tumorigenesis. *Seminars in immunopathology* 38: 357-69.
22. Li L, Rutlin M, Abaira VE, Cassidy C, Kus L, Gong S, Jankowski MP, Luo W, Heintz N, Koerber HR, Woodbury CJ, Ginty DD (2011) The functional organization of cutaneous low-threshold mechanosensory neurons. *Cell* 147: 1615-27.
23. Ju G, Hokfelt T, Brodin E, Fahrenkrug J, Fischer JA, Frey P, Elde RP, Brown JC (1987) Primary sensory neurons of the rat showing calcitonin gene-related peptide immunoreactivity and their relation to substance P-, somatostatin-, galanin-, vasoactive intestinal polypeptide- and cholecystokinin-immunoreactive ganglion cells. *Cell and tissue research* 247: 417-31.

24. Wang H, Rivero-Melian C, Robertson B, Grant G (1994) Transganglionic transport and binding of the isolectin B4 from *Griffonia simplicifolia* I in rat primary sensory neurons. *Neuroscience* 62: 539-51.
25. Meyer RA, Ringkamp M, Campbell JN, Raja SN. 2006. In *McMahon SB, Koltzenburg M, Eds. Wall and Melzack's Textbook of Pain*, pp. 3-34. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone
26. Willis WD, Jr. (2007) The somatosensory system, with emphasis on structures important for pain. *Brain research reviews* 55: 297-313.
27. Mishra SK, Tisel SM, Orestes P, Bhangoo SK, Hoon MA (2011) TRPV1-lineage neurons are required for thermal sensation. *EMBO Journal* 30: 582-93.
28. Usoskin D, Furlan A, Islam S, Abdo H, Lonnerberg P, Lou D, Hjerling-Leffler J, Haeggstrom J, Kharchenko O, Kharchenko PV, Linnarsson S, Ernfors P (2015) Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. *Nature Neuroscience* 18: 145-53.
29. Li CL, Li KC, Wu D, Chen Y, Luo H, Zhao JR, Wang SS, Sun MM, Lu YJ, Zhong YQ, Hu XY, Hou R, Zhou BB, Bao L, Xiao HS, Zhang X (2016) Somatosensory neuron types identified by high-coverage single-cell RNA-sequencing and functional heterogeneity. *Cell Research* 26: 83-102.
30. Cobos EJ, Nickerson CA, Gao F, Chandran V, Bravo-Caparros I, Gonzalez-Cano R, Riva P, Andrews NA, Latremoliere A, Seehus CR, Perazzoli G, Nieto FR, Joller N, Painter MW, Ma CHE, Omura T, Chesler EJ, Geschwind DH, Coppola G, Rangachari M, Woolf CJ, Costigan M (2018) Mechanistic Differences in Neuropathic Pain Modalities Revealed by Correlating Behavior with Global Expression Profiling. *Cell reports* 22: 1301-12.
31. Yin K, Baillie GJ, Vetter I (2016) Neuronal cell lines as model dorsal root ganglion neurons: A transcriptomic comparison. *Molecular pain* 12
32. Voets T (2012) Quantifying and Modeling the Temperature-Dependent Gating of TRP Channels. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*
33. Vriens J, Nilius B, Voets T (2014) Peripheral thermosensation in mammals. *Nature reviews. Neuroscience* 15: 573-89.
34. Liu B, Qin F (2017) Single-residue molecular switch for high-temperature dependence of vanilloid receptor TRPV3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114: 1589-94.
35. Tan C-H, McNaughton PA (2016) The TRPM2 ion channel is required for sensitivity to warmth. *Nature* 536: 460-3.
36. Zhang F, Hanson SM, Jara-Oseguera A, Krepiy D, Bae C, Pearce LV, Blumberg PM, Newstead S, Swartz KJ (2016) Engineering vanilloid-sensitivity into the rat TRPV2 channel. *eLife* 5
37. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816-24.
38. Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D (1999) A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398: 436-41.
39. Xu H, Ramsey IS, Kotecha SA, Moran MM, Chong JA, Lawson D, Ge P, Lilly J, Silos-Santiago I, Xie Y, DiStefano PS, Curtis R, Clapham DE (2002) TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* 418: 181-6.
40. Peier AM, Reeve AJ, Andersson DA, Moqrich A, Earley TJ, Hergarden AC, Story GM, Colley S, Hogenesch JB, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A (2002) A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science* 296: 2046-9.
41. Liedtke W, Choe Y, Marti-Renom MA, Bell AM, Denis CS, Sali A, Hudspeth AJ, Friedman JM, Heller S (2000) Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell* 103: 525-35.
42. Guler AD, Lee H, Iida T, Shimizu I, Tominaga M, Caterina M (2002) Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *J Neurosci* 22: 6408-14.
43. Vriens J, Owsianik G, Hofmann T, Philipp SE, Stab J, Chen X, Benoit M, Xue F, Janssens A, Kerselaers S, Oberwinkler J, Vennekens R, Gudermann T, Nilius B, Voets T (2011) TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat. *Neuron* 70: 482-94.
44. McKemy DD, Neuhauser WM, Julius D (2002) Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416: 52-8.

45. Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A (2003) ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112: 819-29.
46. Talavera K, Yasumatsu K, Voets T, Droogmans G, Shigemura N, Ninomiya Y, Margolskee RF, Nilius B (2005) Heat activation of TRPM5 underlies thermal sensitivity of sweet taste. *Nature* 438: 1022-5.
47. Zimmermann K, Lennerz JK, Hein A, Link AS, Kaczmarek JS, Delling M, Uysal S, Pfeifer JD, Riccio A, Clapham DE (2011) Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 5 (TRPC5) is a cold-transducer in the peripheral nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 18114-9.
48. Kim SE, Patapoutian A, Grandl J (2013) Single residues in the outer pore of TRPV1 and TRPV3 have temperature-dependent conformations. *PLoS One* 8: e59593.
49. Moran MM (2018) TRP Channels as Potential Drug Targets. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 58: 309-30.
50. Yao J, Liu B, Qin F (2010) Kinetic and energetic analysis of thermally activated TRPV1 channels. *Biophys J* 99: 1743-53.
51. Moparthy L, Survery S, Kreir M, Simonsen C, Kjellbom P, Hogestatt ED, Johanson U, Zygmunt PM (2014) Human TRPA1 is intrinsically cold- and chemosensitive with and without its N-terminal ankyrin repeat domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 16901-6.
52. Cao E, Cordero-Morales JF, Liu B, Qin F, Julius D (2013) TRPV1 channels are intrinsically heat sensitive and negatively regulated by phosphoinositide lipids. *Neuron* 77: 667-79.
53. Jabba S, Goyal R, Sosa-Pagan JO, Moldenhauer H, Wu J, Kalmeta B, Bandell M, Latorre R, Patapoutian A, Grandl J (2014) Directionality of temperature activation in mouse TRPA1 ion channel can be inverted by single-point mutations in ankyrin repeat six. *Neuron* 82: 1017-31.
54. Yao J, Liu B, Qin F (2011) Modular thermal sensors in temperature-gated transient receptor potential (TRP) channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 11109-14.
55. Grandl J, Hu H, Bandell M, Bursulaya B, Schmidt M, Petrus M, Patapoutian A (2008) Pore region of TRPV3 ion channel is specifically required for heat activation. *Nature Neuroscience* 11: 1007-13.
56. Gao Y, Cao E, Julius D, Cheng Y (2016) TRPV1 structures in nanodiscs reveal mechanisms of ligand and lipid action. *Nature* 534: 347-51.
57. Brauchi S, Orto P, Latorre R (2004) Clues to understanding cold sensation: thermodynamics and electrophysiological analysis of the cold receptor TRPM8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 15494-9.
58. Vlachova V, Teisinger J, Sušánková K, Lyfenko A, Ettrich R, Vyklický L (2003) Functional role of C-terminal cytoplasmic tail of rat vanilloid receptor 1. *J Neurosci* 23: 1340-50.
59. Brauchi S, Orta G, Salazar M, Rosenmann E, Latorre R (2006) A hot-sensing cold receptor: C-terminal domain determines thermosensation in transient receptor potential channels. *J Neurosci* 26: 4835-40.
60. Zhang F, Jara-Oseguera A, Chang TH, Bae C, Hanson SM, Swartz KJ (2018) Heat activation is intrinsic to the pore domain of TRPV1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115: E317-E24.
61. Clapham DE, Miller C (2011) A thermodynamic framework for understanding temperature sensing by transient receptor potential (TRP) channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 19492-7.
62. Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Hogestatt ED, Meng ID, Julius D (2004) Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 427: 260-5.
63. Nilius B, Appendino G, Owsianik G (2012) The transient receptor potential channel TRPA1: from gene to pathophysiology. *Pflugers Archiv (European Journal of Physiology)* 464: 425-58.
64. Laursen WJ, Bagriantsev SN, Gracheva EO (2014) TRPA1 channels: chemical and temperature sensitivity. *Curr Top Membr* 74: 89-112.

65. Dai Y, Wang S, Tominaga M, Yamamoto S, Fukuoka T, Higashi T, Kobayashi K, Obata K, Yamanaka H, Noguchi K (2007) Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. *J Clin Invest* 117: 1979-87.
66. Madej MG, Ziegler CM (2018) Dawning of a new era in TRP channel structural biology by cryo-electron microscopy. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 470: 213-25.
67. Zygmunt PM, Hogestatt ED (2014) Trpa1. *Handbook of Experimental Pharmacology* 222: 583-630.
68. Bahia PK, Parks TA, Stanford KR, Mitchell DA, Varma S, Stevens SM, Jr., Taylor-Clark TE (2016) The exceptionally high reactivity of Cys 621 is critical for electrophilic activation of the sensory nerve ion channel TRPA1. *The Journal of general physiology* 147: 451-65.
69. Baraldi PG, Preti D, Materazzi S, Geppetti P (2010) Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) Channel as Emerging Target for Novel Analgesics and Anti-Inflammatory Agents. *J Med Chem* 53: 5085-107.
70. Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian A (2004) Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* 41: 849-57.
71. Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, Yamoah EN, Basbaum AI, Julius D (2006) TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 124: 1269-82.
72. Nassini R, Materazzi S, Vriens J, Prenen J, Benemei S, De Siena G, la Marca G, Andre E, Preti D, Avonto C, Sadofsky L, Di Marzo V, De Petrocellis L, Dussor G, Porreca F, Tagliatalata-Scafati O, Appendino G, Nilius B, Geppetti P (2012) The 'headache tree' via umbellulone and TRPA1 activates the trigeminovascular system. *Brain : a journal of neurology* 135: 376-90.
73. Benemei S, Fusi C, Trevisan G, Geppetti P (2014) The TRPA1 channel in migraine mechanism and treatment. *British Journal of Pharmacology* 171: 2552-67.
74. Materazzi S, Benemei S, Fusi C, Gualdani R, De Siena G, Vastani N, Andersson DA, Trevisan G, Moncelli MR, Wei X, Dussor G, Pollastro F, Patacchini R, Appendino G, Geppetti P, Nassini R (2013) Parthenolide inhibits nociception and neurogenic vasodilatation in the trigeminovascular system by targeting the TRPA1 channel. *Pain* 154: 2750-8.
75. Ton HT, Phan TX, Abramyan AM, Shi L, Ahern GP (2017) Identification of a putative binding site critical for general anesthetic activation of TRPA1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114: 3762-7.
76. Vlachova V, Macikova L, Barvikova K (2018) Mustard Receptor as a Target for Paracetamol. *Bolest* 21: 8.
77. Mukhopadhyay I, Gomes P, Aranake S, Shetty M, Karnik P, Damle M, Kuruganti S, Thorat S, Khairatkar-Joshi N (2011) Expression of functional TRPA1 receptor on human lung fibroblast and epithelial cells. *Journal of Receptors and Signal Transduction* 31: 350-8.
78. Nassini R, Materazzi S, André E, Sartiani L, Aldini G, Trevisani M, Carnini C, Massi D, Pedretti P, Carini M, Cerbai E, Preti D, Villetti G, Civelli M, Trevisan G, Azzari C, Stokesberry S, Sadofsky L, McGarvey L, Patacchini R, Geppetti P (2010) Acetaminophen, via its reactive metabolite N-acetyl-p-benzo-quinoneimine and transient receptor potential ankyrin-1 stimulation, causes neurogenic inflammation in the airways and other tissues in rodents. *The FASEB Journal* 24: 4904-16.
79. Gallo V, Dijk FN, Holloway JW, Ring SM, Koppelman GH, Postma DS, Strachan DP, Granell R, de Jongste JC, Jaddoe VW, den Dekker HT, Duijts L, Henderson AJ, Shaheen SO (2017) TRPA1 gene polymorphisms and childhood asthma. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 28: 191-8.
80. Shaheen SO, Sterne JA, Songhurst CE, Burney PG (2000) Frequent paracetamol use and asthma in adults. *Thorax* 55: 266-70.
81. Ghanem CI, Perez MJ, Manautou JE, Mottino AD (2016) Acetaminophen from liver to brain: New insights into drug pharmacological action and toxicity. *Pharmacological Research* 109: 119-31.
82. De Logu F, Li Puma S, Landini L, Tuccinardi T, Poli G, Preti D, De Siena G, Patacchini R, Tzagareli MG, Geppetti P, Nassini R (2019) The acyl-glucuronide metabolite of ibuprofen has

- analgesic and anti-inflammatory effects via the TRPA1 channel. *Pharmacological research* 142: 127-39.
83. Kremeyer B, Lopera F, Cox JJ, Momin A, Rugiero F, Marsh S, Woods CG, Jones NG, Paterson KJ, Fricker FR, Villegas A, Acosta N, Pineda-Trujillo NG, Ramirez JD, Zea J, Burley MW, Bedoya G, Bennett DL, Wood JN, Ruiz-Linares A (2010) A gain-of-function mutation in TRPA1 causes familial episodic pain syndrome. *Neuron* 66: 671-80.
 84. Zima V, Witschas K, Hynkova A, Zimova L, Barvik I, Vlachova V (2015) Structural modeling and patch-clamp analysis of pain-related mutation TRPA1-N855S reveal inter-subunit salt bridges stabilizing the channel open state. *Neuropharmacology* 93: 294-307.
 85. Deering-Rice CE, Shapiro D, Romero EG, Stockmann C, Bevans TS, Phan QM, Stone BL, Fassl B, Nkoy F, Uchida DA, Ward RM, Veranth JM, Reilly CA (2015) Activation of Transient Receptor Potential Ankyrin-1 by Insoluble Particulate Material and Association with Asthma. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 53: 893-901.
 86. Vangeel L, Voets T (2019) Transient Receptor Potential Channels and Calcium Signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*
 87. Wang YY, Chang RB, Allgood SD, Silver WL, Liman ER (2011) A TRPA1-dependent mechanism for the pungent sensation of weak acids. *Journal of General Physiology* 137: 493-505.
 88. Schmidt M, Dubin AE, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian A (2009) Nociceptive signals induce trafficking of TRPA1 to the plasma membrane. *Neuron* 64: 498-509.
 89. Hasan R, Leeson-Payne AT, Jaggard JH, Zhang X (2017) Calmodulin is responsible for Ca²⁺-dependent regulation of TRPA1 Channels. *Scientific Reports* 7: 45098.
 90. Akopian AN, Ruparel NB, Jeske NA, Hargreaves KM (2007) Transient receptor potential TRPA1 channel desensitization in sensory neurons is agonist dependent and regulated by TRPV1-directed internalization. *J Physiol* 583: 175-93.
 91. Rohacs T (2015) Phosphoinositide regulation of TRPV1 revisited. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 467: 1851-69.
 92. Kim D, Cavanaugh EJ, Simkin D (2008) Inhibition of transient receptor potential A1 channel by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Am J Physiol Cell Physiol* 295: C92-9.
 93. Rohacs T (2014) Phosphoinositide regulation of TRP channels. *Handbook of Experimental Pharmacology* 223: 1143-76.
 94. Rohacs T (2013) Regulation of transient receptor potential channels by the phospholipase C pathway. *Advances in biological regulation* 53: 341-55.
 95. Rohacs T (2016) Phosphoinositide signaling in somatosensory neurons. *Advances in biological regulation* 61: 2-16.
 96. Kadkova A, Synytsya V, Krusek J, Zimova L, Vlachova V (2017) Molecular basis of TRPA1 regulation in nociceptive neurons. A review. *Physiological Research* 66: 425-39.
 97. Nilius B, Biro T (2013) TRPV3: a 'more than skinny' channel. *Exp Dermatol* 22: 447-52.
 98. Andersson DA, Chase HW, Bevan S (2004) TRPM8 activation by menthol, icilin, and cold is differentially modulated by intracellular pH. *J Neurosci* 24: 5364-9.
 99. Zhang F, Swartz KJ, Jara-Oseguera A (2019) Conserved allosteric pathways for activation of TRPV3 revealed through engineering vanilloid-sensitivity. *eLife* 8
 100. Catterall WA (2010) Ion channel voltage sensors: structure, function, and pathophysiology. *Neuron* 67: 915-28.
 101. Baez D, Raddatz N, Ferreira G, Gonzalez C, Latorre R (2014) Gating of thermally activated channels. *Current topics in membranes* 74: 51-87.
 102. Gaudet R (2008) A primer on ankyrin repeat function in TRP channels and beyond. *Mol Biosyst* 4: 372-9.
 103. Montell C (2001) Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2001: re1.
 104. Singh AK, McGoldrick LL, Sobolevsky AI (2018) Structure and gating mechanism of the transient receptor potential channel TRPV3. *Nature Structural & Molecular Biology*
 105. Zubcevic L, Herzik MA, Jr., Wu M, Borschel WF, Hirschi M, Song AS, Lander GC, Lee SY (2018) Conformational ensemble of the human TRPV3 ion channel. *Nature communications* 9: 4773.

106. Zhang X (2015) Targeting TRP ion channels for itch relief. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 388: 389-99.
107. Luo J, Hu H (2014) Thermally activated TRPV3 channels. *Current topics in membranes* 74: 325-64.
108. Broad LM, Mogg AJ, Eberle E, Tolley M, Li DL, Knopp KL (2016) TRPV3 in Drug Development. *Pharmaceuticals* 9
109. Cheng X, Jin J, Hu L, Shen D, Dong XP, Samie MA, Knoff J, Eisinger B, Liu ML, Huang SM, Caterina MJ, Dempsey P, Michael LE, Dlugosz AA, Andrews NC, Clapham DE, Xu H (2010) TRP channel regulates EGFR signaling in hair morphogenesis and skin barrier formation. *Cell* 141: 331-43.
110. Lin Z, Chen Q, Lee M, Cao X, Zhang J, Ma D, Chen L, Hu X, Wang H, Wang X, Zhang P, Liu X, Guan L, Tang Y, Yang H, Tu P, Bu D, Zhu X, Wang K, Li R, Yang Y (2012) Exome sequencing reveals mutations in TRPV3 as a cause of Olmsted syndrome. *American Journal of Human Genetics* 90: 558-64.
111. Lowry CA, Lightman SL, Nutt DJ (2009) That warm fuzzy feeling: brain serotonergic neurons and the regulation of emotion. *J Psychopharmacol* 23: 392-400.
112. Moussaieff A, Rimmerman N, Bregman T, Straiker A, Felder CC, Shoham S, Kashman Y, Huang SM, Lee H, Shohami E, Mackie K, Caterina MJ, Walker JM, Fride E, Mechoulam R (2008) Incensole acetate, an incense component, elicits psychoactivity by activating TRPV3 channels in the brain. *FASEB J* 22: 3024-34.
113. Asakawa M, Yoshioka T, Matsutani T, Hikita I, Suzuki M, Oshima I, Tsukahara K, Arimura A, Horikawa T, Hirasawa T, Sakata T (2006) Association of a mutation in TRPV3 with defective hair growth in rodents. *J Invest Dermatol* 126: 2664-72.
114. Smith GD, Gunthorpe MJ, Kelsell RE, Hayes PD, Reilly P, Facer P, Wright JE, Jerman JC, Walhin JP, Ooi L, Egerton J, Charles KJ, Smart D, Randall AD, Anand P, Davis JB (2002) TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature* 418: 186-90.
115. Lai-Cheong JE, Sethuraman G, Ramam M, Stone K, Simpson MA, McGrath JA (2012) Recurrent heterozygous missense mutation, p.Gly573Ser, in the TRPV3 gene in an Indian boy with sporadic Olmsted syndrome. *British Journal of Dermatology* 167: 440-2.
116. Borbiri I, Lisztes E, Toth BI, Czifra G, Olah A, Szollosi AG, Szentandrassy N, Nanasi PP, Peter Z, Paus R, Kovacs L, Biro T (2011) Activation of transient receptor potential vanilloid-3 inhibits human hair growth. *The Journal of investigative dermatology* 131: 1605-14.
117. Boukalova S, Marsakova L, Teisinger J, Vlachova V (2010) Conserved Residues within the Putative S4-S5 Region Serve Distinct Functions among Thermosensitive Vanilloid Transient Receptor Potential (TRPV) Channels. *J Biol Chem* 285: 41455-62.
118. Yoshioka T, Imura K, Asakawa M, Suzuki M, Oshima I, Hirasawa T, Sakata T, Horikawa T, Arimura A (2009) Impact of the Gly573Ser substitution in TRPV3 on the development of allergic and pruritic dermatitis in mice. *The Journal of investigative dermatology* 129: 714-22.
119. Hu HZ, Xiao R, Wang C, Gao N, Colton CK, Wood JD, Zhu MX (2006) Potentiation of TRPV3 channel function by unsaturated fatty acids. *J Cell Physiol* 208: 201-12.
120. Yoshida T, Inoue R, Morii T, Takahashi N, Yamamoto S, Hara Y, Tominaga M, Shimizu S, Sato Y, Mori Y (2006) Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. *Nature Chemical Biology* 2: 596-607.
121. Chung MK, Lee H, Mizuno A, Suzuki M, Caterina MJ (2004) 2-aminoethoxydiphenyl borate activates and sensitizes the heat-gated ion channel TRPV3. *J Neurosci* 24: 5177-82.
122. Nelson AM, Moayed Y, Greenberg SA, Ruiz ME, Jensen UB, Owens DM, Lumpkin EA (2018) 2-APB arrests human keratinocyte proliferation and inhibits cutaneous squamous cell carcinoma in vitro. *bioRxiv preprint*
123. Xu H, Dellling M, Jun JC, Clapham DE (2006) Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nat Neurosci* 9: 628-35.
124. Bang S, Yoo S, Yang TJ, Cho H, Hwang SW (2010) Farnesyl Pyrophosphate Is a Novel Pain-producing Molecule via Specific Activation of TRPV3. *Journal of Biological Chemistry* 285: 19362-71.
125. Moore C, Gupta R, Jordt SE, Chen Y, Liedtke WB (2018) Regulation of Pain and Itch by TRP Channels. *Neuroscience bulletin* 34: 120-42.

126. Sun XY, Sun LL, Qi H, Gao Q, Wang GX, Wei NN, Wang K (2018) Antipruritic Effect of Natural Coumarin Osthole through Selective Inhibition of Thermosensitive TRPV3 Channel in the Skin. *Molecular Pharmacology* 94: 1164-73.
127. Zhang H, Sun X, Qi H, Ma Q, Zhou Q, Wang W, Wang K (2019) Pharmacological Inhibition of the Temperature-Sensitive and Ca(2+)-Permeable Transient Receptor Potential Vanilloid TRPV3 Channel by Natural Forsythoside B Attenuates Pruritus and Cytotoxicity of Keratinocytes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 368: 21-31.
128. Jiang WL, Fu FH, Xu BM, Tian JW, Zhu HB, Jian H (2010) Cardioprotection with forsythoside B in rat myocardial ischemia-reperfusion injury: relation to inflammation response. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 17: 635-9.
129. Muluye RA, Bian Y, Alemu PN (2014) Anti-inflammatory and Antimicrobial Effects of Heat-Clearing Chinese Herbs: A Current Review. *Journal of traditional and complementary medicine* 4: 93-8.
130. Zhu B, Gong N, Fan H, Peng CS, Ding XJ, Jiang Y, Wang YX (2014) *Lamiophlomis rotata*, an orally available Tibetan herbal painkiller, specifically reduces pain hypersensitivity states through the activation of spinal glucagon-like peptide-1 receptors. *Anesthesiology* 121: 835-51.
131. Basnet P, Yasuda I, Kumagai N, Tohda C, Nojima H, Kuraishi Y, Komatsu K (2001) Inhibition of itch-scratch response by fruits of *Cnidium monnieri* in mice. *Biological & pharmaceutical bulletin* 24: 1012-5.
132. Qu Y, Wang G, Sun X, Wang K (2019) Inhibition of the Warm-temperature Activated Ca²⁺-permeable TRPV3 Channel Attenuates Atopic Dermatitis. *Molecular pharmacology*
133. Yan K, Sun X, Wang G, Liu Y, Wang K (2019) Pharmacological Activation of Thermo-Transient Receptor Potential Vanilloid 3 Channels Inhibits Hair Growth by Inducing Cell Death of Hair Follicle Outer Root Sheath. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 370: 299-307.
134. Nilius B, Voets T, Peters J (2005) TRP channels in disease. *Sci STKE* 2005: re8.
135. Nilius B (2013) Transient receptor potential TRP channels as therapeutic drug targets: next round! *Current topics in medicinal chemistry* 13: 244-6.
136. Sanofi. 2011. Efficacy and Safety of SAR292833 Administration for 4 Weeks in Patients With Chronic Peripheral Neuropathic Pain (Alchemilla).
137. Singh AK, McGoldrick LL, Sobolevsky AI (2018) Structure and gating mechanism of the transient receptor potential channel TRPV3. *Nature Structural & Molecular Biology* 25: 805-13.
138. Liu B, Yao J, Zhu MX, Qin F (2011) Hysteresis of gating underlines sensitization of TRPV3 channels. *Journal of General Physiology* 138: 509-20.
139. Xiao R, Tang J, Wang C, Colton CK, Tian J, Zhu MX (2008) Calcium plays a central role in the sensitization of TRPV3 channel to repetitive stimulations. *J Biol Chem* 283: 6162-74.
140. Castillo K, Diaz-Franulic I, Canan J, Gonzalez-Nilo F, Latorre R (2018) Thermally activated TRP channels: molecular sensors for temperature detection. *Physical biology* 15: 021001.
141. Mandadi S, Sokabe T, Shibasaki K, Katanosaka K, Mizuno A, Moqrich A, Patapoutian A, Fukumi-Tominaga T, Mizumura K, Tominaga M (2009) TRPV3 in keratinocytes transmits temperature information to sensory neurons via ATP. *Pflugers Arch* 458: 1093-102.
142. Phelps CB, Huang RJ, Lishko PV, Wang RR, Gaudet R (2008) Structural analyses of the ankyrin repeat domain of TRPV6 and related TRPV ion channels. *Biochemistry* 47: 2476-84.
143. Miyamoto T, Petrus MJ, Dubin AE, Patapoutian A (2011) TRPV3 regulates nitric oxide synthase-independent nitric oxide synthesis in the skin. *Nat Commun* 2: 369.
144. Doerner JF, Hatt H, Ramsey IS (2011) Voltage- and temperature-dependent activation of TRPV3 channels is potentiated by receptor-mediated PI(4,5)P₂ hydrolysis. *Journal of General Physiology* 137: 271-88.
145. Lynch VJ, Bedoya-Reina OC, Ratan A, Sulak M, Drautz-Moses DI, Perry GH, Miller W, Schuster SC (2015) Elephantid Genomes Reveal the Molecular Bases of Woolly Mammoth Adaptations to the Arctic. *Cell reports* 12: 217-28.
146. Laursen WJ, Schneider ER, Merriman DK, Bagriantsev SN, Gracheva EO (2016) Low-cost functional plasticity of TRPV1 supports heat tolerance in squirrels and camels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113: 11342-7.

147. Gracheva EO, Bagriantsev SN (2015) Evolutionary adaptation to thermosensation. *Current opinion in neurobiology* 34: 67-73.
148. Cordero-Morales JF, Gracheva EO, Julius D (2011) Cytoplasmic ankyrin repeats of transient receptor potential A1 (TRPA1) dictate sensitivity to thermal and chemical stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: E1184-91.
149. Dittert I, Benedikt J, Vyklicky L, Zimmermann K, Reeh PW, Vlachova V (2006) Improved superfusion technique for rapid cooling or heating of cultured cells under patch-clamp conditions. *J Neurosci Methods* 151: 178-85.
150. Dittert I, Vlachová V, Knotková H, Vitásková Z, Vyklický L, Kress M, Reeh PW (1998) A technique for fast application of heated solutions of different composition to cultured neurones. *J Neurosci Methods* 82: 195-201.
151. Rouser G, Fkeischer S, Yamamoto A (1970) Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* 5: 494-6.
152. Micsonai A, Wien F, Kernya L, Lee YH, Goto Y, Refregiers M, Kardos J (2015) Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112: E3095-103.
153. Lindorff-Larsen K, Piana S, Palmo K, Maragakis P, Klepeis JL, Dror RO, Shaw DE (2010) Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins* 78: 1950-8.
154. Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML (1983) Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *Journal of Chemical Physics* 79: 926-35.
155. Salomon-Ferrer R, Case DA, Walker RC (2013) An overview of the Amber biomolecular simulation package. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Computational Molecular Science* 3: 198-210.
156. Shi DJ, Ye S, Cao X, Zhang R, Wang K (2013) Crystal structure of the N-terminal ankyrin repeat domain of TRPV3 reveals unique conformation of finger 3 loop critical for channel function. *Protein & cell* 4: 942-50.
157. Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE (2004) WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Research* 14: 1188-90.
158. Liao M, Cao E, Julius D, Cheng Y (2013) Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature* 504: 107-12.
159. Cao E, Liao M, Cheng Y, Julius D (2013) TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature* 504: 113-8.
160. Huynh KW, Cohen MR, Jiang J, Samanta A, Lodowski DT, Zhou ZH, Moiseenkova-Bell VY (2016) Structure of the full-length TRPV2 channel by cryo-EM. *Nature communications* 7: 11130.
161. Deng ZQ, Paknejad N, Maksaev G, Sala-Rabanal M, Nichols CG, Hite RK, Yuan P (2018) Cryo-EM and X-ray structures of TRPV4 reveal insight into ion permeation and gating mechanisms. *Nature Structural & Molecular Biology* 25: 252-60.
162. Zubcevic L, Herzik MA, Jr., Chung BC, Liu Z, Lander GC, Lee SY (2016) Cryo-electron microscopy structure of the TRPV2 ion channel. *Nature Structural & Molecular Biology* 23: 180-6.
163. Samad A, Sura L, Benedikt J, Etrich R, Minofar B, Teisinger J, Vlachova V (2011) The C-terminal basic residues contribute to the chemical- and voltage-dependent activation of TRPA1. *Biochemical Journal* 433: 197-204.
164. Witschas K, Jobin ML, Korkut DN, Vladan MM, Salgado G, Lecomte S, Vlachova V, Alves ID (2015) Interaction of a peptide derived from C-terminus of human TRPA1 channel with model membranes mimicking the inner leaflet of the plasma membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* 1848: 1147-56.
165. Buchan DWA, Jones DT (2019) The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 years on. *Nucleic acids research* 47: W402-W7.

166. Zubcevic L, Borschel WF, Hsu AL, Borgnia MJ, Lee SY (2019) Regulatory switch at the cytoplasmic interface controls TRPV channel gating. *eLife* 8
167. Zheng W, Qin F (2015) A combined coarse-grained and all-atom simulation of TRPV1 channel gating and heat activation. *The Journal of General Physiology* 145: 443-56.
168. Wen H, Qin F, Zheng W (2016) Toward elucidating the heat activation mechanism of the TRPV1 channel gating by molecular dynamics simulation. *Proteins* 84: 1938-49.
169. Wen H, Zheng W (2018) Decrypting the Heat Activation Mechanism of TRPV1 Channel by Molecular Dynamics Simulation. *Biophysical Journal* 114: 40-52.
170. Chugunov AO, Volynsky PE, Krylov NA, Nolde DE, Efremov RG (2016) Temperature-sensitive gating of TRPV1 channel as probed by atomistic simulations of its trans- and juxtamembrane domains. *Scientific Reports* 6: 33112.
171. Raymond KA, Twomey EC, Wei Y (2014) Characterization of temperature-sensing and PIP2-regulation of TRPV1 ion channel at the C-terminal domain using NMR spectroscopy and Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Integrated OMICS* 4: 79-86.
172. Melnick C, Kaviany M (2018) Thermal actuation in TRPV1: Role of embedded lipids and intracellular domains. *Journal of Theoretical Biology* 444: 38-49.
173. Kasimova MA, Yazici A, Yudin Y, Granata D, Klein ML, Rohacs T, Carnevale V (2018) Ion Channel Sensing: Are Fluctuations the Crux of the Matter? *The Journal of Physical Chemistry Letters* 9: 1260-4.
174. Karttunen S, Duffield M, Scrimgeour NR, Squires L, Lim WL, Dallas ML, Scragg JL, Chicher J, Dave KA, Whitelaw ML, Peers C, Gorman JJ, Gleadle JM, Rychkov GY, Peet DJ (2015) Oxygen-dependent hydroxylation by FIH regulates the TRPV3 ion channel. *Journal of Cell Science* 128: 225-31.
175. Kim D, Cavanaugh EJ (2007) Requirement of a soluble intracellular factor for activation of transient receptor potential A1 by pungent chemicals: role of inorganic polyphosphates. *J Neurosci* 27: 6500-9.
176. Karashima Y, Prenen J, Meseguer V, Owsianik G, Voets T, Nilius B (2008) Modulation of the transient receptor potential channel TRPA1 by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate manipulators. *Pflugers Arch* 457: 77-89.
177. Wang YY, Chang RB, Waters HN, McKemy DD, Liman ER (2008) The Nociceptor Ion Channel TRPA1 Is Potentiated and Inactivated by Permeating Calcium Ions. *J Biol Chem* 283: 32691-703.
178. Zimova L, Sinica V, Kadkova A, Vyklicka L, Zima V, Barvik I, Vlachova V (2018) Intracellular cavity of sensor domain controls allosteric gating of TRPA1 channel. *Science signaling* 11
179. Sura L, Zima V, Marsakova L, Hynkova A, Barvik I, Vlachova V (2012) C-terminal Acidic Cluster Is Involved in Ca²⁺-induced Regulation of Human Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Channel. *Journal of Biological Chemistry* 287: 18067-77.
180. Grycova L, Lansky Z, Friedlova E, Obsilova V, Janouskova H, Obsil T, Teisinger J (2008) Ionic interactions are essential for TRPV1 C-terminus binding to calmodulin. *Biochem Biophys Res Commun* 375: 680-3.
181. Alberdi A, Gomis-Perez C, Bernardo-Seisdedos G, Alaimo A, Malo C, Aldaregia J, Lopez-Robles C, Areso P, Butz E, Wahl-Schott C, Villarroel A (2015) Uncoupling PIP2-calmodulin regulation of Kv7.2 channels by an assembly destabilizing epileptogenic mutation. *Journal of cell science* 128: 4014-23.
182. 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
183. Andersson DA, Gentry C, Alenmyr L, Killander D, Lewis SE, Andersson A, Bucher B, Galzi JL, Sterner O, Bevan S, Hogestatt ED, Zygmunt PM (2011) TRPA1 mediates spinal antinociception induced by acetaminophen and the cannabinoid Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Nat Commun* 2: 551.

Přílohy

Příloha 1



Weblogo ukazující míru konzervovanosti TRPV3 proteinů v rámci teplotně citlivých TRPV proteinů.

Příloha 2

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
hTRPV3  -MKAHPKEMVPLMG-KRVAAPSGNPAILPEKRPAAETPTTKSAHFFLEIEGFEPNPTVAKTSPPVFSKPMDSNIRQCISGNCDDMDSPOQDDVTEPTS
rTRPV3  -MNAHSEKEMVPLMG-KRTTAPGGNPAVLTEKRPADLTPTKSAHFFLEIEGFEPNPTVTKTSPPIFSKPMDSNIRQCISGNCDDMDSPOQDDVTEPTS
mTRPV3  -MNAHSEKEMVPLMG-KRTTAPGGNPAVLTEKRPADLTPTKSAHFFLEIEGFEPNPTVTKTSPPIFSKPMDSNIRQCISGNCDDMDSPOQDDVTEPTS
cTRPV3  -MIKDNKEVPLMG-KKTNPAGAPPNQEKKPESTPTTKSSHFFLEIEGFEENATPNNTSPPVFSKPMDSNIRPCASANGEDMDSPOQDDVTEYSP
sTRPV3  -MIKDIKEMVPLMGKNGKPGPRETPPAADQDKRAAEGAPAKKSHFFLEIEAFESNVSPSRTSPPVFSKPMDSNIRPCASANGEDMDSPOQDDVTEYTP
xTRPV3  MINKHPGEMSP LIS-RERLAPGTPP-----RSPRHTENGLKRND-----TTDFSRSNPLWLSQMDTNNYSNEKKN-EDTDTPTQTQ-----TAFSP
fTRPV3  MIKFRARRERLMMD-----KTLNLRVLLATEVDS-----CTPDPCEMEEKI-----

      110      120      130      140      150      160      170      180      190      200
hTRPV3  NPNSPSAQLAK-EEQRRKKRRLKKRIFAAVSEGCVEELVELLQELQELRRRHDEDVDFLMHKL TASDTGKTCMLKALLNINPNTKEIVRILLAFEAEN
rTRPV3  NPNSPSANLAK-EEQRRKKRRLKKRIFAAVSEGCVEELVELLQELQELRRRRGLDASDFLMHKL TASDTGKTCMLKALLNINPNTKEIVRILLAFEAEN
mTRPV3  NPNSPSANLAK-EEQRRKKRRLKKRIFAAVSEGCVEELVELLQELQELRRRRGLDVPDFLMHKL TASDTGKTCMLKALLNINPNTKEIVRILLAFEAEN
cTRPV3  NVDSGCGANIAQGPETGARKKLLKXYIFRAVSEGNVEELQGLLAELEKERSNVCTNMTVPDYLKMKFTASDTGKTCMLKALLNINNTQIVNMLLSFAEEN
sTRPV3  NAESSCTNSTHNAQQNNYRKKLKKYLFRAVSEGNLEDLQRLLVEMKDRSQRQNLTVQEYLMNKMTSSDTGKTCMLKALLNINQHTKEIVNMLLSFAEEN
xTRPV3  ---CYGQGRKPAALTRNTRKPTKLLFKAVSEGDEMLTDLLEAKSSSRVSVTQAKEFFMHKLT SKDTGKTCMLKALLNINEKTPVVRSLTFAEEN
fTRPV3  -----QRKLQNRVWDFYRSIAEGDLGEFDKFLQFQE-----SKTKLTAELWLRDPRGTGKTCMLKALLNINQEMVEKLSFAEAS

      210      220      230      240      250      260      270      280      290      300
hTRPV3  DILGRFINAEYTEEAYEGQTALNIAIERROGDIAALLIAAGADVNAHAKGAFVFNPKYQHEGFYFGETPLALAACTNQPEIVQLLMEHQDTITSRDSRGN
rTRPV3  DILDRFINAEYTEEAYEGQTALNIAIERROGDITAVLIAAGADVNAHAKGVFFNPKYQHEGFYFGETPLALAACTNQPEIVQLLMEHQDTITSQDSRGN
mTRPV3  DILDRFINAEYTEEAYEGQTALNIAIERROGDITAVLIAAGADVNAHAKGVFFNPKYQHEGFYFGETPLALAACTNQPEIVQLLMEHQDTITSQDSRGN
cTRPV3  GILERFINAEYTEEAYRGGTALNIAIERROGEITQTLIEKADVNAHAQGVFFNPKKHKEGFYFGETALALAACTNQPDIEELMDNTRTNIAAQDSRGN
sTRPV3  QILEKLINAEYTEEAYRGGTALNIAIERROYDITQTLIEKADVNAHAQGVFFNPKKHKEGFYFGETPLALAACTNQPDIVQLLMEHQDTITSDAQRGN
xTRPV3  DILELFINAEYTEENYGGTALNIAIERROVELVKYLIEKAGIDVRAQGRFFNPKNYEGFYFGETPLALAACTNQPEIVQLLMDKSPITIGTIQDSLGN
fTRPV3  DSELEQLINAEYTDREYKGGTALHIAIERROCKTIVQLLVEKADNNAQGRFFPKPKLKHGFYFGETPLALAACTNQPDIVTLLMASGRTRVRAQDAMGN

      310      320      330      340      350      360      370      380      390      400
hTRPV3  NILHALVTVAEDFKTQNDVFKRMYDMILLRSGNWELETTRNNDGLTLPQLAAKMGKAEILKYILSREIKEKPLRSLSRKFTDWAYGVPVSSSLYDLTNVDT
rTRPV3  NILHALVTVAEDFKTQNDVFKRMYDMILLRSGNWELETTRNNDGLTLPQLAAKMGKAEILKYILSREIKEKPLRSLSRKFTDWAYGVPVSSSLYDLTNVDT
mTRPV3  NILHALVTVAEDFKTQNDVFKRMYDMILLRSGNWELETTRNNDGLTLPQLAAKMGKAEILKYILSREIKEKPLRSLSRKFTDWAYGVPVSSSLYDLTNVDT
cTRPV3  NILHALVTVAEDFKTQNDVFKRMYDMILLRSGNWELETTRNNDGLTLPQLAAKMGKAEILKYILSREIKEKPLRSLSRKFTDWAYGVPVSSSLYDLTLD
sTRPV3  NILHALVTVAEDFKTQNDVFRMYDITLLKRSRDLLETMKNKAGLTPQLAAKTKLEILKYILSREIKEKPLRSLSRKFTDWAYGVPVSSSLYDLTLD
xTRPV3  TILHALVNVADNSEAQNDFIIGMYDITLRNCKNKLEQIPNNEGTLMSLAAKLGKTEILHYILSREIKEKENMVLRSKFTDWAYGVPVSSSLYDLTSDT
fTRPV3  CILHALVTVAEDSEENFTVTEMYDMILMSSQDHNLEGGICNLRGLNPLQLAAKLGKFKIFSHILCREFGDKKHLNLSRKITDWAYGVPVSSSLYDLTEVDT

      410      420      430      440      450      460      470      480      490      500
hTRPV3  TTDNSVLEIIVYNTNIDNRHEMLTLEPLHTLLHMKWKKFAKYMFFLSFCFYFFYNIITLTVSYRPREDEALPHPLALTHKMSWLQLGRMFVLIWAMCI
rTRPV3  TTDNSVLEIIVYNTNIDNRHEMLTLEPLHTLLHMKWKKFAKYMFFLSFCFYFFYNIITLTVSYRPREDEALPHPLALTHKMSWLQLGRMFVLIWAMCI
mTRPV3  TTDNSVLEIIVYNTNIDNRHEMLTLEPLHTLLHMKWKKFAKYMFFLSFCFYFFYNIITLTVSYRPREDEALPHPLALTHKMSWLQLGRMFVLIWAMCI
cTRPV3  TADNSVLEIIVYNTNIDNRHEMLTLEPLNSLLRMKWKRFARHMLFMSCCFYFLYNIITLTVSYRPREDEALPHPLALTHKMSWLQLGRMFVLIWAMCI
sTRPV3  TSENSLIDIVYNTNIDNRHEMLLEPLHSLLRMKWKRFARHMLFMSCCFYFLYNIITLTVSYRPHHTQPPYPLALIGDNLNLQLAGQAQVILGAVF
xTRPV3  CWPNSVLEIIVYNTNIDNRHEMLTLEPLHTLLQMKWKKFARYMFFLSFLLSFTYNIITLTVSYRPREGEQD-VYPLNLSYENGWLQVLVGMQIIVCATYL
fTRPV3  NHQNSVLEIIVYNTNIDNRHEMLLEPLHTLLQMKWKKFARYMFFLSFLLSFTYNIITLTVSYRPREGEQD-VYPLNLSYENGWLQVLVGMQIIVCATYL

      510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
hTRPV3  SVKEGIAIFLLRPSDLQSLSDAWFHVFVQAVLVILSVFLYLFAYKEYLACLVLAMALGWANMLYYTRGFQSMGYSMVIQKVLHDLVKFLFVYILF
rTRPV3  SVKEGIAIFLLRPSDLQSLSDAWFHVFVQAVLVILSVFLYLFAYKEYLACLVLAMALGWANMLYYTRGFQSMGYSMVIQKVLHDLVKFLFVYILF
mTRPV3  SVKEGIAIFLLRPSDLQSLSDAWFHVFVQAVLVILSVFLYLFAYKEYLACLVLAMALGWANMLYYTRGFQSMGYSMVIQKVLHDLVKFLFVYILF
cTRPV3  AIKESVAIFLLRPSDLQSLSDAWFHFAFFIQAVLVIFSVFLYLYSFKGHLPLCLVLAMALGWANMLYFTRGLQSMGIYSVMIQKVLHDLVKFLFVYILF
sTRPV3  AIKESVALFLLRPSDLQSLSDAWFHFAFFIQAVLVIFSVFLYLYSFKGHLPLCLVLAMALGWANMLYFTRGLQSMGIYSVMIQKVLHDLVKFLFVYILF
xTRPV3  MVKEAVMFLVKQSDLSKSVLSDAWFHILFFIQAVLVIVSVFCYLFVDFYLVFLVAMALGWANMLYYTRGFQSLGIYSVMIQKVLHDLVKFLFVYILF
fTRPV3  IIEKGLVLRRLRPSDLRSVTDWAFHILFFLQALMTASSAVLQWAVEAHLHLLVLPALALGWANMLYFTRGFQSMGIYSVILQKVLHDLVKFLFVYILF

      610      620      630      640      650      660      670      680      690      700
hTRPV3  LLGFGVALASLIEKCKPKDKCCSSYGSFSDAVLELFKLTIGLGDNIQONSTYPIFLFLLITYVILTFVLLNMLIALMGTEVENVSKESERINRQORA
rTRPV3  LLGFGVALASLIEKCKPKDKCCSSYGSFSDAVLELFKLTIGLGDNIQONSTYPIFLFLLITYVILTFVLLNMLIALMGTEVENVSKESERINRQORA
mTRPV3  LLGFGVALASLIEKCKPKDKCCSSYGSFSDAVLELFKLTIGLGDNIQONSTYPIFLFLLITYVILTFVLLNMLIALMGTEVENVSKESERINRQORA
cTRPV3  LLGFGVALAALIECTQNGGE-CLNSLSLGPVLMDFKLTIGLGDLEIQONSTYPIFLFLLITYVILTFVLLNMLIALMGTEVEDISKESEHINRQORA
sTRPV3  LFGFGVALAALVDSQDSSG-CNEYSVLGSEIEDLFLMLTGLGELDVPKAKYPIFLFLLITYVILTFVLLNMLIALMGTEVEDISKESEHINRQORA
xTRPV3  LLGFGVALASLLENCEDGEE---CQSLSTAILLELFELTIGLGRLEMDKDPKYPVFLFLLITFVILTFVLLNMLIALMGTEVEKISQSEHINRQORA
fTRPV3  LLGFGVALASLIDSCPNSLE-CSPYLTFNTVILELFKLTIGLGDLEIQONSTYPIFLFLLITYVILTFVLLNMLIALMGTEVEDTAKESKINRQORA

      710      720      730      740      750      760      770      780      790      800
hTRPV3  RTILEFEKMLPEWLRSRFRMGELCKVAEDDF-RLCLRINEVKWTEWKTHVSLNEDPGPIRR-----T-DFNKIQ-----DSSRNS-
rTRPV3  RTILEFEKMLPEWLRSRFRMGELCKVAEDDF-RLCLRINEVKWTEWKTHVSLNEDPGPIRR-----TADLNKIQ-----DSSRNS-
mTRPV3  RTILEFEKMLPEWLRSRFRMGELCKVAEDDF-RLCLRINEVKWTEWKTHVSLNEDPGPIRR-----TADLNKIQ-----DSSRNS-
cTRPV3  RTILEFEKFLPKSLRKKFQLGERCKVAENDT-RVCLRINEVRWTEWKTHVSLNEDPG-----PTDPSKVQ-----DNSRTNS-
sTRPV3  RTIVIEIEKLLPQFLRRRQLGEWCKVADSDS-RLCLRINEVKWTEWKTHVAFINEDPGS-----TVHCSRMQ-----DTSRNS-
xTRPV3  RTILEFEKSLPAWLQARFQLGESCTVSKGDNRRICLRINEVKWTEWNNHVTCIKEEPLTFPPD-----TKDNTASDELDSEKFA-
fTRPV3  RMILNLERSLPKCLRRRQLGTILKNSQGHS-RRYTRINEVNWTKWTSVARIHEDPGNEEEQEDKSSDEVHKKICPGTLLQSVQTSGPSDEKKEEPR

      810      820      830
hTRPV3  -----KTLNLAFAEEVEFPETSV-----
rTRPV3  -----KTLYAFDELDEFPETSV-----
mTRPV3  -----KTLYAFDELDEFPETSV-----
cTRPV3  -----KNTLNTFEETDLPETSL-----
sTRPV3  -----KTLNLAFAEEIYDLPETTV-----
xTRPV3  -----GISISVGLDEQAMETTV-----
fTRPV3  CKRIGKLRIRAKNMNTLHSEAVLEQETPYLQEPSNTTQ

```

Sekvenční porovnání aminokyselinových sekvencí TRPV3 ortologu: lidské (h), potkaní (r), myši (m), slepičí (c), hadí (s), obojživelníků (x) a ryb (f). Rezidium vyznačené růžovou barvou se napříč evolucí vymyká konzervovanosti u obojživelníků a ryb. PH, pórový helix; TRP, TRP doména.

Souhrn publikací

Publikace v impaktovaných časopisech

- I. Máčiková L., Vyklická L., Barvík I., Sobolevsky A. I., Vlachová 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)
- II. Máčiková L., Sinica V., Kádková A., Villette S., Ciaccafava A., Faherty J., Lecomte S., Alves I. D., Vlachová 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)
- III. Vyklická L., Boukalová S., Máčiková L., Chvojka S., Vlachová 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)
- IV. Sinica V., Zimová L., Barvíková K., Máčiková L., Barvík I., Vlachová V. (2020) Human and Mouse TRPA1 Are Heat and Cold Sensors Differentially Tuned by Voltage. *Cells*, 9 (1), 57-80. (IF = 5.656)
- V. Zimová L., Barvíková K., Máčiková L., Vyklická L., Sinica V., Barvík I., Vlachová 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)

Publikace v odborných českých časopisech

- VI. Vlachová V., Máčiková L., Barvíková K. (2018) Receptor pro hořčici místem účinku paracetamolu. (česky) *Bolest*, 21(8), 131-138.